

Univerzita Karlova v Praze

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



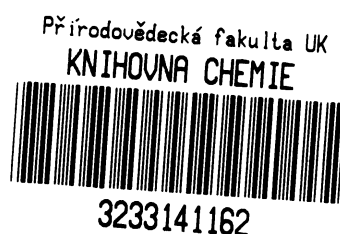
Hana Kourová

**Metabolismus potenciálních lidských karcinogenů
o-nitroanisolu a *o*-anisidinu**

Bakalářská práce

Školitelka: RNDr. Markéta Martínková, Ph.D.

Praha 2007



Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně, pod vedením školitelky RNDr. Markéty Martínkové, Ph.D., a že jsem všechny použité prameny řádně citovala. Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne...*6.6.2007*.....

Blanka Kounová
.....
Podpis

Je mou milou povinností poděkovat své školitelce RNDr. Markétě Martínkové, Ph.D. za odborné vedení, rady a připomínky, které mi ochotně po celou dobu řešení bakalářské práce poskytovala.

Obsah

Seznam použitých zkratk

1. Úvod a přehled literatury.....	6
1.1. Mechanismus karcinogeneze.....	7
1.2. Metabolismus cizorodých látek.....	8
1.3. Enzymatické systémy důležité pro metabolismus cizorodých látek.....	9
1.3.1. Cytochromy P450.....	9
1.3.1.1. Funkce cytochromu P450.....	9
1.3.1.2. Struktura cytochromu P450.....	10
1.3.1.3. Reakční cyklus cytochromu P450.....	11
1.3.1.4. Nomenklatura cytochromů P450.....	12
1.3.1.5. Cytochromy P450 aktivující prokarcinogeny a protoxikanty.....	13
1.3.2. Peroxidasy.....	13
1.3.2.1. Struktura peroxidasy.....	14
1.3.2.2. Katalytický cyklus peroxidasy.....	14
1.3.3. Reduktasy.....	16
1.3.3.1. Xanthinoxidasa.....	16
1.3.3.2. NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa.....	17
1.4. <i>o</i> -Nitroanisol.....	17
1.4.1. Metabolická přeměna 2-NA zprostředkovaná cytochromy P450.....	18
1.4.2. Metabolická přeměna 2-NA zprostředkovaná reduktasami.....	19
1.5. <i>o</i> -Anisidin.....	20
1.5.1. Metabolická přeměna <i>o</i> -anisidinu zprostředkovaná peroxidasami.....	21
1.5.2. Metabolická přeměna <i>o</i> -anisidinu zprostředkovaná cytochromy P450.....	22
2. Cíl práce.....	24
3. Problematika detekce HNOHA v experimentech s CYP.....	25
3.1. Analogické aromatické aminy.....	25
4. Návrh řešení problému detekce HNOHA.....	27
4.1. Měření spotřeby NADPH.....	27
4.2. Spektrofotometrie.....	28
5. Závěr.....	30
6. Seznam použité literatury.....	33

Seznam použitých zkratek

AA	aromatické aminy
A₃₄₀	absorbance při vlnové délce 340 nm
CYP	cytochrom P450
DPF	4,7-difenyl-1,10 phenanthrolin
FAD	flavinadenindinukleotid
HAA	heterocyklické aromatické aminy
HNOHA	N-(2-metoxyfenyl)hydroxylamin
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NADP⁺	nikotinamidadenindinukleotid-oxidovaný
NPR	NADPH:P450 reduktasa
<i>o</i>-A	<i>o</i> -anisidin
<i>o</i>-NA	<i>o</i> -nitroanisol
RNH₂	aromatický amin
RNHOH	N-hydroxy arylamin
RN=O	nitroso produkt
XO	xanthinoxidasa

1. Úvod a přehled literatury

V dnešní době se lidstvo potýká se stále více znečišťujícím prostředím charakterizovaném přítomností velkého množství polutantů. Chemikálie se do organismu dostávají nejen z ovzduší ale i potravou nebo jako léčiva. Jedná se o látky, které nepříznivě působí jak na lidský tak živočišný organismus. Z asi 600 takovýchto sloučenin bylo padesát označeno za látky vyvolávající u člověka rakovinné onemocnění¹. Protože jsou lidé v souvislosti s technologickým vývojem karcinogenům stále více vystavováni, je důležité objasnit metabolické dráhy těchto látek a umožnit tak vyvarování se jejich nepříznivým vlivům.

Příkladem takovýchto polutantů jsou aromatické nitro a amino sloučeniny. Využívány jsou jako suroviny pro organické syntesy či jako polotovary pro výrobu barviv. Mimo jiné byla jejich přítomnost prokázána ve výfukových plynech a cigaretovém kouři, čímž značně přispívají k regionálnímu znečištění². Široké průmyslové využití těchto látek je určitým rizikem pro exponované osoby pracující v chemickém průmyslu.

U většiny aromatických dusíkatých látek je zapotřebí pro vyvolání karcinogenního efektu metabolické aktivace³. Dochází tak k přeměně prokarcinogenních forem na reaktivní ultimální metabolity. Nejvýznamnějšími enzymy aktivujícími karcinogeny jsou monooxygenasy se smíšenou funkcí, tedy cytochromy P450. Mezi extrahepatální enzymy tohoto typu se pak řadí hemové peroxidasy (prostaglandin H synthasa, laktoperoxidasa). V případě jiných sloučenin hrají důležitou roli také cytosolické reduktasy (xanhtinoxidasa, DT-diaforasa)³.

Aromatické nitro a amino sloučeniny jsou pro svou potenciální toxicitu a karcinogenitu stále častěji předmětem mnoha výzkumů. Metabolické procesy u většiny z nich jsou již zcela prostudovány, avšak osud několika sloučenin zůstává stále neobjasněný⁴. To platí rovněž pro látky *o*-anisidin (*o*-A) a *o*-nitroanisol (*o*-NA). I v tomto případě se jedná o potenciální lidské karcinogeny⁴. Molekulární mechanismus karcinogenity *o*-nitroanisolu je prozkoumán včetně identifikace vznikajících metabolitů^{21,22}. Metabolismus *o*-anisidinu je také znám, ale jsou zde doposud jisté nejasnosti^{29,30}.

1.1. Mechanismus karcinogeneze

Vznik nádorového bujení je složitý proces narušení regulace buněčného růstu. Za primární příčinu jsou považovány genetické změny, které tímto způsobí ztrátu diferenciace buněk s následkem nekontrolovatelného množení buněčné tkáně. Mezi geny, jejichž porušení vede k rozvoji maligní transformace, se řadí protoonkogeny a tumor-supresorové geny⁵. Kromě vrozených poruch může k jejich poškození dojít působením celé řady vnějších vlivů. Mezi takovéto patří faktory fyzikální (různé formy záření), biologické (onkogenní viry) a v neposlední řadě chemické (různé chemikálie).

Chemické karcinogeny lze rozlišit do tří skupin podle mechanismu jejich působení. Jestliže dojde k poškození genetické informace kovalentními adukty, jedná se o karcinogeny genotoxické⁶. Takovýto mechanismus vzniku karcinogeneze je nejvíce pravděpodobný. Uskutečňuje se navázáním karcinogenů na base nebo deoxyribosu molekuly DNA. Chemické látky působící tímto genotoxickým mechanismem nejsou obvykle schopny tvořit adukty sami o sobě. Jsou nazývány tzv. prokarcinogeny a v reaktivní ultimální formu jsou přeměněny po aktivaci některými z enzymů³.

Druhou skupinou jsou karcinogeny, které způsobují změnu struktury molekuly DNA. Takovéto narušení může být uskutečněno jedno či dvou řetězcovými zlomy nebo propojením molekul (tzv. cross-linking)⁶.

Třetí mechanismus působení chemických karcinogenů je epigenetický⁶. Jedná se o látky nazývané se interkalátory, které narušují DNA prostřednictvím nekovalentních interakcí. Jak vyplývá z označení, jde především o jejich vmezeření do molekuly DNA.

Chemická karcinogeneze je složitý multifázový proces skládající se ze tří fází: iniciace, promoce a progres. V iniciační fázi dochází k narušení genetické informace zdravých buněk. To je způsobeno například kovalentním navázáním karcinogenu na DNA nebo podobnými modifikacemi této makromolekuly (tvorba interkalátů či cyklických aduktů). V této fázi je ještě možná oprava poškozených genů reparačními buněčnými mechanismy. Jestliže tomu tak není, podléhá iniciovaná buňka dalším faktorům, které vedou k jejímu nekontrolovatelnému množení a ke vzniku benigního nádoru. Buňka se tak ocitá v promoční fázi karcinogenního procesu. Mezi promoční faktory patří aktivita proteinkinasy a fosfatasy, dále například působení radikálových forem kyslíku na molekuly DNA způsobující tak jejich další narušení. Vznik kyslíkových radikálů je podmíněn činností enzymových systémů (peroxidasy, cytochromů P450), které tímto nepřímo zasahují do promoční karcinogenní fáze⁶. Dalším pozměněním

genetické informace buněk nastává již fáze progresní, tedy finální krok chemické karcinogeneze. Pro tuto fázi je charakteristické zvyšování rychlosti množení buněk související s poruchou tkáňové kontroly. Vzniká tak maligní nádor schopný tvořit metastázy⁵.

1.2. Metabolismus cizorodých látek

Proces metabolismu cizorodých látek v organismu se nazývá biotransformace. Při tomto pochodu látka podléhá určitým změnám vedoucím ke vzniku řady metabolitů. Základní funkcí metabolismu xenobiotik je bezpochyby jejich detoxikace a následné vyloučení z organismu. To platí zejména pro látky lipofilní, které nejsou pro svou chemickou povahu vylučovány v takové míře jako látky hydrofilní. Proto musí takovéto sloučeniny pro svou eliminaci podstoupit celou řadu chemických změn vedoucích k jejich biotransformaci na polárnější produkty⁷.

Biotransformační reakce se rozlišují na dvě fáze:⁷

- Mezi reakce I. fáze se zařazují pochody nesyntetické. Úkolem těchto procesů je alespoň částečná přeměna cizorodých lipofilních sloučenin na látky hydrofilní. Děje se tak například včleněním polárních skupin, oxidací či redukcí.
- Reakce II. fáze se nazývají syntetické, neboli konjugační. Dochází při nich ke slučování substrátů s endogenními látkami ve snaze snížit toxicitu těchto sloučenin. Nejčastěji dochází ke konjugaci s kyselinou glukuronovou nebo glycinem.

Ačkoli by tyto výše uvedené eliminační reakce měli spět k detoxikaci cizorodých látek, nestává se tak vždy. Může docházet naopak ke vzniku velmi reaktivních metabolitů, které mohou mít za následek karcinogenní či toxické účinky na organismus³. Sloučenina tak namísto detoxikace podstupuje do určité míry metabolickou aktivační dráhu. Příkladem může být celá řada sloučenin, například aromatické polycyklické uhlovodíky nebo aromatické dusíkaté sloučeniny². Takovéto látky, které sami o sobě nevykazují karcinogenní účinky se nazývají prokarcinogeny. Při biotransformačních procesech jsou účinkem některých enzymů aktivovány na proximální karcinogeny. Tato forma není ještě zodpovědná za vznik maligní transformace. Za takovouto je považována tzv. ultimální forma karcinogenu, která je silně elektrofilní a má schopnost atakovat biologické makromolekuly.

1.3. Enzymatické systémy důležité pro metabolismus cizorodých látek

Jak je známo, hlavním detoxikačním orgánem jsou játra. Z tohoto důvodu se v hepatocytech nalézá celá řada enzymatických systémů katalyzující metabolické změny cizorodých látek. Cytochromy P450 jsou nejznámějším a nejvýznamnějším enzymovým systémem tohoto druhu⁸. Mimo jater působí v menší míře také v plicích, ledvinách či jiných tkáních. Dále jsou například při detoxikaci xenobiotik prokázány katalytické účinky reduktas a extrahepatálních peroxidas⁹.

1.3.1. Cytochromy P450

Cytochromy P450 je označení pro širokou skupinu membránových enzymů katalyzující řadu chemických reakcí za účasti molekulárního kyslíku. Jedná se o monooxygenasový systém patřící díky své funkční variabilitě mezi jeden z nejlépe prostudovaných. V lidském těle se tyto enzymy vyskytují nejvíce v játrech, poté v plicích, ledvinách či v tenkém střevě. V buňkách je pak možné je nalézt v membránách hladkého endoplasmatického retikula, popřípadě v membránách mitochondrií¹⁰.

Cytochromy P450 hrají podstatnou roli v metabolismu xenobiotik⁸. Lidský organismus je postupem doby vystavován stále vyšším nárokům ve smyslu odbourávání cizorodých látek vzniklých rozvojem technologických procesů a tvorbou nových průmyslových sloučenin. Proto je znalost molekulárního působení těchto enzymů téměř nepostradatelná zejména v klinické praxi při objasnění detoxikačního, případně aktivačního mechanismu drog, léčiv a v neposlední řadě environmentálních polutantů.

1.3.1.1. Funkce cytochromů P450

Jak již bylo řečeno, hlavní funkcí této široké skupiny enzymů je metabolismus cizorodých látek. Jedná se o katalýzu I. fáze biotransformace, což může být včetně reakcí oxidačních také demethylace nebo redukce¹⁰.

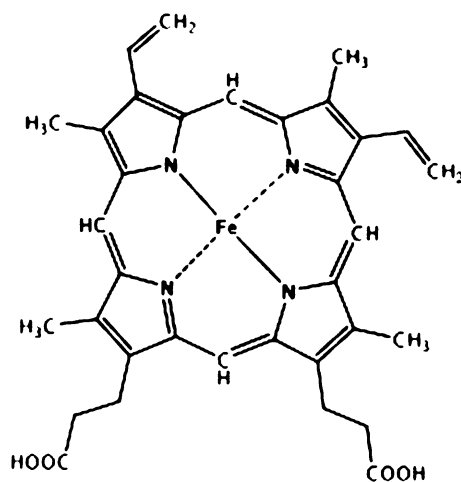
Cytochromy P450 jsou považovány za monooxygenasy se smíšenou funkcí¹⁰. Toto označení plyne z jejich schopnosti aktivovat molekulu kyslíku a štěpit ji, přičemž jeden atom je začleněn do xenobiotika (monooxygenasová aktivita) a druhý dává vznik molekule vody (oxidasová aktivita). Fungují tedy jako monooxygenasy a současně i jako oxidasy. Některé typy těchto enzymů však mohou plnit funkci dioxygenas. Pak jsou do substrátu začleněny oba atomy kyslíku a současně tak dochází k jeho štěpení¹¹. Tímto vznikají polárnější produkty, které mohou být z těla lehce vyloučeny.

V současné době je na metabolickou funkci cytochromů P450 kladen veliký důraz a to zejména v oboru léčiv, kdy je studiem těchto enzymů umožněno předběžně odhadnout reakci pacienta na podané léčivo. Proto je velmi důležitá znalost jednotlivých lidských izoforem cytochromů P450 podílejících se na konkrétních metabolismech.

Druhá funkce těchto enzymů je biosyntetická. Zajišťují ji hlavně cytochromy P450 lokalizované v mitochondriích. Jde především o syntesu endogenních látek jako jsou steroidní hormony, vitamíny skupiny D nebo prostaglandiny. Rostlinné cytochromy mohou vytvářet například mastné kyseliny, kyselinu skořicovou nebo květní barviva.

1.3.1.2. Struktura cytochromu P450

Cytochromy P450 se podobně jako jiné cytochromy řadí mezi hemové proteiny. Jádrem je tvořeno ferriprotoporfyriinem IX, neboli hemem b (Obr. 1), který obsahuje porfyrin se čtyřmi methylovými, dvěma propionátovými a dvěma vinylovými substituenty.



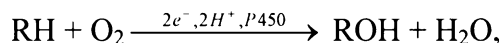
Obr. 1 – hem b (převzato z ¹²)

Součástí aktivního centra je koordinačně vázaný atom železa, který zprostředkovává navázání molekuly kyslíku. Pátým, proximálním ligandem železa je zde cystein, který je na atom vázán prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny. Tímto se cytochromy P450 odlišují od ostatních hemoproteinů a to jak katalyticky, tak spektrálně^{13,14,15}. Právě ona thiolátová skupina je důvodem pro absorpční maximum komplexu Fe²⁺-CO (tedy komplexu, ve kterém je šestým ligandem molekula oxidu uhelnatého) při 450nm¹⁶. Z tohoto zjištění vyplývá označení cytochromu P450.

Mohlo by se říci, že by se tyto enzymy měly nazývat spíše hemthiolátové proteiny nežli cytochromy. Jak již bylo zmíněno, neúčastní se přenosu elektronů jako klasické cytochromy, nýbrž vkládají kyslík do organických substrátů.

1.3.1.3. Reakční cyklus cytochromu P450

Katalytický cyklus cytochromu P450 je možné shrnout do následující rovnice:



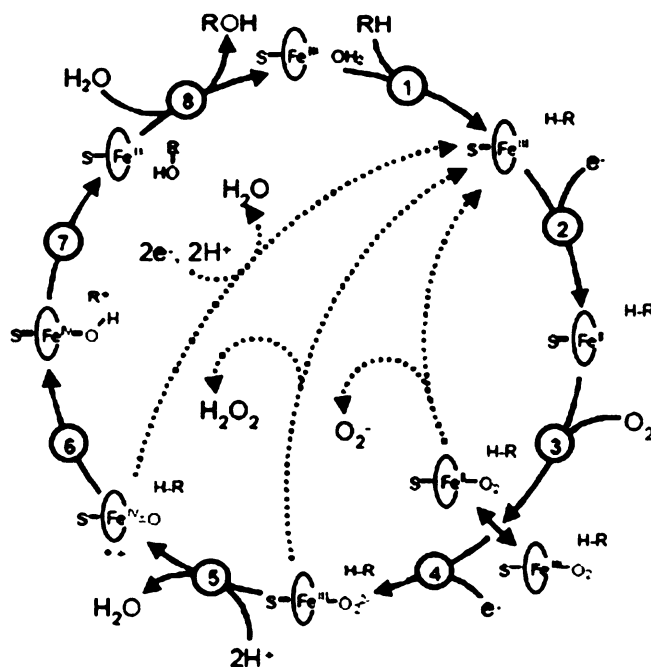
kde RH představuje nepolární substrát a ROH substrát s již vloženým kyslíkem. Pro vytvoření polárního produktu je zapotřebí dvou redukčních kroků. Ty je možné uskutečnit pomocí NADPH:cytochrom P450 reduktasy(NPR) nebo enzymů mitochondrií¹⁷. V mitochondriálních cytochromech je elektron přenášen z NADH na ferredoxin reduktasu, a to za účasti flavinových přenašečů na vlastní cytochrom P450. U mikrosomálních cytochromů je namísto ferredoxinu využita již zmíněná NPR. I zde je elektron transportován mezi enzymatickými systémy prostřednictvím flavinových kofaktorů.

Reakční cyklus je možné rozdělit zhruba do osmi kroků (Obr. 2)¹⁸.

První reakcí je navázání substrátu, při kterém dochází ke konformačním změnám v molekule enzymu. Tyto změny hrají podstatnou roli v reakčním mechanismu a to jak při navazování kyslíku tak i v redukčních pochodech.

Dalším krokem je přenos elektronu z NADPH na Fe³⁺ uskutečněný pomocí NPR. Teprve po této redukci může kationt železa navázat kyslík. V dalším stupni katalytického cyklu přechází

vzniklý komplex P450-O₂-substrát autooxidační reakcí na ferri-superoxidový komplex, jehož poměrně vysoká stabilita je částečně podmíněna přítomností navázaného substrátu.



Obr. 2 – Reakční cyklus cytochromu P450 (převzato z ¹⁹⁾)

Následkem druhé redukce atomu Fe³⁺ vzniká ferro-superoxidový komplex. Vazba v molekule kyslíku se stává natolik oslabenou, že dochází k odtržení jednoho z jejích atomů a ke vzniku molekuly vody. Tento krok je považován za finální v tzv. aktivační fázi reakčního cyklu.

Dále už jen dochází k tvorbě produktu. Tato fáze je doposud nejméně prozkoumána. Atom železa se zbylým kyslíkovým atomem, tzv. ferrioxenový komplex, je po reakci s radikálem substrátu přeměněn za vzniku hydroxylovaného produktu a volného cytochromu P450¹⁸.

1.3.1.4. Nomenklatura cytochromů P450

Protože se jedná o velice širokou skupinu enzymů, kódovanou více než 4000 geny, bylo nezbytné zavedení systematického třídění. Tato nomenklatura spočívá v přerozdělení jednotlivých forem, tzv. izoenzymů, podle primární struktury proteinové molekuly (pořadí aminokyselin). Cytochromy P450, zkráceně označované jako CYP, se tímto dělí do rodin a

podrodin²⁰. Pro označení rodiny P450 se používá číslice za zkratkou CYP (CYP1), poté následuje velké písmeno jako označení podrodiny (CYP1A). Poslední číslo pak označuje konkrétní cytochrom (CYP1A2).

1.3.1.5. Cytochromy P450 aktivující prokarcinogeny a protoxikanty

Cytochromy P450, jako jedny z nejdůležitějších metabolických enzymů, hrají podstatnou roli v metabolismu cizorodých látek. Znalost, které izoenzymy se podílejí na metabolismu konkrétních xenobiotik je v dnešní době téměř nepostradatelná.

Cytochromy P450 mohou mimo jiné katalyzovat reakce aktivační. Pak o zmíněných cizorodých látkách mluvíme jako o prokarcinogenech a protoxikantech. Za nejvýznamnější ve smyslu metabolismu cizorodých látek lze považovat izoenzymy CYP1A2, 2A6, 2D6, 2C (2C8, 2C9, 2C18) 2E1 a 3A4. Z nich pak nejdůležitější roli při aktivačních reakcích hrají CYP1A1, 1A2, 2E1 a 3A4⁸.

Důležité, ovšem těžce popsatelné, je množství cytochromů P450 v lidských tkáních. Podstatnou roli zde hraje dědičná dispozice (genetický polymorfismus) a také působení vnějších podmínek¹³. Odlišné zastoupení jednotlivých forem cytochromů P450 v lidských tkáních u různých jedinců tak může být způsobeno induktory, jako například alkoholem, kouřením nebo některými léky.

1.3.2. Peroxidasy

Peroxidasy jsou neméně významnou skupinou enzymů biotransformující celou řadu xenobiotik, nejčastěji látek ze skupiny fenolů a aromatických aminů. Jedná se o oxidoreduktasy, jejichž účinek spočívá v oxidaci substrátu prostřednictvím peroxidu vodíku²¹. Tyto enzymy se vyznačují poměrně nízkou specifitou pro daný substrát. Mimo již zmíněných fenolů či aminů mohou být vhodnými substráty rovněž látky anorganické. Peroxidasy hrají důležitou roli především v rostlinách, kde se hojně vyskytují. O něco méně jsou pak zastoupeny v živočišných tkáních a mikrobiálních buňkách.

Peroxidasy nejsou z těch enzymů, které katalyzují pouze určitý typ reakce. Mimo vlastní peroxidasové oxidoredukce přeměňují substráty za katalýzy halogenace, dekarboxylace, oxygenace, demetylace a celé řady dalších reakcí.

1.3.2.1. Struktura peroxidas

Co se struktury týče, patří peroxidasy do skupiny hemoglykoproteinů. Prostetickou skupinou je tedy hem. Toto zařazení však není jednoznačné. U některých typů se vyskytuje atypický derivát hemu, u jiných dokonce chybí. V takovémto případě přejímá funkci atomu železa iont manganu nebo vanadu. Tato strukturní vlastnost je pak určující při rozdělení peroxidas na hemové, vanadové a ostatní²¹.

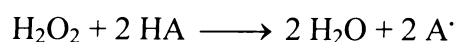
Z různých typů peroxidas mají největší procento zastoupení peroxidasy hemové. Jádro je tvořeno protoporphyrinem IX, stejně jako je tomu u cytochromů P450. Hem je v tomto případě vázán na apoprotein přes histidin, který je tak pátým ligandem atomu železa²¹.

Peroxidasy ve své molekule obsahují kromě proteinové části také část sacharidovou. Cukerná složka je na aminokyseliny vázána prostřednictvím glykosidové vazby a může tvořit poměrně vysokou část molekuly enzymu. U některých typů tvoří až 30 % hmotnosti²².

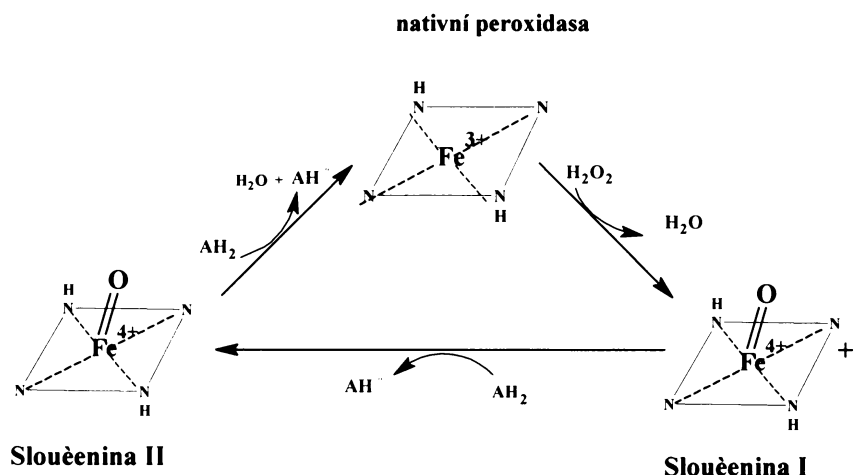
1.3.2.2. Katalytický cyklus peroxidas

Oxidační cyklus peroxidas (Obr. 3) probíhá ve dvou stupních vždy po jednom elektronu²¹. Tímto vznikají reaktivní radikály oxidovaných sloučenin, které mohou dále reagovat například s kyslíkem nebo jinými nízkomolekulárními látkami přítomnými v roztoku. V organismu pak mohou být radikálové produkty obzvlášť nebezpečné pro svou schopnost atakovat biologické makromolekuly včetně DNA¹.

Katalytický cyklus lze zapsat chemickou rovnicí následovně:



kde HA je výchozí substrát a A[·] je oxidovaný radikál substrátu.



Obr. 3 – Schéma reakčního cyklu peroxidasy

Typickou vlastností těchto enzymů je možnost vyskytovat se v několika oxidačních stavech²¹. Základní, nativní stav enzymu je v oxidačním stupni III. Prvním krokem při zahájení katalýzy je interakce peroxidu vodíku nebo jiného peroxidu s peroxidasou, čímž vzniká tzv. Sloučenina I (nebo sloučenina ES). V tomto komplexu je již vázaná molekula kyslíku a jeho oxidační stav je o dva stupně vyšší než je tomu u nativní formy. Z hlediska stability je atom železa Sloučeniny I ve ferrylové formě a zbylý oxidační ekvivalent se nachází ve struktuře hemu. V případě Sloučeniny ES je tento ekvivalent nesen některou z aminokyselin proteinové části molekuly.

Poté vstupuje do reakce substrát. Sloučenina I (nebo Sloučenina ES) je redukována jedním elektronem, přijatým od substrátu, a její celkový oxidační stav tímto klesá z V na IV. Dodaný elektron je spotřebován na vyrovnání náboje v porfyrinovém skeletu či aminokyselinovém zbytku. Vzniklý komplex je označován jako Sloučenina II. Z reakce je uvolněn radikál substrátu²¹.

V následující fázi přijímá Sloučenina II druhý elektron od další molekuly substrátu. Enzym se tak nachází v původním stavu a výsledkem je opět radikál molekuly substrátu²¹.

Sloučeniny I a II (případně ES) jsou charakteristické svou stabilitou. Rozpad Sloučeniny I proběhne obvykle během jedné minuty, zatímco stabilita Sloučenina II se pohybuje v rámci desítek minut.

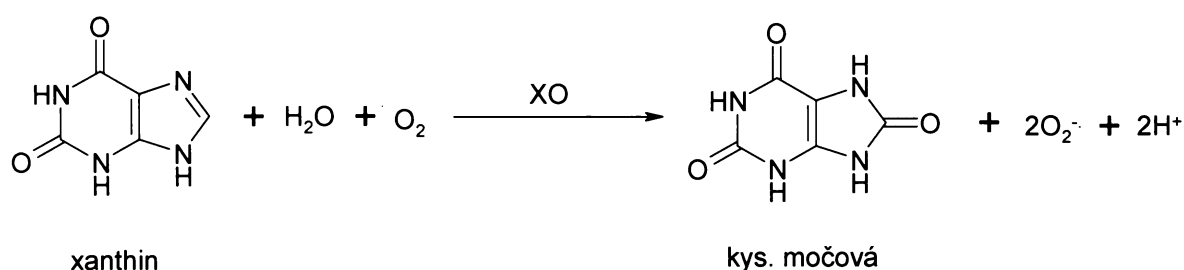
1.3.3. Reduktasy

Mimo oxidačních procesů mohou být cizorodé látky v organismu metabolizovány pochody redukčními. Protože se tak neděje v takové míře jako je tomu u metabolické oxidace, jsou takovéto enzymy, katalyzující redukční přeměny xenobiotik, doposud méně charakterizovány. Do této skupiny jsou řazeny například cytosolické reductasy xanthinoxidasa (XO) či NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (DT-diaforasa)^{9,23}.

1.3.3.1. Xanthinoxidasa

Xanthinoxidasa je enzym podílející se svými oxidoredukčními schopnostmi na odbourávání purinových bází. Mimo této funkce může také katalyzovat redukcí některých xenobiotik.²⁴ Enzym se skládá ze dvou identických podjednotek, z nichž každá obsahuje několik kofaktorů účastnících se oxidoredukčních pochodů. Jedná se o FAD, dvě Fe-S centra a molybdenový komplex, v němž přechází iont kovu z oxidovaného stavu (Mo^{VI}) na stav redukovaný (Mo^{IV})²⁵.

Role xanthinoxidasy v degračním procesu purinových bází spočívá v katalytické přeměně xanthinu na kyselinu močovou (Obr. 4) (xanthin vzniká deaminací guaninu). Děje se tak oxidační hydroxylací zmíněného substrátu na uhlíku C_8 ²⁴.



Obr. 4 – Přeměna xanthinu na kyselinu močovou působením xanthinoxidasy (převzato z²⁶)

Přeměna je uskutečněna nukleofilním atakem molekuly enzymu na uhlíkový atom a následným odnětím vodíku, který tímto reaguje s molybdenovým komplexem. Po redukcí molybdenového iontu z oxidačního stavu VI na IV je enzym pomocí molekuly vody ze substrátu uvolněn za vzniku kyseliny močové. Konečným akceptorem elektronu je molekula

kyslíku. Kromě regenerovaného enzymu tak vzniká peroxid vodíku, který je účinkem katalázy rozložen na vodu a kyslík²⁷.

Jestliže není během katalytické reakce přítomen kyslík (anaerobní podmínky), mohou být elektrony přeneseny i na jiné sloučeniny, například na aldehydy nebo aromatické nitro sloučeniny. Vzniklé redukované látky mohou být silně elektrofilní a napadat tak biologické makromolekuly²³.

1.3.3.2. NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa

NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (DT-diaforasa) je takéž (stejně jako XO) flavinovým cytosolickým enzymem. Jak vyplývá ze systematického názvu, katalyzuje přeměnu chinonů a chinoidních sloučenin na hydrochinony. Jedná se o dvouelektronovou redukci, při které nedochází ke vzniku nepříznivých semichinoidních forem. Jako donor elektronů tento enzym využívá NADH či NADPH. Aktivní centrum tvoří prostetická skupina FAD, u níž redoxní strukturu tvoří alloxazinový derivát²⁸.

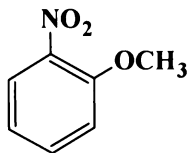
Mezi substráty NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy ovšem nemusí striktně patřit pouze látky chinoidního charakteru. Enzym účinně redukuje například nitro sloučeniny nebo jiné cizorodé látky²⁸. V takovémto případě může docházet ke vzniku reaktivních metabolitů s následkem toxického účinku na organismus.

1.4. *o*-Nitroanisol

o-Nitroanisol (2-metoxynitrobenzen, *o*-NA, obr.5) je hojně využívanou sloučeninou chemického průmyslu. Uplatňuje se při výrobě azobarviv, kde slouží primárně jako prekurzor v syntéze *o*-anisidinu²⁹. Protože jde o látku vysoce toxickou, představuje tímto určité riziko pro pracovníky barvářského průmyslu. Ti jsou působení *o*-NA často vystavováni.

Přímou expozicí *o*-NA může docházet ke značnému poškození organismu. Jedná se o prokázaný živočišný karcinogen, jehož cílovým orgánem je močový měchýř, v menší míře také játra, slezina či ledviny²⁹. Kromě nádorového bujení se *o*-NA projevuje dalšími toxickými efekty. Způsobuje například anemii, jejíž příčinou je zvýšený rozpad erytrocytů.

Jiným nepříznivým účinkem je poškození kůže nebo poruchy dýchání. Pomocí Amesova testu bylo ovšem prokázáno, že látka jeví nevýrazné mutagenní účinky, podobně jako byla zjištěna i její snížená cytogenetická aktivita²⁹.



Obr.5 - Struktura *o*-nitroanisolu

o-Nitroanisol se pro svou potenciální karcinogenitu stal součástí mnoha výzkumů. Zájem o sloučeninu značně vzrostl po roce 1993, kdy v důsledku průmyslové nehody v SRN došlo k úniku *o*-NA s následkem regionálního znečištění.³⁰ U lidí vyskytujících se na místě havárie a vystavených *o*-NA bylo do určité míry zaznamenáno poškození genetické informace. Po třech měsících byly genetické testy exponovaných osob opět v normálu díky opravě poškozené DNA.

Dá se říci, že molekulární mechanismus karcinogenního působení *o*-NA je již prozkoumán^{31,32}. Protože se sloučenina sama o sobě nejeví jako reaktivní, byla předmětem výzkumu její možná aktivace enzymatickými systémy. Klíčovou roli zde hrají cytochromy P450 a cytosolické reduktasy. Prokázalo se, že *o*-NA podstupuje v organismu dráhu jak aktivační, tak detoxikační.

1.4.1. Metabolická přeměna *o*-NA zprostředkovaná cytochromy P450

Při pokusech *in vitro* s cytochromy P450, tedy s hlavními enzymy biotransformace, byla prokázána dráha *o*-NA ve směru detoxikace³¹. Výsledná inkubační směs s DNA nevykazovala přítomnost DNA aduktů. Látka podléhá oxidativnímu metabolismu, konkrétně podstupuje *O*-demetylací za vzniku 2-nitrofenolu jako hlavního metabolitu. Zmíněný produkt je dostatečně hydrofilní a vstupuje tímto do reakcí II. fáze biotransformace. Po následné konjugaci s kyselinou glukuronovou je snadno vyloučen z organismu. Kromě 2-nitrofenolu byly ve výsledné inkubační směsi detekovány minoritní metabolity *o*-nitroanisolové oxidační dráhy. Tyto intermediáty byly identifikovány jako dihydroxyderiváty *o*-NA, vzniklé další oxidací 2-

nitrofenolu cytochromy P450. Tuto oxidativní dráhu lze v organismu považovat za majoritní³¹.

Důležité je také objasnění, které izoformy cytochromů P450 se na demetylaci podílejí. Za nejefektivnější je považován CYP2E1³¹. Vysoký podíl této izoformy na detoxikaci *o*-NA je dán hlavně jejím vysokým obsahem v játrech³³. Poté následují izoformy CYP1A1 a CYP2B6³¹. Ty jsou sice velmi účinné, avšak při detoxikaci této látky nehrají tak významnou roli jako CYP2E1. Vysvětlení opět vyplývá ze zastoupení v jaterní tkáni, které není u zmíněných izoform tak markantní.

Jedním ze záměrů studie molekulárního působení *o*-NA bylo bezesporu nalezení možné analogie mezi lidským a zvířecím organismem ve smyslu detoxikace *o*-NA. Zjištění, které poukazuje na tvorbu 2-nitrofenolu jako hlavního metabolitu *o*-nitroanisolu jak u hlodavčích mikrosomálních vzorků, tak i u vzorků lidské hepatální tkáně³¹, je potěšující a přispívá tak k možnosti vytvoření predikčního modelu.

1.4.2. Metabolická přeměna *o*-NA zprostředkovaná reduktasami

o-Nitroanisol je v organismu také redukován a to konkrétně na nitro skupině. Tato metabolická cesta se prokázala být jako aktivační³². Při redukci dochází k tvorbě reaktivního meziprojektu, N-(2-metoxifenyl)hydroxylaminu (HNOHA), jehož vznik je podmíněn přítomností cytosolických reduktas³⁴. Uvedený intermediát je nepřímo zodpovědný za modifikaci DNA³². Ultimálním karcinogenem je až nitreniový iont, který je pro svou elektrofilní povahu vysoce reaktivní a tedy schopný vazby na endogenními substráty (DNA, proteiny)³⁵. Adukt s DNA byly nejprve prokázány ve studiích *in vitro*, teprve později se podařilo změny detekovat také *in vivo* u hlodavců, konkrétně u potkanů. Po expozici potkanů *o*-nitroanisolem bylo nalezeno určité množství modifikované DNA v cílovém orgánu *o*-NA, tedy v močovém měchýři³². Vzhledem k tomu, že DNA adukty vzniklé v experimentech *in vivo* jsou stejné jako DNA adukty v *in vitro* experimentech (za přítomnosti reduktas), lze se domnívat, že reduktasy aktivují *o*-NA v modelovém organismu.

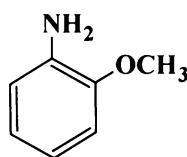
Hlavními aktéry této sekundární metabolické dráhy jsou již zmíněné reduktasy, prvořadě je třeba uvést xantin oxidasu, dále pak DT-diaphorasu, či aldehyd oxidasu. Reaktivní HNOHA podléhá snadno dalším reakcím, například esterifikačním³⁵. Ty jsou katalyzovány prostřednictvím enzymů N,O-acetyltransferasy nebo sulfotransferasy. Takto vzniklé estery (N-acetoxarylamin nebo N-sulfonoxarylamin) mohou být hydrolyzovány právě za tvorby

reaktivního nitreniového iontu. Tato skutečnost zároveň poukazuje na myšlenku, proč *o*-NA efektivně poškozuje močový měchýř a ne například játra, kde dochází k jeho aktivaci. Jak již bylo řečeno, z HNOHA se po proběhlé esterifikaci stává konjugát velice nestabilní, který se ve vhodném prostředí snadno rozpadá na reaktivní nitreniový iont³⁵. Podmínky pro tento rozpad jsou obzvlášť vhodné v močovém měchýři, kde je nižší pH než v okolních tkáních.

Další možným osudem HNOHA je redukce na 2-metoxyanilin (*o*-anisidin)³⁴ (zabývá se jím následující kapitola), který by mohl být považován za minoritní metabolit *o*-NA. Je vysoce pravděpodobné, že při vyšším obsahu *o*-NA v organismu bude oxidativní demetylační cesta nasycena a tato aktivační dráha se vznikem *o*-anisidinu bude mít efektivnější průběh.

1.5. *o*-Anisidin

o-Anisidin (2-metoxyanilin, *o*-A, obr.6) je látkou vznikající redukcí *o*-nitroanisol. I ona je pro své vlastnosti, podobně jako *o*-NA, využívána v barvářském průmyslu. Již je registrováno několik desítek barev a pigmentů, které je prostřednictvím této látky možné připravit^{36,37}. Ty jsou pak dále spotřebovávány k barvení papíru nebo textilu. Tento aromatický amin se tak stává další látkou, která může ohrožovat lidské zdraví. Riziku jsou obzvlášť vystaveni pracovníci barvářského průmyslu. Je zde ale i možnost uvolňování *o*-A z textilu nebo jiného materiálu barveného touto látkou. Mimo to byla jeho přítomnost prokázána v cigaretovém kouři. Riziko *o*-A expozice je tedy poměrně široké a o *o*-A lze rovněž hovořit jako o environmentálním polutantu.



Obr.6 - Struktura *o*-anisidinu

o-Anisidin je, stejně jako *o*-nitroanisol, považován za zvířecí karcinogen močového měchýře^{37,38}. Tento efekt je natolik silný, že Národní institut pro rakovinu USA řadí *o*-A mezi

nejúčinnější látku tohoto druhu³⁸. V menší míře může poškozovat také ledviny, játra nebo slezinu. Mimo karcinogeny byly prokázány i další nepříznivé účinky, mezi které patří poškození hemoglobinu nebo nefrotoxicita^{37,38}.

U *o*-anisidinu byla rovněž prozkoumána podstata rakovinného působení^{39,40}. Jedná se o genotoxický mechanismus, při kterém dochází ke kovalentnímu navázání karcinogenu a následné modifikaci DNA. Protože jsou funkční skupiny *o*-A (amino a metoxy skupina) téměř nereaktivní, je zřejmé, že za neoplastické změny jsou zodpovědné metabolity této látky. Tyto intermediáty, které jsou v případě *o*-A velice reaktivní, vznikají působením oxidačních enzymatických systémů. Hlavní roli při tvorbě ultimálních karcinogenů hrají oxidační reakce peroxidasy a cytochromů P450^{39,40}.

1.5.1. Metabolická přeměna *o*-A zprostředkovaná peroxidasami

Peroxidasy jsou extrahepatální enzymy, pro které amino skupina *o*-A představuje vhodný substrát jejich katalytického působení. Protože u většiny látek vystavených peroxidasám dochází jejich prostřednictvím k tvorbě reaktivních sloučenin, bylo předpokládáno, že tomu bude podobně i v případě *o*-anisidinu.

Amino skupina je peroxidasami oxidována mechanismem typickým pro tyto enzymy, tedy jednoelektronově. Produktem takovéto reakce je radikál *o*-A, který vstupuje do dalších reakčních dějů a stává se tak primárním metabolitem této aktivační dráhy³⁹. Zapojení *o*-A radikálů do vzájemných reakcí dává vznik několika metabolitům. Byly identifikovány jako diimin a chinonimin *o*-A, azodimer a produkt se třemi benzenovými jádry, jehož struktura není přesně určena³⁹. Z těchto je pak za poškození genetické informace zodpovědný diimin *o*-anisidinu³⁹. Ostatní a tedy vedlejší intermediáty jsou stále a nejsou považovány za ultimální karcinogeny vzniku rakoviny močového měchýře.

Je více než pravděpodobné, že peroxidasy hrají při biotransformaci *o*-A podstatnou roli. Svědčí o tom fakt, že se hojně vyskytují v močovém měchýři, který je cílovým orgánem rakovinného působení tohoto karcinogenu. Mezi dominantní je v tomto orgánu považováno působení prostaglandin H synthasy a laktoperoxidasy. Reaktivní diimin tak vzniká přímo v močovém měchýři, kde také dojde k jeho kovalentnímu navázání na DNA³⁹. Do procesu karcinogeneze zde ovšem také zasahují vznikající volné radikály, které, jak již bylo řečeno, jsou velmi reaktivní a snadno napadají biologické makromolekuly³⁹. Rakovinný účinek je pak několikanásobně umocněn.

Vznik intermediátů zodpovědných za poškození DNA prostřednictvím zmíněných savčích peroxidas byl prokázán metodou *in vitro*³⁹. Avšak identifikace vznikajících DNA aduktů byla zpočátku znemožněna komplexní modifikací DNA, ke které tak dochází při umocněném karcinogenním zásahu peroxidasami. Terčem pro vznik aduktů v molekule DNA je deoxyguanosin³⁹.

1.5.2. Metabolická přeměna *o*-A zprostředkovaná cytochromy P450

Krom peroxidas je *o*-A v organismu přeměňován jaterním enzymovým systémem cytochromů P450. Při této metabolické dráze byla předpokládána podobnost spolu s *o*-NA, který se tímto detoxikuje. U *o*-A však detoxikační cesta, při které dochází k demetylací methoxy skupiny prokázána nebyla⁴⁰. V tomto případě není oxidována zmíněná methoxy skupina (jako v případě *o*-nitroanisolu) ale skupina aminová.

Po aktivaci *o*-A lidskými jaterními hepatocyty (tedy cytochromy P450) vzniká N-(2-metoxyfenyl)hydroxylamin⁴⁰. Děje se tak oxidační hydroxylací na amino skupině. Stejný intermediát byl identifikován i v případě biotransformace *o*-NA (kapitola 1.4.2.), kde ovšem vzniká redukcí nitro skupiny enzymem xanthinoxidasou³².

DNA adukty vzniklé působením *o*-anisidinu po aktivaci cytochromy P450 byly prokázané *in vitro*⁴⁰. I v tomto případě se jednalo o modifikaci deoxyguanosinu. DNA adukty vzniklé aktivací *o*-A jaterními mikrosomy (*in vitro*) byly shodné spolu s DNA adukty v močovém měchýři izolovaném ze zvířete vystaveného tomuto karcinogenu (*in vivo*). Rakovinový účinek byl tímto prokázán rovněž *in vivo*⁴⁰.

Totožnost zmíněných *o*-A DNA aduktů byla nalezena i s DNA adukty vzniklými po aktivaci *o*-NA cytosolovými reduktasami⁴⁰. To je nepopíratelný důkaz toho, že je v případě obou karcinogenů modifikace DNA zprostředkována shodným intermediátem, tedy N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminem. Pak je zároveň totožný i mechanismus vzniku karcinogeneze. HNOHA je konjugován s acetátem nebo sulfátem. Tento komplex je však nestabilní. V močovém měchýři se rozpadá za vzniku nitreniového iontu, který se poté kovalentně váže na DNA³⁵. *o*-Anisidin je však karcinogenem, ve srovnání s *o*-nitroanisolem, podstatně účinnějším³⁸. Vysvětlení vyplývá z detoxikační dráhy *o*-NA, způsobené cytochromy P450 a oslabující tímto rakovinový efekt této látky. U *o*-A je neoplastický účinek naopak znásoben peroxidasovou aktivací.

Co se týče izoforem cytochromu P450 podílejících se na *o*-anisidinové aktivaci, jedná se téměř o tytéž jako v případě *o*-nitroanisolu. Opět zde klíčovou roli hraje CYP2E1, poté CYP1A2, 2B6, 1A1 a 2A6⁴⁰. Účinnost i v tomto případě vyplývá z procentuelního zastoupení jednotlivých izoforem v jaterní tkáni³³.

Ačkoli je u *o*-anisidinu předpokládán stejný mechanismus vzniku karcinogenese (jako u redukce *o*-NA) zprostředkovaný reaktivním HNOHA, nepodařilo se doposud tento intermediát s přesností kvantifikovat⁴⁰.

2. Cíl práce:

Shrnutí (a návrh řešení) neobjasněných otázek ohledně metabolické přeměny *o*-NA a *o*-A.

Kapitolu mechanismu molekulárního působení karcinogenů *o*-NA a *o*-A doposud není možné uzavřít. Zatímco metabolická přeměna *o*-NA byla vyřešena, v případě *o*-A je nedořešena oxidace této látky cytochromy P450. Problém spočívá v detekci HNOHA vznikajícího touto metabolickou přeměnou. Intermediát byl identifikován, ovšem jeho kvantifikace je problematická⁴⁰.

Navíc *o*-A vzniká jako finální produkt redukce *o*-NA. Takže tato problematika přeměny *o*-A cytochromy P450 je důležitá i pro uzavření kapitoly mechanismu působení *o*-NA.

Daná práce byla vypracována za podpory grantu MSM 0021620808 a GAČR 303/05/2195.

3. Problematika detekce HNOHA v experimentech s CYP

HNOHA [N-(2-metoxyfenyl)hydroxylamin] je prokázaným reaktivním metabolitem biotransformace *o*-NA. Vzniká zde redukcí nitroskupiny účinkem cytosolické xantinoxidasy³⁴.

o-Anisidin, jakožto finální redukční metabolit *o*-nitroanisolu, je v organismu opětovně oxidován. HNOHA vzniká i u této sloučeniny, konkrétně hydroxylací na amino skupině. Přeměna je katalyzovaná monooxygenasovým systémem cytochromů P450⁴⁰.

Bylo prokázáno, že jak *o*-NA redukovaný xanthinoxidasou, tak *o*-A oxidovaný cytochromy P450 tvoří adukty s DNA. Tyto adukty jsou analogické. Předpokládá se tedy, že obě látky jsou těmito rozdílnými biotransformačními procesy přeměňovány na stejný ultimální karcinogen, který je za tvorbu DNA aduktů zodpovědný. Tímto stejným reaktivním intermediátem vznikajícím aktivací *o*-NA i *o*-A je pravděpodobně HNOHA⁴⁰. I přesto, že byl HNOHA vznikající redukcí *o*-NA identifikován bez potíží, u *o*-A tomu tak není. Intermediát se sice podařilo u této látky metodou hmotnostní spektrometrie identifikovat, ovšem jeho stanovení nelze pokládat za reprodukovatelné⁴⁰.

Cesta vzniku HNOHA je u obou sloučenin rozdílná. K jeho tvorbě je u *o*-NA zapotřebí funkční skupinu redukovat, u *o*-A naopak oxidovat. U *o*-NA se tak děje působením reduktas za anaerobních podmínek, zatímco k činnosti cytochromů P450 je naopak přítomnost molekulárního kyslíku nezbytná. To znamená, že na rozdíl od anaerobně katalyzované redukce *o*-NA je u *o*-A v reakční směsi vždy přítomen molekulární kyslík. Toto zjištění zřejmě ovlivňuje nestabilitu tvořícího se HNOHA a může tak hrát při jeho identifikaci klíčovou roli.

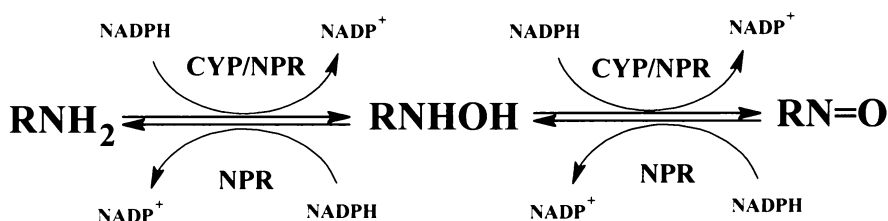
3.1. Analogické aromatické aminy

Jak již bylo řečeno, cytochromy P450 jsou enzymovým systémem se širokou substrátovou specifitou. Mezi substráty těchto monooxygenas patří mimo jiné skupina heterocyklických aromatických aminů (HAA)^{41,42}. Jedná se o látky vznikající pyrolitickými procesy. K jejich tvorbě pak může docházet například tepelnou úpravou potravin nebo kouřením tabáku⁴³. Podobně jako u *o*-anisidinu bylo zjištěno, že HAA jsou zodpovědné za vznik nádorových

onemocnění. Protože i zde probíhají aktivační reakce oxidací na amino skupině⁴¹, může být předpokládána jistá analogie vzniku karcinogenese spolu s *o*-anisidinem.

Součástí monooxygenasového systému cytochromů P450 je NADPH:P450 reduktasa, která zprostředkovává transport elektronů z NADPH na samotný cytochrom (kapitola 1.3.1.3.). V průběhu aktivačních reakcí HAA jaterními mikrosomy (konkrétně CYP1A2/NPR systémem) byla měřena kinetika spotřeby NADPH. Výsledky poukazují na neobvyklé schéma, během kterého bylo možné pozorovat zrychlení spotřeby NADPH. Děje se tak, protože NADPH je spotřebováno jak na oxidační působení CYP, tak na redukční působení NPR.

Jako možné vysvětlení procesu oxidace funkční amino skupiny HAA byl navržen redoxní cyklus (Obr. 7), během kterého se tvoří a zpětně redukuje heterocyklický nitroso produkt⁴⁴.



Obr. 7 – Navržený mechanismus redoxního cyklu HAA (převzato z⁴³)

HAA (RNH_2) je dle tohoto vzoru hydroxylován na RNHOH (hydroxylamin), který může být dodatečně oxidován na $\text{RN}=\text{O}$ (nitroso produkt) cytochromy P450 za spotřeby NADPH (kapitola 1.3.1.3.). Součástí tohoto cyklu je zároveň redukce nitroso sloučeniny až na původní HAA a to působením samotné NPR. Tímto se může oxidační proces stále opakovat až do spotřebování NADPH⁴⁴.

Teoreticky by takto navržený redoxní cyklus mohl probíhat obdobným mechanismem také u *o*-anisidinu. To by mohlo znamenat vysvětlení nestability a obtížné kvantifikace HNOHA vznikající přeměnou *o*-A.

4. Návrh řešení problému detekce HNOHA

HNOHA, jakožto pravděpodobný intermediát zodpovědný za karcinogenní vlastnosti *o*-anisidinu, byl identifikován, ovšem stále zůstává problém kvantitativního stanovení této látky⁴⁰. Metoda HPLC, která byla použita k detekci HNOHA se tedy ukázala být jako nevyhovující. Proto je snaha nalézt jiné postupy stanovení tohoto reaktivního intermediátu, které by tímto vyřešily dosavadní problém a pomohli tak uzavřít kapitolu molekulárního působení *o*-A.

4.1. Měření spotřeby NADPH

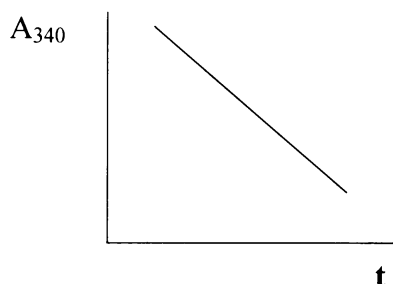
Jedním z návrhů možného řešení detekce HNOHA je ověření, zda v případě *o*-anisidinu neprobíhá na amino skupině redoxní cyklus stejným mechanismem jako je tomu u HAA, tedy dle obrázku č. 7 (kapitola 3.1.). Protože se jedná o reakční analogii mezi uvedenými sloučeninami katalyzovanou systémem CYP/NPR, je pravděpodobné, že se i v případě *o*-anisidinu bude amino skupina oxidovat přes hydroxylamin (RNHOH) až na nitroso produkt (RN=O). To by mohlo být možnou příčinou nestability intermediátu s následkem jeho špatné detekce.

Tuto skutečnost je možné ověřit měřením spotřeby NADPH během *o*-anisidinové aktivace jaterními mikrosomy. Koenzym NADPH, jakožto redukovaná forma, má výrazné absorpční maximum při 340 nm. Tohoto faktu je s výhodou využíváno pro sledování enzymových reakcí, kterých se tyto nikotinamidové koenzymy účastní⁴⁵. Pomocí spektrofotometrie není tedy problém v průběhu hydroxylace *o*-anisidinu (zprostředkované jaterními mikrosomy) stanovit úbytek NADPH. Výsledkem takového měření je časová závislost absorbance NADPH (Obr. 8a, 8b), jejíž charakter vypovídá o průběhu oxidačních reakcí na amino skupině.

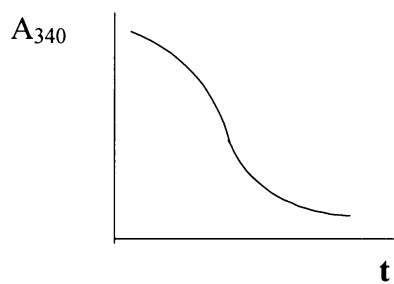
Jestliže nebude docházet k redoxnímu cyklu na amino skupině (tedy k oxidaci HNOHA na nitroso sloučeninu a následné redukci až na původní *o*-A), bude mít spotřeba NADPH lineární průběh a během reakce bude zaznamenána křivka dle Obr. 8a.

Jiné oxidační schéma by bylo možné připustit tehdy, když se bude jednat o spotřebu NADPH znázorněnou na obrázku 8b. Zde je během aktivace patrný nárůst spotřeby koenzymu, což je možné vysvětlit ještě další oxidací HNOHA až na nitroso produkt a jeho opětovnou redukcí

na původní *o*-anisidin. To vede ke spotřebování více NADPH s následkem sigmoidálního poklesu jeho absorbance (zrychlení spotřeby NADPH s časem).



*Obr. 8a – Oxidace NADPH systémem CYP/NPR v přítomnosti *o*-A, aniž by docházelo k tvorbě nitroso produktu.*



*Obr. 8b – Oxidace NADPH systémem CYP/NPR v přítomnosti *o*-A za současného vzniku nitroso produktu a následného redoxního cyklu dle Obr. 7 (kapitola 3.1.)*

4.2. Spektrofotometrie (kolorimetrie)

Problém detekce HNOHA, vznikajícího metabolickou aktivací *o*-anisidinu jaterními mikrosomy, je možné eliminovat také použitím kolorimetrické metody se spektrofotometrickou detekcí. Tento postup se zdá být výhodný oproti použité metodě HPLC. Hlavním důvodem je rychlost s jakou se vznikající HNOHA stanoví. Při HPLC stanovení trvá jedna analýza řádově desítky minut, zatímco spektroskopické stanovení je hotové během několika minut. Dále je možné provádět paralelně několik desítek stanovení, což při HPLC metodě není možné. Tímto přístupem se tedy lze vyhnout arteficiálním výsledkům způsobeným dlouhým skladováním (byť hluboce zmražených) vzorků před vlastní analýzou.

Princip metody spočívá v *in vitro* stanovení HNOHA kolorimetrickou redukcí železitých iontů za použití 4,7-difenyl-1,10-phenanholinu (DPF)⁴⁶. Při stanovení je využívána barevnost komplexu Fe^{2+} -DPF, který vzniká redukcí použitého Fe^{3+} -DPF a který je tímto možné stanovit spektrofotometricky při vlnové délce 535 nm. Množství vzniklého Fe^{2+} -DPF je tak přímo úměrné množství přítomného HNOHA v reakční směsi.

Tohoto postupu bylo již v minulosti využíváno při enzymatickém stanovení N-hydroxylace heterocyklických aminů⁴⁶. Jednotlivé reakční směsi obsahovaly proměnlivou koncentraci substrátu, který byl aktivován enzymovým systémem na požadovaný intermediát.

V práci Kim D. et al. (46) byl použit následující postup:

Reakční směs obsahovala 0,10 μM jaterních mikrosomů (obsahující CYP, NPR), směs tvořící NADPH (0,5 mM NADP^+ , 10 mM glukosy-6-fosfát a 1,0 IU glukosy-6-fosfát dehydrogenasy) a substrát (v proměnlivých koncentracích) v konečném objemu 0,50 ml 100 mM draselno-fosfátového pufru, pH 7,4. Směs byla inkubována při 37 °C po dobu 10 minut. Reakce byla ukončena přidavkem CH_2Cl_2 . Ten byl dále ze směsi extrahován, vysušen a následně rozpuštěn v 200 μl reakční směsi pro kolorimetrické stanovení, obsahující 40 mM acetátu sodného, 60 mM CH_3COOH , 20 % roztoku amyl-acetátu, 1mM 4,7-difenyl-1,10 phenanthrolinu a 0,4 mM FeCl_3 .

Kolorimetrická reakce byla ukončena po uplynutí tří minut přidavkem 10 μl 20 mM H_3PO_4 . Poté byla změřena absorbance výsledné směsi při 535 nm.

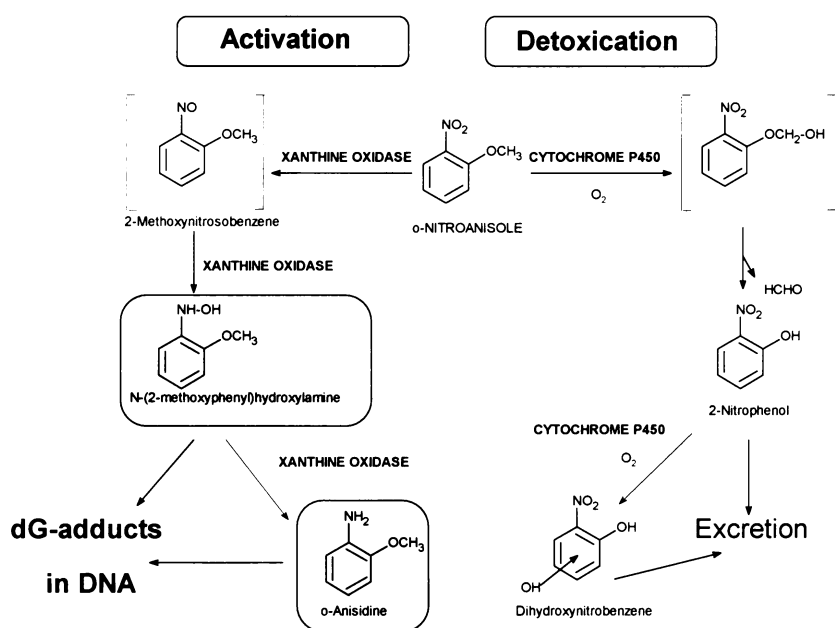
Během reakce jsou dva ekvivalenty Fe^{3+} redukovány jedním ekvivalentem N-hydroxylaminu⁴⁶.

5. Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá molekulárním působením *o*-NA a *o*-A, tedy látek, u kterých byly prokázány toxické účinky na organismus a jejichž metabolismus byl ve snaze vyvarování se těmto škodlivým efektům detailně prozkoumán. Protože sloučeniny neobsahují funkční skupiny, které by mohli způsobit narušení makromolekuly DNA (s následkem nekontrolovatelného množení buněčné tkáně), jsou hlavním předmětem zájmu enzymové systémy, které *o*-NA a *o*-A v organismu aktivují.

V případě *o*-NA probíhá aktivace redukcí nitro skupiny, způsobené činností cytosolických reduktas (xanthinoxidasy, NAD(P)H:chýnonoxidoreduktasy, Obr. 9) a vedoucí následně ke vzniku N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu. Z tohoto reaktivního intermediátu vzniká ultimální karcinogen, kterým je nitreniový iont³¹.

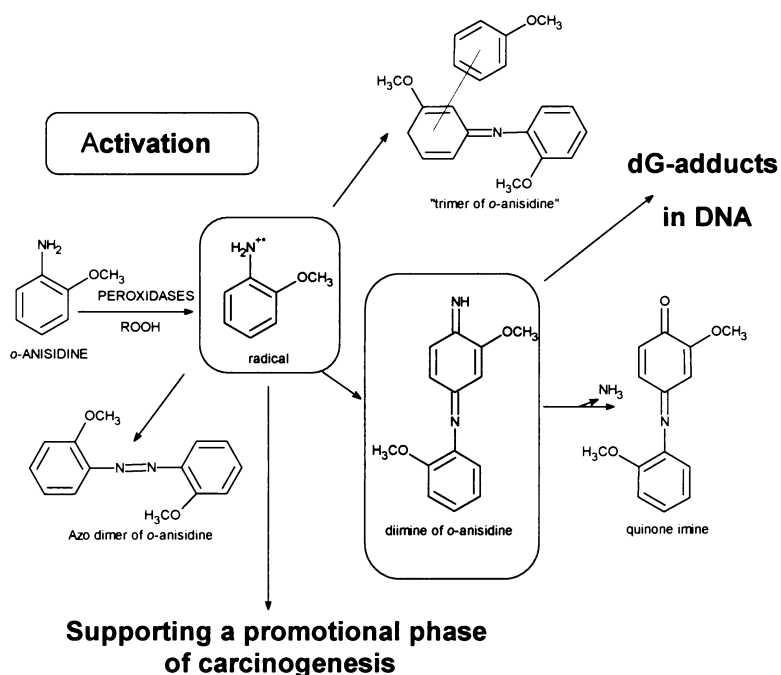
Na biotransformaci *o*-NA se mimo reduktas podílejí cytochromy P450 (Obr. 9). Dochází k oxidační reakci (vedoucí ke vzniku 2-nitrofenolu), která tak usnadňuje detoxikaci této látky³².



Obr. 9 - Metabolismus *o*-NA (převzato z ⁴⁷)

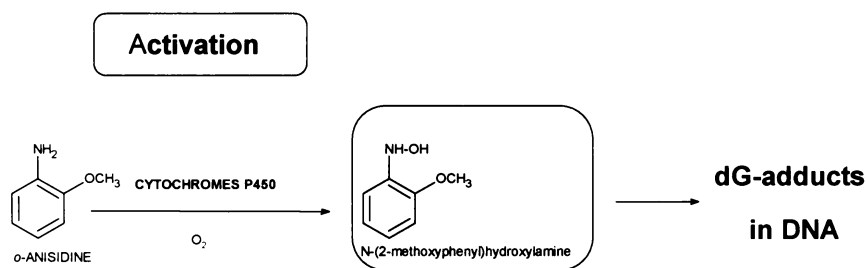
Aktivační reakce *o*-A jsou katalyzované peroxidasami a cytochromy P450. V prvním případě (působením peroxidas) vzniká reaktivní diimin, který následně interaguje s DNA

(Obr. 10). Mimo to do procesu karcinogeneze zasahují volné radikály vznikající účinkem těchto enzymů³⁹.



Obr. 10 - Oxidace o-A peroxidasami (převzato z⁴⁷)

Cytochromy P450 katalyzují během biotransformace o-A vznik N-(2-metoxyfenyl)hydroxylaminu (Obr. 11). Mechanismus karcinogeneze je zde shodný s o-NA aktivovaným reduktasami⁴⁰.



Obr. 11 – Oxidace o-A cytochromy P450 (převzato z⁴⁷)

Zatímco metabolická přeměna o-NA již byla uzavřena, v případě o-A je nedořešena oxidace o-A cytochromy P450. Problém spočívá v detekci vznikajícího HNOHA.

Tato práce předkládá možná řešení a vysvětlení problematické detekce HNOHA vznikajícího aktivací *o*-A cytochromy P450.

Jednou z možností je ověření, zda neprobíhá na amino skupině *o*-A (aktivovaném jaterními mikrosomy) redoxní cyklus, jehož součástí je vznik nitroso produktu s následnou redukcí přes N-hydroxylamin na původní *o*-A. To je možné uskutečnit měřením spotřeby NADPH, které se v průběhu reakcí spotřebovává. Potvrzení tohoto redoxního cyklu by mohlo vysvětlit problémy související s kvantitativním stanovením *o*-A.

Druhým návrhem řešení problému detekce HNOHA je použití spektrofotometrie namísto původní HPLC. Metoda je výhodná hlavně pro svou časovou nenáročnost.

6. Seznam použité literatury

1. Stiborová M., Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce karcenostatik nové generace, Doktorská disertační práce (pro DrSc), PřF UK (Praha) a SAV (Bratislava), (2004)
2. International Agency for Research in Cancer (IARC), Diesel and Gazoline *Engine* Exhausts and Some Nitroarenes, No. 46, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Lyon, (1989)
3. Stiborová M., Martínek V., Rýdlová H., Hodek P., Frei E.: Sudan I is a potential carcinogen for humans: Evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant cytochrome P450 1A1 and liver microsomes, *Cancer Res.* **62**, 5678 (2002)
4. Purohit V., and Basu A.: Mutagenicity of nitroaromatic compounds, *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 673 (2000)
5. Klener P.: Protinádorová chemoterapie, Galén, Praha (1996)
6. Stiborová M., Mikšanová M.: Molekulární mechanismus kancerogeneze, *Živa*, **4**, 146 (1999)
7. Balíková M.: Forenzní a klinická toxikologie, Galén, Praha (2004)
8. Stiborová M., Hudeček J., Hodek P., Frei E.: Význam cytochromů P450 pro lidské zdraví, *Chem, listy* **93**, 229 (1999)
9. Stiborová M.: Aromatické nitrosloučeniny: Kontaminanty životního prostředí a potenciální karcinogeny pro člověka, *Chem. Listy*, **96**, 784 (2002)
10. Spatzenegger M., Jaeger W.: Clinical importance of hepatic cytochrome P450 in drug metabolism, *Drug Metab. Rev.* **27**, 397 (1995)
11. Hudeček J.: Hemoproteiny a metaloproteiny, přednáška na PřF UK (2006)
12. <http://klouda.webpark.cz/bioch.htm>, staženo 28.4. (2007)
13. Anzenbacher P., Dawson J.H., Kitagawa T.: Towards a unified concept of oxygen activation by heme enzymes: the role of the proximal ligand, *J. Mol. Struct.* **214**, 149 (1989)
14. Anzenbacher P., Hudeček J., Stiborová M., Larroque C., Lange R., Heibel G., Hildebrandt P., v knize: *Cytochrome P-450. Biochemistry and Biophysics* (Archakov A. I., Bachmanova G. I., ed.), str. 1 INCO-TNC, Moscow (1992)
15. Hudeček J., Baumruk V., Anzenbacher P., Munro A.W.: Catalytically selfsufficient P450 CYP102 (cytochrome P450 BM3): resonance Raman spectral characterization of the heme domain and of the holoenzyme, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **243**, 811 (1998)

16. Omura T., Sato R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. evidence for its hemoprotein nature, *J Biol Chem.* **239**, 2370 (1964)
17. Chromá L., Macková M., Macek T., Martínek V., Stiborová M.: Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí, *Chem. Listy* **95**, 212 (2001)
18. Coon M.J., Ding X., Pernecky S.J., Vaz A.D.N.: Cytochrome P450: progress and predictions, *FASEB J.* **6**, 669 (1992)
19. Anderson J.L.R., Chapman S.K.: Ligand probes for heme proteins, *Dalton Trans* **1**, 13 (2005)
20. Nebert D.W., Nelson D.R., Adesnik M., Coon M.J., Esrabrook R.W., Gonzales F.J., Guengerich F.P., Gunsalus I.C., Johnson E.F., Kemper B., Levin W., Phillips J.R., Sato R., Waterman M.R.: The P450 superfamily – updated listing of all genes and recommended nomenclature for the chromosomal loci, *DNA* **8**, 1 (1989)
21. Stiborová M., Mikšanová M., Martínek V., Frei E.: Heme peroxidases: structure, function, mechanism and involvement in activation of carcinogens, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **65**, 297 (2000)
22. Stiborová M., Hudeček J., Páca J.J.R., Martínek V., Páca J.: Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí, *Chem. Listy* **98**, 876 (2004)
23. Fu P.P.: Metabolism of nitro-polycyclic aromatic hydrocarbons, *Drug Metab., Rev.* **22**, 209 (1990)
24. Pritsos C.A.: Cellular distribution, metabolism and regulation of the xanthine oxidoreductase enzyme system, *Chem.-Biol.Interact.* **129**, 195 (2002)
25. <http://us.expasy.org/> staženo 9.5. (2007)
26. <http://www.lf2.cuni.cz/Ustav/biochemie/vyuka/radikaly.doc>, staženo 13.5. (2007)
27. Voet D., Voetová J.G.: Biochemie, Victoria Publishing, (1995)
28. Segura-Aguilar J., Kaiser R., Lind C.: Separation and characterization of izoforms of DT-diaphorase from rat – liver cytosol, *Biochem. Biophys. Acta* **1120**, 33 (1992)
29. anonymous, Toxicology and Carcinogenesis. Studies of *o*-Nitroanisole, No. 416, NTP Technical Report, National Institute of Health, U.S. Department of Health and Human Services Bethesda, MD. (1993)
30. Traupe H., Menge G., Kandt I., and Karmaus W. :Higher frequency of atopic dermatitis and decrease in viral wattle aminy children exposed to chemicals liberated in a chemical accident in Frankfurt, Germany. *Dermatology* **195**, 112 (1997)

31. Mikšanová M., Šulc M., Rýdlová H., Schmeiser H.H., Frei E., Stiborová M.: Enzymes Involved in the Metabolism of the Carinogen 2-Nitroanisole: Evidence for Its Oxidative Detoxication by Human Cytochromes P450, *Chem. Res. Toxicol.*, **17**, 663 (2004)
32. Stiborová M., Mikšanová M., Smrček S., Bieler Ch.A., Breuer A., Klokow K.A., Schmeiser H.H., Frei E.: Identification of a genotoxic mechanism for 2-nitroanisole carcinogenicity and of its carcinogenic potential for humans, *Carcinogenesis* **25**, 833 (2004)
33. Rendic S., and DiCarlo F.J.: Humans cytochrome P450 enzymes: A status report summarizing their reactions, substrates, inducers, and inhibitors, *Drug Metab. Rev.* **29**, 413 (1997)
34. Mikšanová M., Novák P., Frei E., and Stiborová M.: Metabolism of carcinogenic 2-nitroanisole in rat, rabbit, porcine and human hepatic cytosol, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **69**, 589 (2004)
35. Kadlubar F. F., and Badawi A. F.: Genetic susceptibility and karcinogen DNA aduct formation in human urinary bladder carcinogenesis, *Toxicol Lett.*, **82**, 627 (1995)
36. Garner R.C., Martin C.N., Clayson D.B., Carcinogenic aromatic amines and related compounds, in: C.E. Searle (Ed.), *Chemical Carcinogens*, Vol. 1, 3rd Edition, ACS Monograph No. 182, American Chemical Society, Washington, DC, pp. 175 (1984)
37. National cancer Institute, Bioassay of *o*-anisidine hydrochloride for possible carcinogenicity, NTP Technical Report No. 89, National Cancer Institute, Bethesda, MD (1978)
38. IARC, *Ortho*- and *para*-anisidine and their hydrochlorides, in: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals and Humans, Vol. 27, pp. 63 (1982)
39. Stiborová M., Mikšanová M., Havlíček V., Schmeiser H.H., Frei E.: Mechanism of peroxidase-mediated oxidation of carcinogenic *o*-anisidine and its binding to DNA, *Mutaion Research* **500**, 49 (2002)
40. Stiborová M., Mikšanová M., Šulc M., Rýdlová H., Schmeiser H.H., Frei E.: Identification of a genotoxic mechanism for the carcinogenicity of the enironmental polutant and suspected human karcinogen *o*-anisidine, *Int. J. Cancer*: **116**, 667 (2005)
41. Butler M.A., Iwasaki M., Guengerich F.P. and Kadlubar F.F.: Human cytochrome P-450_{PA} (P-450IA2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 7696 (1989)

42. Shimada T., Iwasaki M., Martin M.V., and Guengerich F.P.: Human liver microsomal cytochrome P-450 enzymes involved in the bioactivation of procarcinogens detected by umu gene response in *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002, *Cancer Res.* **49**, 3218 (1989)
43. Sugimura T.: Mutagens, carcinogens, and tumor promoters in our daily food, *Cancer* **49**, 1970 (1982)
44. Kim D., Kadlubar F.F., Teitel C.H., and Guengerich F.P.: Formation and Reduction of Aryl and Heterocyclic Nitroso Compounds and Significance in the Flux of Hydroxylamines, *Chem. Res. Toxicol.* **17**, 529 (2004)
45. Kolektiv autorů, Biochemie-základní kurz, Univerzita Karlova, Karolinum, Praha (1999)
46. Kim D., Guengerich F.P.: Selection of human cytochrome P450 1A2 mutans with selectivity enhanced catalytic activity for heterocyclic amine N-hydroxylation, *Biochemistry* **43**, 981 (2004)
47. Mikšanová M.: Studie molekulárního mechanismu karcinogenity *o*-nitroanisolu a *o*-anidinu, Disertační práce Přf UK Praha, katedra biochemie, (2003)