

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie

Bakalářská práce

**Téma: Enzymová přeměna *o*-anisidinu a jeho
prekurzoru *o*-nitroanisolu**

*The enzymatic conversion of *o*-anisidine and its counterpart *o*-nitroanisole*

Zpracovala: Alexandra Kračmarová

Vedoucí práce: RNDr. Markéta Martínková Ph.D.

Praha 2009



Tato bakalářská práce vznikla za podpory výzkumného záměru MSM0021620808 a grantů Grantové agentury České republiky 303/09/0472 a 203/09/0812.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Markéty Martínkové Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze, dne 28.5.2009


.....

Alexandra Kračmarová

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Markétě Martínkové Ph.D. za trpělivost, udílení cenných rad a připomínek a též svým blízkým za podporu a optimismus.

OBSAH

- 1. Úvod do problematiky karcinogeneze**
 - 1.1. Enzymy významné pro metabolismus xenobiotik
 - 1.1.1. Peroxidasy
 - 1.1.2. Cytochromy P450
 - 1.1.3. Reduktasy
 - 1.1.3.1. Xanthin oxidasa
 - 1.1.3.2. DT- diaforasa
- 2. Cíl práce**
- 3. Shrnutí dosavadních poznatků o biotransformaci potenciálních lidských karcinogenů *o*-nitroanisolu a *o*-anisidinu**
 - 3.1. Aromatické dusíkaté sloučeniny
 - 3.1.1. *o*-Nitroanisol
 - 3.1.1.1. Metabolismus *o*-nitroanisolu cytochromy P450
 - 3.1.1.2. Metabolismus *o*-nitroanisolu reduktasami
 - 3.1.2. *o*-Anisidin
 - 3.1.2.1. Metabolismus *o*-anisidinu peroxidasami
 - 3.1.2.2. Metabolismus *o*-anisidinu cytochromy P450
 - 3.1.3. *o*-Aminofenol
- 4. Návrh řešení a vysvětlení neobjasněných otázek ohledně biotransformace *o*-nitroanisolu a *o*-anisidinu**
 - 4.1. Problematika detekce N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu při oxidaci *o*-anisidinu cytochromy P450
 - 4.1.1. Návrh řešení problematice detekce N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu - cyklická redoxní reakce heterocyklických aromatických aminů a její možná analogie s *o*-anisidinem
 - 4.1.2. Návrh řešení problematice detekce N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu - spektrofotometrické stanovení
- 5. Závěr**
- 6. Přehled použité literatury**

Seznam zkratek používaných v textu

APX	2-amino-3H-fenoxazin-3-on
dG	deoxyguanosin
e⁻	elektron
EPR	elektronová paramagnetická rezonance
ER	endoplazmatické retikulum
FAD	flavin adenin dinukleotid
FADH.	jednoelektronově redukovaný flavin adenin dinukleotid
FADH₂	zcela zredukovaný flavin adenin dinukleotid
FMN	flavin mononukleotid
FMNH.	jednoelektronově redukovaný flavin mononukleotid
FMNH₂	zcela zredukovaný flavin mononukleotid
HPLC	z angl. <i>high pressure or performance liquid chromatography</i> , vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HRP	křenová peroxidasa (z angl. <i>horseradish peroxidase</i>)
IQ	2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin
MFO	z angl. <i>mixed function oxidase</i> , monooxygenasa se smíšenou funkcí
NAD(P)H	nikotinamid adenin dinukleotid (fosfát)
NADP⁺	oxidovaná forma nikotinamid adenin dinukleotid fosfátu
NADPH: P450 reduktasa (NPR)	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát dependentní reduktasa cytochromu P450
NAD(P)H: chinon oxidoreduktasa (DT- diaforasa)	nikotinamid adenin dinukleotid fosfát dependentní oxidoreduktasa chinonu
NAT	N,O-acetyl transferasa
<i>o</i>-A	<i>ortho</i> -anisidin
O-demethylace	oxidační demethylace na atomu kyslíku
<i>o</i>-NA	<i>ortho</i> - nitroanisol
ox.	oxidace
P450	cytochromy P450
PAPS	(3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát)
PHS	prostaglandin H syntasa
red.	redukce
SULT	sulfotransferasa
XO	xanthin oxidasa

1. Úvod do problematiky karcinogeneze

Vznik nádorových onemocnění souhrnně nazýváme buď termínem karcinogeneze podle slova karcinom (z řeckého *carcinoma*, tj. maligní nádor) nebo kancerogeneze (dle anglického výrazu *cancer*, tj. rakovina, čili proces vyvolaný genetickými změnami v DNA). Tento proces závisí na mnoha faktorech, kupříkladu genetických, na životním prostředí, ve kterém se jedinec nachází či na jeho životosprávě¹.

Dalšími faktory, které mohou vyvolávat nádorové bujení jsou faktory fyzikální, mezi které řadíme působení záření, např. rentgenového, ultrafialového či kosmického, a dále mechanické či chemické působení různých částic při vdechování (azbest, berylium). Mezi biologické faktory řadíme působení onkovirů, které mohou postiženého jedince napadnout při jeho snížené imunitě, která může být způsobena stresem či změnou ve výbavě jeho reparačních mechanismů DNA. Třetím typem faktorů jsou faktory chemické, čili působení chemických látek a jejich metabolitů, které jsou schopné modifikovat genetickou informaci.

Chemické karcinogeny lze dělit do tří skupin. První skupinu nazýváme karcinogeny genotoxickými, jichž je většina, a jde o látky kovalentně se vážící na DNA, lze je prokázat metodou ³²P- postlabeling². Dále máme skupinu látek měnících strukturu DNA, které jsou schopny tvořit jedno či dvouřetězcové zlomy. Do této skupiny řadíme také tzv. cross-linking karcinogeny, které propojují různé části v rámci jedné DNA nebo více DNA navzájem. Třetí skupinu tvoří epigenetické karcinogeny, které s DNA tvoří nekovalentní vazby, nelze je prokázat metodou ³²P- postlabeling a jedná se především o planární molekuly- benzen či barvivo ethidiumbromid, čili interkalátory, které se vmezeřují do dvoušroubovicové struktury DNA¹.

Lipofilní látka, což je většina genotoxických karcinogenů, vstupuje do organismu prostou difúzí přes membrány. Aby mohla být eliminována z buněk a následně exkretována ven z organismu, musí být metabolizována na více polární látku. Biotransformací xenobiotika (cizorodé látky) může docházet k detoxikaci (v případě toxické látky) anebo také k její aktivaci, která může být pozitivní, v případě léčiva, které je jedinci podáváno nebo negativní, v případě, že se jedná např. o karcinogen.

Většina chemických látek, které jsou v organismu schopné vyvolat nádorové bujení, se tedy aktivují v organismu až po určité metabolické přeměně. Těmto látkám říkáme prokarcinogeny. Vlastní metabolickou přeměnou v organismu se chemická látka

aktivuje, z prokarcinogenu se stává proximální karcinogen. Teprve když se z proximálního karcinogenu stane ultimální karcinogen, je tento schopen modifikovat DNA bez přítomnosti enzymů. Vlivem pozměnění genetické informace vzniká tzv. iniciovaná buňka.

Proces karcinogeneze je multifázový, jednotlivé fáze označujeme jako iniciaci, promoci a progresi. Při iniciaci vzniká iniciovaná buňka čili buňka s pozměněnou genetickou informací z původní zdravé buňky, která však ještě nemusí sama o sobě znamenat rakovinné bujení, neboť může být zničena imunitním systémem organismu. Pokud není tato buňka zničena imunitním systémem, nastupuje promoční fáze, při které dochází ke zvýšené proliferaci primárně pozměněných buněk. Klíčovými faktory promoční fáze jsou aktivity enzymů proteinkinasy a fosfatasy. V této fázi vzniká benigní nádor, též zvaný preneoplazie¹. Promoční fáze může být konečná anebo pokračovat ve fázi progresní. V progresní fázi již dochází k procesům modifikace DNA a tvorbě maligních buněk, které tvoří nádor, označovaný též jako tumor nebo neoplasma (novotvar)¹, což se stane v případě, že dojde k selhání procesů regulujících růst a diferenciaci buněk. Zde již hovoříme o nádorovém bujení, nekontrolované proliferaci (z lat. *proliferatio*- bujení, novotvoření) buněk.

Maligní nádor epiteliálních buněk nazýváme karcinom, maligní nádor podpůrných buněk nebo pojivových tkání označujeme pojmem sarkom. Části maligního nádoru mohou metastazovat, tj. odštěpit se z mateřského maligního nádoru a pohybovat se v těle krevní nebo lymfatickou cestou¹.

Mezi enzymy, které aktivují prokarcinogeny na ultimální karcinogeny, řadíme mimo jiné oxidasy se smíšenou funkcí (MFO) - cytochromy P450, peroxidasy (laktoperoxidasa, prostaglandin H syntasa) a reduktasy (xanthin oxidasa, DT-diaforasa).

1.1. Enzymy významné pro metabolismus xenobiotik

Jak již bylo výše uvedeno, cizorodá látka lipofilní povahy se do organismu dostane celkem snadno prostou difúzí přes membrány, přičemž hrozí, že se může kumulovat v tukové tkáni. Organismus se proto snaží tuto látku přeměnit na více polární, aby mohla být vyloučena z organismu. Vzniklý hydrofilnější metabolit může

být méně toxický či úplně neškodný a může tedy dojít k jeho detoxikaci či se může naopak aktivovat a stát se zákeřnějším. V procesu detoxikace i aktivace (oba pojmy lze souhrnně označit jako proces biotransformace xenobiotika) hrají důležitou úlohu enzymy.

Biotransformace xenobiotik probíhá u živočichů ve dvou fázích. První fázi označujeme jako fázi derivatizační, při níž dochází ke vnášení polární skupiny na dané xenobiotikum či k demaskování polárních skupin, které již látka obsahuje. V této fázi hrají významnou úlohu monooxygenasy se smíšenou funkcí (*mixed function oxidases*, MFO), ke kterým patří např. cytochromy P450. Druhou fázi biotransformace nazýváme konjugační fází, dochází při ní ke konjugaci metabolitu vzniklého při derivatizační fázi s endogenní sloučeninou, přičemž se stává ještě více polárnější. Tato konjugace v praxi znamená, že se na funkční skupiny vzniklé při derivatizační fázi navážou malé hydrofilní molekuly (kyselina glukuronová, glycin, taurin, aktivní sulfát, glutathion, cystein, aktivní acetát)¹, usnadňující exkreci z organismu, která probíhá močí a žlučí.

Významným enzymem konjugační fáze biotransformace je glutathion-S-transferasa, která je schopna vázat reaktivní metabolity, zvláště epoxidy a katalyzovat jejich vazbu s glutathionem, a proto se považuje za významný enzym antikancerogenních procesů¹. γ -Glutamylový zbytek se odštěpí v ledvinách, glycylový v játrech, cysteylový zbytek je dále acetylován za vzniku kyseliny merkapturové, která již je vyloučena močí¹. Glutathion a cystein jsou považovány za tzv. „scavengery“ (z angl. *scavenge*, čistit, odstranit), cizorodých látek¹.

I ve druhé fázi biotransformace xenobiotika však může dojít k jeho aktivaci. Aktivace na toxičtější sloučeninu může proběhnout např. u konjugátů se sulfátem, které vznikají z N-hydroxylovaných aromatických aminů účinkem sulfottransferas, kdy sulfát musí být nejprve aktivován na PAPS (3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát) nebo účinkem N-acetyltransferas (jejichž kofaktorem je acetylkoenzym A)¹. Vlivem kyselého prostředí močového měchýře je konjugát sulfátu či acetátu s N-hydroxysloučeninami nestabilní, a proto se rozpadá za vzniku nitreniového či karbeniového iontu, což jsou elektrofilní reagující s DNA nebo proteiny¹.

1.1.1. Peroxidas

Peroxidas jsou enzymy se širokou substrátovou specifitou, účastníci se mnoha fyziologických dějů v organismech rostlinných i živočišných druhů. Jejich úlohou je redukce peroxidu vodíku nebo jiných peroxidů, přičemž oxidují radikálovým mechanismem (jednoelektronovou oxidací) další sloučeninu, např. xenobiotikum. Vzniklé radikály poté neenzymově (spontánně) reagují na další produkty. Společnou funkcí všech peroxidas je schopnost detoxikace peroxidu vodíku³. Některé z peroxidas se podílí na aktivaci prokarcinogenů, jelikož jejich primárními produkty jsou reaktivní volné radikály, reaktivní formy kyslíku a peroxidové radikály, které podmiňují vznik iniciační a promoční fáze karcinogeneze⁴. Většina peroxidas jsou hemoglykoproteiny obsahující ferriprotoporfyrin IX jako prostetickou skupinu⁴.

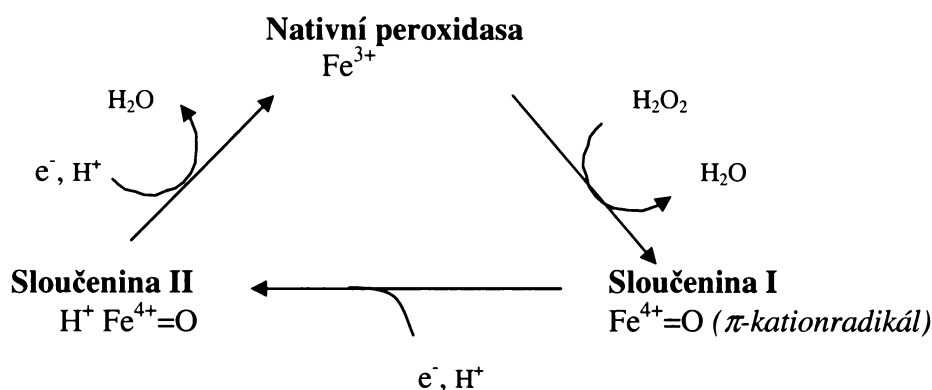
Hemové peroxidasy dělíme na rostlinnou a živočišnou superrodinu, rostlinnou superrodinu ještě dělíme na tři skupiny. První skupina jsou intracelulární prokaryotické peroxidasy, které neobsahují disulfidické můstky, např. cytochrom c peroxidasa. Další dvě skupiny naproti tomu obsahují disulfidické můstky, skupina druhá obsahuje intracelulární peroxidasy hub, třetí pak zahrnuje rostlinné sekretorické peroxidasy⁴.

Peroxidas savců jsou obsaženy zejména ve žlázách s vnitřní sekrecí, kostní dřeni, mozku, myelinových pochvách nervů (myeloperoxidasa), v buňkách štítné žlázy (jodoperoxidasa), v mléčných žlázách (laktoperoxidasa), v močovém měchýři a semenných váčcích (prostaglandin H syntasa). Zvláštností prostaglandin H syntasy (PHS) spočívá v tom, že si peroxid sama syntetizuje, přičemž substrátem je kyselina arachidonová, ze které vzniká cyklooxygenasovou reakcí organický endoperoxid (vnitřní peroxid). Rychlost cyklooxygenasové reakce PHS je úměrná spotřebě kyslíku, související s oxidací kyseliny arachidonové. V buňce jsou peroxidasy obsaženy především v cytoplazmě, v menší míře v membráně endoplazmatického retikula či Golgiho systému¹. Známe také extracelulární peroxidasy, ale ty se vyskytují především u rostlin.

Rostlinné peroxidasy (např. křenová peroxidasa) a peroxidasy hub obsahují hem b. K proteinu je hem b vázán slabou hydrofobní interakcí. Dalšími peroxidasami, které též obsahují hem b, jsou prostaglandin H syntasa a myeloperoxidasa. Peroxidas u savců obsahují hem l, který má na uhlících 1 a 5 na pyrrolových jádrech hydroxymethylovou skupinu⁴.

Nejdříve byla objasněna struktura cytochrom c peroxidasy. Peroxidasový protein se skládá ze dvou domén s odlišnou strukturou, které obalují hem. Protein obsahuje 10 až 11 alfa helixů, beta struktura se objevuje jen jako menšinová struktura. Hem obsahuje ion železa koordinovaný ke čtyřem pyrrolovým atomům dusíku. Představíme-li si hem jako rovinnou molekulu, pod touto rovinou je ion železa navíc koordinován k axiálnímu (proximálnímu) histidinu, jehož imidazolový zbytek interaguje silnou vodíkovou vazbou s aspartátem. Železo má díky těmto vazbám negativní redukční potenciál, a tím zajišťuje vysoký oxidační stav aktivních peroxidas⁴. Nad rovinou molekuly hemu je vytvořena hydrofilní kapsa pomocí distálního histidinu a distálního argininu, které tvoří místo, kde interaguje peroxidasa s peroxidem vodíku nebo organickým peroxidem. Distální histidin plní úlohu acidobazického katalyzátoru, zatímco distální arginin stabilizuje náboj⁴.

Peroxidasy se vyskytují v pěti oxidačních stavech, nyní však postačí nastínit pouze tři z nich (viz obr. 1, str.10, Oxidační stavy peroxidas)⁴. *Nativní peroxidasa* obsahuje hemové železo ve ferri formě (Fe^{3+}), jedná se o vysokospinový stav, kdy šestá koordinační pozice je volná. *Sloučenina I* vznikla oxidací nativní peroxidasy dvěma elektrony z peroxidu (z peroxidu vodíku vznikla redukce voda), tato sloučenina je nestabilní silné oxidační činidlo, obsahující oxyferrylový π -kation radikál ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$). U cytochrom c peroxidasy je kation radikál lokalizován na tryptofanu (na proximální straně), u prostaglandin H syntasy na tyrosylovém zbytku proximální strany hemu. *Sloučenina II* také obsahuje oxyferrylovou skupinu. Vznikla jednoelektronovou redukcí ze *Sloučeniny I* nebo jednoelektronovou oxidací nativního enzymu^{3,4}. *Nativní peroxidasa* opět vznikne ze *Sloučeniny II* dodáním dalšího substrátu (na obr. 1 znázorněno jako e^- , H^+), přičemž se odštěpí molekula vody.



Obr.1: Oxidační stavy peroxidasy

Pro hemové peroxidasy je typická schopnost heterolyticky štěpit peroxidové vazby, k čemuž dochází na distální straně hemu. Při štěpení peroxidových vazeb se aminokyselinové zbytky účastní acidobazických pochodů. Distální histidin je akceptorem protonu z peroxidu a distální arginin je stabilizátorem náboje⁴. Kyslík z peroxidu se navázal na ion železa za vzniku π -kation radikálu. Poté se z distálního histidinu odštěpil proton za vzniku vody a sloučeniny I. Ta se poté redukuje jedním elektronem na *Sloučeninu II*⁴.

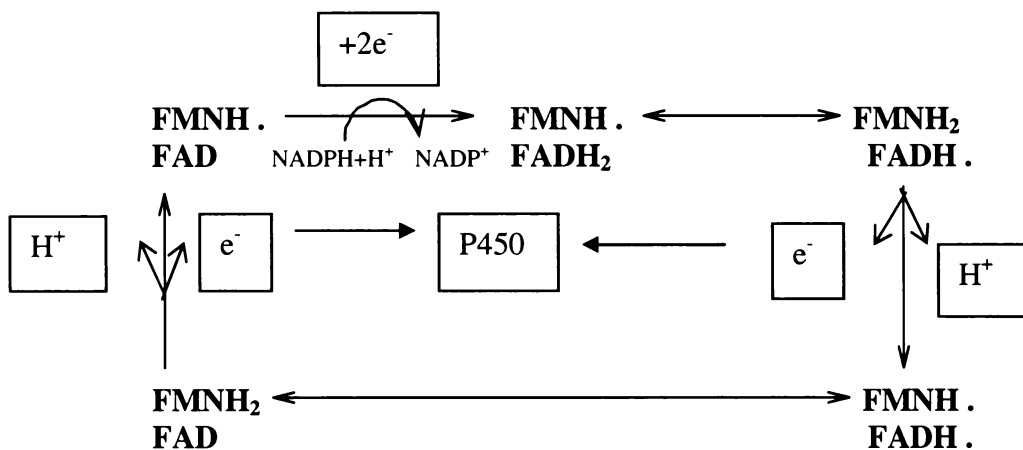
Jak již bylo zmíněno, peroxidasy mají schopnost aktivace některých prokarcinogenů na jejich ultimální formy, mechanismy této aktivace se však navzájem liší. Peroxidasy mohou substrát oxidovat přímo, vzniklý metabolit je pak schopen modifikovat nukleové kyseliny. Další mechanismus této aktivace je založen na tvorbě *Sloučeniny III*, vznikající reakcí nativního enzymu se superoxidovým anion radikálem ($\text{O}_2^{\cdot-}$) nebo při reakci redukované formy peroxidasy (ferro forma peroxidasy, obsahuje Fe^{2+}) s molekulárním kyslíkem³. Tato *Sloučenina III* je poté schopna oxidovat některé prokarcinogeny⁴. Třetí mechanismus souvisí s produkcí radikálů jako sekundárních metabolitů, které jsou zdrojem aktivních forem kyslíku, schopných oxidovat xenobiotikum⁴. Ve čtvrtém mechanismu dochází k oxidaci substrátu na radikál obsahující centrální atom uhlíku, který zachytí molekulární kyslík a vytvoří z něj peroxidový radikál, který též může aktivovat xenobiotikum.

1.1.2. Cytochromy P450

Cytochromy P450 (zkráceně P450) patří mezi klíčové enzymy metabolismu cizorodých látek⁵. Jedná se o hemové proteiny, které zařazujeme do skupiny monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO), vyskytujících se především v endoplazmatickém retikulu (ER) a v membráně mitochondrií. Cytochromy P450 jsou zodpovědné především za I. fázi biotransformace xenobiotik, katalyzují oxidační, peroxidační a redukční reakce léčiv, environmentálních chemikálií, endogenních či exogenních látek. Funkce cytochromů P450 tkví především v zabudování molekuly kyslíku na substrát, čímž se z látek lipofilního charakteru stávají látky polárnější.

Enzymatickou aktivitu v jaterních mikrosomech (mikrosomy vznikají homogenizací a následnou frakční centrifugací buněk, jsou to fragmenty ER) objevili Mueller a Miller v letech 1949 až 1953^{6,7,8}. V roce 1955 byla potvrzena existence enzymatického systému schopného přeměňovat různá xenobiotika v endoplazmatickém retikulu^{6,9,10}. Garfinkel s Klingenbergem v roce 1958 jako první zjistili, že v jaterních mikrosomech je přítomen pigment, který po redukcí vykazuje v komplexu s oxidem uhelnatým absorpční maximum při 450 nm^{6,11,12}. Název těchto enzymů zavedli Omura a Sato, kteří v roce 1964 dokázali hemoproteinovou podstatu tohoto pigmentu. Jméno vzniklo podle povahy vazby hemu na apoprotein (podobná u cytochromů typu b) a podle jeho absorpčního maxima v Soretově oblasti (390-490 nm) po jeho redukcí a interakci s oxidem uhelnatým^{6,13,14}.

MFO systém se vyskytuje u savců, ptáků, plazů, ryb, obojživelníků, koryšů, měkkýšů, červů, hmyzu, vyšších rostlin, kvasinek, plísní a bakterií⁶. V lidském těle se pak vyskytují především v játrech, v menší míře pak v plicích, ledvinách, tenkém střevě, kůži, mozku či nadledvinách. U vyšších organismů je lokalizován na membráně endoplazmatického retikula. Součástí MFO systému jsou cytochrom P450, NADPH: P450 reduktasa a poté fakultativně cytochrom b5 a cytochrom b5 reduktasa. Neméně významnou součástí MFO systému je i biologická membrána, na které je tento systém ukotven a membránové lipidy, které způsobují konformační změny cytochromu P450, zvyšují jeho afinitu k substrátu, stimulují tvorbu funkčně aktivního komplexu cytochrom P450-NADPH: P450 reduktasa a jsou zásobárnou uložených hydrofobních substrátů cytochromu P450¹.

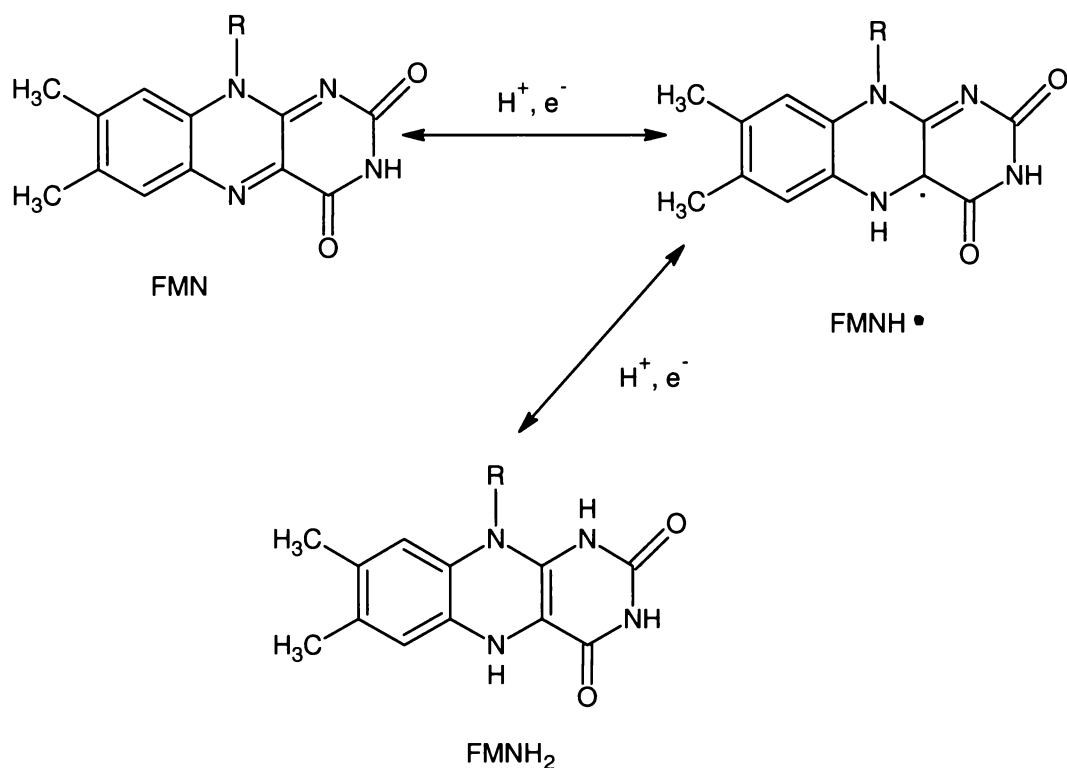


Obr. 2: Schéma přenosu elektronů v NADPH: P450 reduktase; FAD, FMN-koenzymy v základním stavu, FMNH. značí jednoelektronově redukovaný FMN (radikál, semi-forma), FADH. jednoelektronově redukovaný FAD (radikál, semi-forma), FADH₂ je zcela zredukováný FAD, FMNH₂ je zcela zredukováný FMN; oboustranná šipka značí mezomerní stavy.

Funkcí NADPH: P450 reduktasy je dodávat cytochromu P450 elektrony, které potřebuje pro aktivaci kyslíku. Tyto elektrony získává od NADPH. Lze říci, že funguje jako „dělič elektronového páru“. NADPH: P450 reduktasa je tvořena primární a sekundární strukturou aminokyselin a jako koenzymy obsahuje v každém řetězci po jedné molekule FAD a FMN. FAD (flavin adenin dinukleotid) se skládá z isoalloxazinového cyklu, D-ribitolu, trifosfátu, ribosy a adeninu, zatímco FMN (flavin mononukleotid) obsahuje jen isoalloxazinový cyklus, D-ribitol a monofosfát. Základní schéma fungování NADPH: P450 reduktasy je nastíněno na obr. 2.

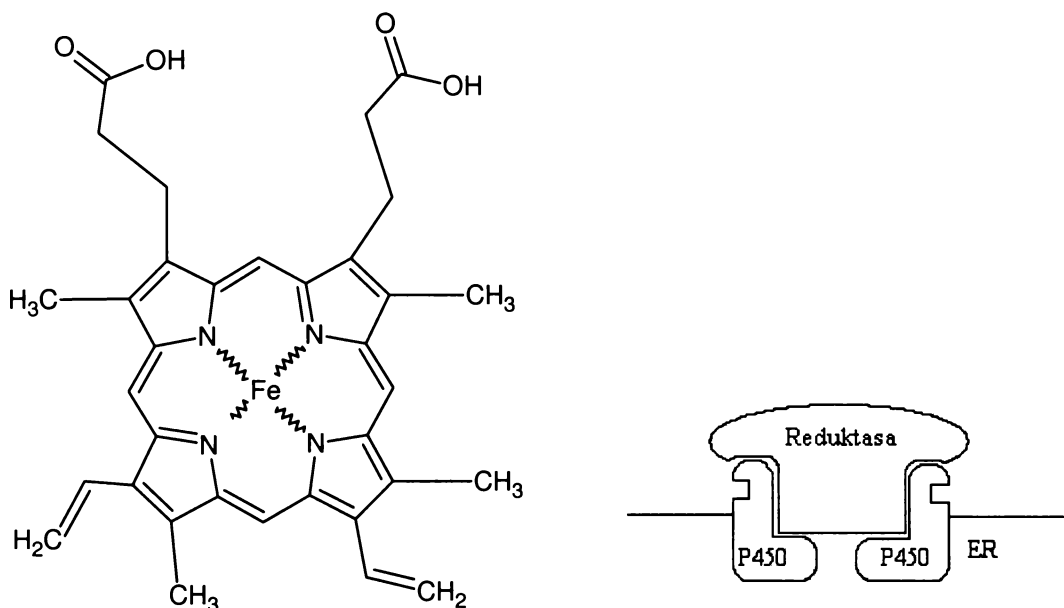
NADPH: P450 reduktasa funguje díky několika předpokladům. Redukovaný koenzym FADH₂ má redoxní potenciál blízký NADPH, což mu umožňuje od NADPH čerpat elektrony. Plně redukovaný FMN čili FMNH₂ má zase redoxní potenciál blízký cytochromu P450, díky čemuž mu může předat jeden elektron. A konečně redoxní potenciály FMN a FAD jsou obdobné, a proto si mohou předávat elektrony navzájem².

Na obr. 3, str. 13 je znázorněna postupná redukce FMN², z původního stavu FMN se redukcí jedním elektronem stává radikál, čili semi-forma. Druhou jednoelektronovou redukcí vzniká plně redukovaná forma, FADH₂. Obdobné je to u FAD.



Obr. 3: Postupná redukce FMN ve flavinové reduktase, FMNH \cdot je semichinonová forma, FMNH₂ je hydrochinonová forma

Cytochrom P450 je umístěn na vnější, cytosolární straně ER, kde tvoří hluboko zanořené shluky několika (6 až 8) molekul, což vystihuje tzv. agregační model (obr. 5, str.14)⁶. Cytochrom P450 reduktasa je zanořena do membrány jen asi svojí jednou desetinou molekuly⁶. Molekula enzymu cytochromu P450 se skládá z apoproteinové složky a prostetické skupiny. Prostetickou skupinu tvoří hem typu b obsahující atom železa ve svém centru porfyrinového skeletu (viz obr. 4, str. 14), navázaný koordinačně kovalentní vazbou atomu železa na sulfhydrylovou (-SH) skupinu cysteinu apoproteinu. Čtyři valence atomu železa jsou vázány dusíky tetrapyrrolového kruhu, pátá valence umožňuje spojení s apoproteinem a šestá valence železa je v oxidovaném stavu obsazena kyslíkem z vody, hydroxylové skupiny tyrosinu, serinu nebo karboxylové skupiny postranních řetězců jiných aminokyselin. V oxidovaném stavu má atom železa oxidační číslo +3. Apoproteinová složka cytochromu P450 je tvořena primární, sekundární a terciární strukturou, přičemž primární strukturu tvoří sled 490 až 520 aminokyselin a obsahuje oblasti vázající hem, reduktasu a substrát⁶.



Obr. 4(vlevo): Struktura hemu b (metaloporfyrin obsahující atom železa, obsahuje čtyři pyrrolové cykly propojené methinovými můstky)

Obr. 5(vpravo): Agregáčnı́ model, představa lokalizace MFO systému v endoplazmatickém retikulu⁶

Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují metabolickou aktivitu cytochromu P450. Zpravidla tyto faktory lze rozlišit na faktory vnitřní- druh, rod, čeleď, stáří, pohlaví, zdravotní stav či genetické predispozice organismu a na faktory vnější- potravní návyky či přítomnost cizorodých látek v organismu (tzv. induktorů P450)⁶. Roku 1976 byla potvrzena existence různých forem P450, v současnosti díky dokončení sekvenace lidského genomu je známo 57 izoforem lidského P450¹, krysa má nejméně 20 forem⁶.

Cytochrom P450 je z evolučního hlediska velmi starý hemoprotein. Z jednoho genu cytochromu P450 archebakterií z doby více než před 1,5 miliardami let se do současnosti vyvinulo velké množství odlišných genů kódujících cytochromy P450 prokaryot i eukaryot se značnými rozdíly v substrátové specifitě⁵. Jejich funkce v organismech se v průběhu evoluce měnila či se některé funkce přidružovaly. Předpokládá se, že prehistorické organismy využívaly cytochrom P450 k hydroxylaci organických látek, z nichž získávaly energii⁵. Další jejich funkcí byla biosyntéza mastných kyselin, u rostlin biosyntéza barviv květů, dále steroidních hormonů, vitamínů

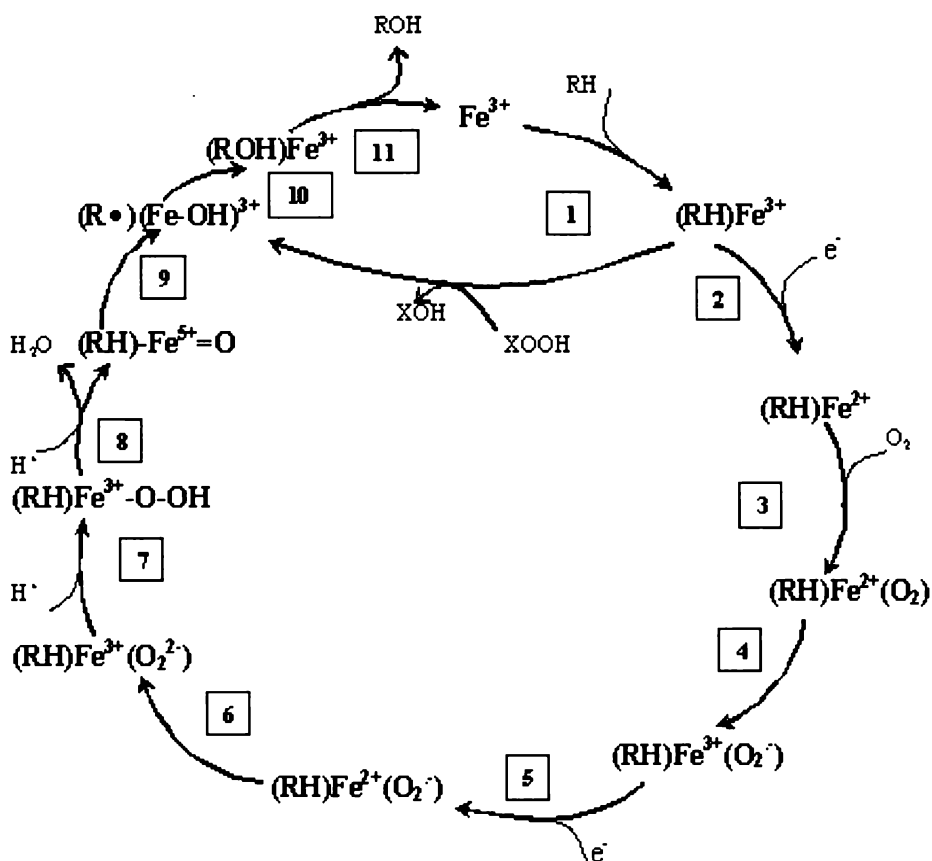
D či prostaglandinů⁵. Nově vzniklou funkcí cytochromů P450, která souvisí s vývojem živočišné říše, je proces detoxikace cizorodých látek. Jelikož se rostliny bránily predátorům pomocí různých fyto toxinů, musely se i organismy přizpůsobit, což se stalo množením jejich cytochromů P450, pomocí nichž organismy začaly rostlinné toxiny detoxikovat.

Nyní bude nastíněn reakční cyklus monooxygenasových reakcí. Monooxygenasová reakce představuje aktivaci molekulárního kyslíku a jeho zabudování do substrátu prostřednictvím systému P450⁶. Sumární rovnice obecné monooxygenasové reakce, kde RH je oxidovaný substrát:



Tato obecná rovnice však byla rozšířena o další reakce vyjadřující další možné aktivity MFO systémů, oxidasovou, peroxidasovou, peroxygenasovou (viz obr. 6, str. 16)^{5,6}. Jednotlivými kroky monooxygenasových reakcí jsou^{2,3,6}:

1. Vazba substrátu RH.
2. Přenos elektronu z NADPH: P450 reduktasy, redukce atomu železa z oxidačního čísla +3 na +2.
3. Navázání molekulárního kyslíku na hemové železo.
4. Přesun elektronu z železnatého kationtu na kyslík, vznik superoxidového anionradikálu O_2^- . Vznik ternárního komplexu ve ferrisuperoxidovém stavu, může existovat v mnoha mezomerních stavech.
5. Přenos elektronu z P450 reduktasy nebo cytochromu b5 (fakultativní složka MFO systému).
6. Vznik peroxidového aniontu O_2^{2-} (mezomerie), přesunem elektronu na superoxidový anionradikál se zregenerovalo železo do oxidačního stavu 3+ (ferriperoxoternární komplex). Konec *aktivační fáze*. Zde může dojít ke zvratu a tvorbě peroxidu vodíku, v případě, že substrát není v aktivním centru a není hydroxylován. (typická reakce pro P450 2E1, má mělké aktivní centrum).
7. Počátek *hydroxylační fáze*. Protonace, vznik hydroperoxikomplexu.
8. Předpokládá se heterolytické štěpení vazby O-O (hypotetický model⁶), vznik molekuly vody. Vzniká ferrioxenový komplex.
9. Ferrioxenový komplex. Kyslík ve formě radikálu vytrhne vodík ze substrátu, čímž vzniká hydroxylový anion. Thiolátová síra je ve formě radikálu, substrát je také ve formě radikálu $\text{R}\bullet$.



Obr. 6^{5,6}: Reakční cyklus monoxygenasových reakcí (čísla označují jednotlivé kroky vysvětlené v textu); RH- substrát, ROH- monoxygenační produkt, XOOH- peroxysloučenina, e⁻-elektron

10. Předání elektronu z hydroxylového aniontu na thiolátovou síru. Vzniká velmi reaktivní, toxický hydroxylový radikál. Rekombinace radikálu substrátu s hydroxylovým radikálem.

11. Uvolnění hydroxylovaného substrátu a nativní formy cytochromu P450 (ferri forma železa a thiolátová síra).

Vedle kyslíku může P450 pro oxidativní reakce využívat i peroxidy a peroxikyseliny, které se stávají donorem kyslíku³.

Cytochromy P450 se vyskytují v různých formách jako izoenzymy (v současnosti asi 500), řadíme je do různých rodin a podrodin podle míry homologie jejich primární struktury, tj. pořadí aminokyselin⁵. Cytochromy P450 přítomné v lidském organismu

řadíme do 17 podrodin¹. I množství cytochromů v jednotlivých lidských tkáních se může velmi lišit mezi jedinci, může být ovlivněno různými faktory: environmentální polutanty, výživa, věk, kouření, konzumace alkoholu, působení podávaných léčiv či genetický polymorfismus (vrozené faktory způsobující absenci P450 či tvorbu P450 s pozmeněnou katalytickou schopností)⁵. Většina cytochromů P450 je značně inducibilních, tj. jejich exprese může být ovlivněna (zvýšena) přítomností vlastního substrátu, který daný izoenzym přeměňuje.

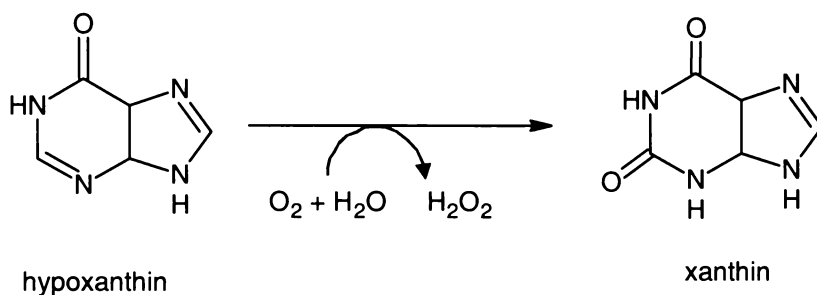
Cytochromy, které se podílejí na přeměně prokarcinogenů jsou především cytochromy P450 1A1, 1A2, 2E1, 3A4. Cytochromy P450 1A1 a 1A2 jsou z hlediska aktivace prokarcinogenů nejvýznamnější, mohou aktivovat až 90 % všech dosud známých karcinogenů⁵. Zatímco P450 1A1 se v játrech vyskytuje jen v mizivých koncentracích a je především zastoupen v jiných tkáních, P450 1A2 je typickým jaterním enzymem se širokou substrátovou specifitou (významnými substráty jsou např. aromatické aminy vznikající jako pyrrolytické produkty tepelné úpravy aminokyselin či bílkovin obsažených v potravinách)⁵. Oba tyto izoenzymy se podílejí na aktivaci genotoxických chemikálií obsažených v cigaretovém kouři. Další cytochrom, P450 2E1, aktivuje karcinogeny, zejména nitrosaminy⁵. P450 3A4 je jedním z nejvýznamnějších izoenzymů co se týče množství přeměňovaných substrátů i co do jeho obsahu v lidských tkáních. Jeho substráty jsou karcinogenní xenobiotika, polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické aminy i steroidní sloučeniny tvořené endogenně⁵.

1.1.3 Reduktasy

V aktivaci karcinogenů mohou hrát významnou roli i některé reductasy. Již byla zmíněna NADPH: P450 reductasa (viz kapitola 1.1.2. Cytochromy P450), flavoproteinový enzym sloužící jako dělič elektronového páru). Dalšími reductasami činnými v aktivaci karcinogenů jsou xanthin oxidasa (XO) či NADPH: chinon oxidoreductasa, tj. DT- diaforasa.

1.1.3.1. Xanthin oxidasa

Xanthin oxidasa (XO) je flavoproteinový enzym, na kterém probíhá lokální elektronový transport. Jejím úkolem je oxidovat hypoxanthin na xanthin (viz obr. 7) a ten dále redukovat na kyselinu močovou. Tento enzym se u savců vyskytuje především v játrech a střevní sliznici¹⁶. Jedná se o dimerní protein, obsahující 2 identické podjednotky o molární hmotnosti 130 kDa, každá jednotka obsahuje systém přenášející elektrony, který se skládá z FAD, molybdenového komplexu cyklicky se měnící mezi oxidačním stavem +6 a +4 a dvě různá centra Fe-S¹⁶. Konečným akceptorem elektronů je kyslík, přeměňovaný dále na peroxid vodíku, který je poté působením katalasy rozložen na vodu a kyslík¹⁶. Xanthin oxidasa hydroxyluje xanthin na uhlíku v pozici 8 (u hypoxanthinu v poloze 2), vniklý produkt se tautomerací změní na stabilnější keto-formu¹⁶. Enol-formu označujeme jako močovou kyselinu, protože její disociační konstanta je 5,4.



Obr. 7: Oxidace hypoxanthinu na xanthin, substrát xanthin oxidasy

Experimenty se sloučeninami značenými ¹⁸O prokázaly, že kyslíkový atom oxoskupiny na uhlíku v poloze 8 močové kyseliny pochází z H₂O, zatímco kyslíkový atom H₂O₂ pochází z O₂¹⁶.

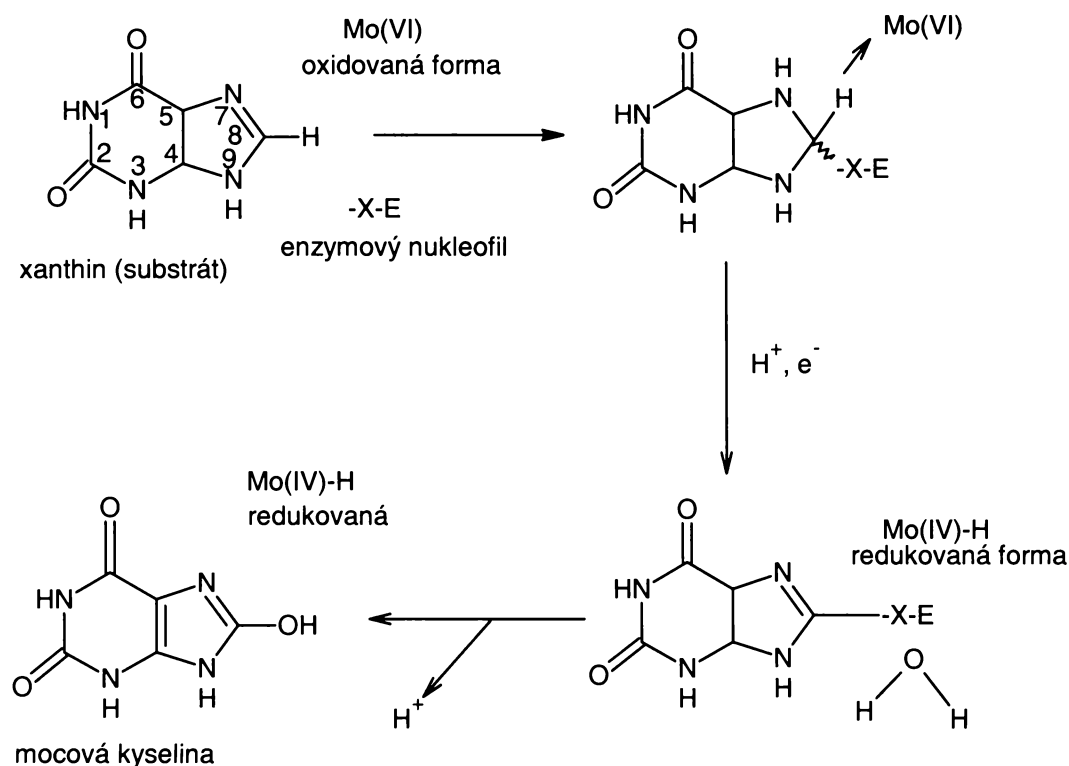
Předpokládaný mechanismus účinku xanthin oxidasy^{2,16} zobrazuje obr. 8, str. 19. Probíhá takto:

1. Atak xanthinu v poloze 8 enzymatickým nukleofilem.
2. Vodíkový atom v poloze 8 je eliminován v podobě hydridového iontu, reagujícího s Mo⁶⁺ komplexem redukujícího molybden na Mo⁴⁺.
3. Enzymový nukleofil je uvolněn působením vody za vzniku močové kyseliny.

V dalším kroku se enzym reoxiduje do stavu Mo^{6+} reakcí s molekulovým kyslíkem.

Celý proces je zatím nedokonale prostudován, měření EPR (elektronová paramagnetická rezonance) naznačují, že elektrony jsou z Mo(IV) protlačovány do dalších redoxních center enzymu a jednosměrně přecházejí z flavinu na kyslík za vzniku peroxidu vodíku a regenerovaného enzymu¹⁶.

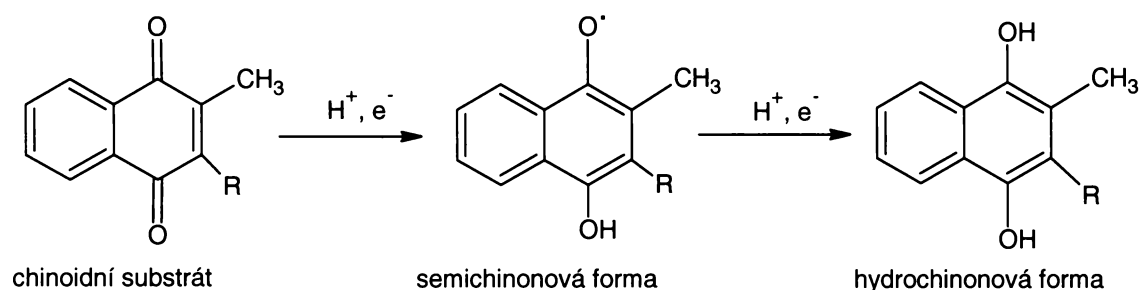
Redukce substrátu xanthin oxidasou probíhá v aerobním prostředí. Za určitých podmínek, například při karcinogenním procesu, může k této redukci docházet i v anaerobním prostředí. Uvolněné elektrony se pak místo na kyslík přenesou na jiný substrát. Tím může dojít k redukci cizorodé látky, např. *o*-nitroanisolu².



Obr. 8: Mechanismus účinku XO. Redukovaný enzym je následně reoxidován molekulou O_2 za vzniku H_2O_2 ^{2,16}.

1.1.3.2. DT- diaforasa

NAD(P)H: chinon oxidoreduktasa čili DT- diaforasa je flavoproteinový enzym obsažený v cytoplazmě. Katalyzuje dvoelektronové redukce chinonů a chinoidních sloučenin (viz obr. 9), např. menadionu (vitamin K₃) na hydrochinony, jako donor elektronů využívá NADH nebo NADPH¹. Touto reakcí se předchází jedoelektronové redukci chinonů jinými chinon reduktasami, jedoelektronová redukce by vyústila ve tvorbu reaktivních forem kyslíku¹⁷. V lidském genomu se objevují dva geny (NQO1, NQO2) kódující tento enzym¹⁷. Další gen (NQO3) se vyskytuje v eubakteriích, a ten se patrně ještě dělí na dvě podrodiny, vyskytující se v houbách (NQO4) a archaebakteriích (NQO5)¹⁷. DT- diaforasa je homodimerní enzym, každé z aktivních center obsahuje jednu prostetickou skupinu FAD¹. Kromě chinonů redukuje tento enzym také nízkomolekulární xenobiotika, např. nitrosloučeniny či azobarviva¹.



Obr. 9: Schéma redukce chinoidního substrátu, např. menadionu (vitamin K₃) DT- diaforasou přes semichinonovou formu (radikálovou formu)

Aktivita DT- diaforasy bývá zvýšena v nádorových buňkách¹. Bývá aktivnější za anaerobních podmínek, což je typické pro nádorové buňky¹. Chinoidní sloučeniny, které mohou vznikat např. biotransformací benzenu se mohou kovalentně vázat na nukleové kyseliny nebo proteiny¹.

2. Cíl práce

Cílem této práce je nejen shrnutí dosavadních poznatků o biotransformaci dvou potenciálních lidských karcinogenů *o*-nitroanisolu (*o*-NA) a *o*-anisidinu (*o*-A), ale i návrh řešení a vysvětlení některých neobjasněných otázek, které se vyskytly při studiu biotransformace *o*-anisidinu. *o*-Nitroanisol zmiňujeme zejména kvůli jeho spojitosti s *o*-anisidinem; *o*-anisidin je produktem redukce *o*-nitroanisolu xanthin oxidasou a DT-diaforasou.

Dosud byly uspokojivě vysvětleny mechanismy biotransformace *o*-nitroanisolu, jak cytochromy P450, tak reduktasami. Známe i produkty a mechanismy přeměny *o*-anisidinu peroxidasami a tyto tři biochemické dráhy lze považovat za uspokojivě prostudované. Potíže však nastávají u poslední dráhy, a sice přeměny *o*-anisidinu cytochromy P450, kde dochází k rozpadu finálních produktů, které jsou tímto špatně detekovatelné a lze je též obtížně kvantifikovat. Touto problematikou se bude zabývat kapitola čtvrtá, která nabídne teoretický rozbor návrhu řešení detekce významného produktu oxidace *o*-anisidinu cytochromy P450, N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu.

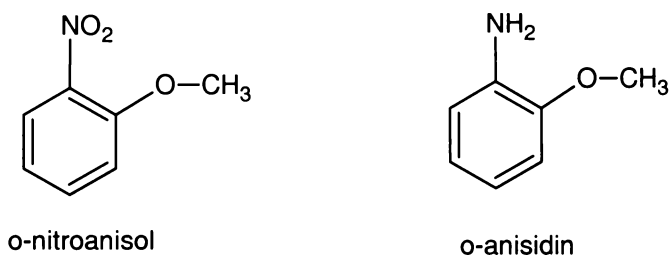
3. Shrnutí dosavadních poznatků o biotransformaci potenciálních lidských karcinogenů *o*-nitroanisolu a *o*-anisidinu

3.1. Aromatické dusíkaté sloučeniny

Aromatické dusíkaté sloučeniny jsou potenciálně toxické nebo karcinogenní látky, které představují možné riziko pro lidskou populaci^{18,19,20}. Jedná se o velmi rozšířené polutanty, které se vyskytují na pracovištích v chemickém průmyslu, jsou obsaženy ve výfukových plynech aut apod.²¹. Mezi aromatické dusíkaté sloučeniny řadíme arylaminy a nitroareny, které jsou významnými intermediáty vznikajícími v chemickém průmyslu při výrobě azobarviv, pigmentů, pesticidů či plastů^{20,21}.

V roce 1993 došlo ve společnosti Hoechst v Německu k rozsáhlému úniku *o*-nitroanisolu (prekurzor při syntéze *o*-anisidinu, který se používá k výrobě mnoha azobarviv²²) a následné kontaminaci prostředí lokálního i regionálního charakteru. Usuzuje se, že právě v důsledku této havárie se u dětí žijících v okolí této oblasti vyskytly různé dermatologické potíže a u hasičů, kteří se účastnili záchranné akce, došlo k jedno- či dvouřetězcovým zlomům v jejich DNA^{18,23}.

Biotransformace arylaminů a nitroarenů, N-oxidace aminoskupiny ($-NH_2$) a redukce nitroskupiny (NO_2), která vede k N-hydroxyarylamínům, jsou zásadními reakcemi z hlediska zkoumání toxických vlastností těchto látek²⁴. Nitroareny jsou redukovány mikroorganismy v zažívacím traktu, nebo přeměňovány reduktasami či aldehyd-dehydrogenasami v hepatocytech na nitrosoareny a N-hydroxyarylaminy²⁴. N-hydroxyarylaminy mohou být později metabolizovány na N-sulfonoxyarylaminy, N-acetoxyarylaminy či N-hydroxyarylamín N-glukuronid^{18,24}. Konjugát N-hydroxyarylamínu se v kyselém prostředí rozpadá na nitreniový iont který může s DNA tvořit kovalentní adukty²⁴. Tyto vysoce reaktivní intermediáty zodpovídají za genotoxickou a cytotoxickou aktivitu těchto látek^{18,24}.



Obr. 10: Vzorce *o*-nitroanisolu a *o*-anisidinu

Aromatické dusíkaté sloučeniny, kterými se tato práce zabývá, jsou *o*-nitroanisol (2-methoxynitrobenzen) a *o*-anisidin (2-methoxyanilin), přičemž *o*- značí pozici substituentu na benzenovém jádře, tj. *ortho*-, viz obr. 10. Obě tyto chemické látky vykazují silnou karcinogenní aktivitu, která způsobuje tvorbu maligních buněk zejména v močovém měchýři, a nižším rozsahu ve slezině, játrech a ledvinách potkanů a myši^{21,22,25}. Obě látky též způsobují anémii, která se projevuje zvýšenou hladinou methemoglobinu a rychlejší destrukcí erytrocytů^{26,27}.

Pozornost řady vědců přitáhly dané sloučeniny pro své zdánlivě rozporupné projevy v testech *in vivo* a *in vitro*. Víme, že se jedná o látky silně karcinogenní pro hlodavce (a též lidské potenciální karcinogeny)^{19,20}, přesto se v testech na mutagenitu se *Salmonella typhimurium*^{22,26} projevují jen velmi slabě a vykazují též jen slabou aktivitu v cytogenetických testech^{22,26}. Tento rozpor je způsoben faktem, že u většiny dusíkatých sloučenin uhlovodíků se jejich genotoxická aktivita projeví až jejich metabolickou přeměnou²⁶. V případě aromatických nitrosloučenin uhlovodíků (zde *o*-nitroanisol) je třeba k jejich aktivaci redukce nitroskupiny reduktasami²⁶ a v případě aromatických aminů hrají důležitou roli peroxidasy²⁷. Při provádění výše uvedených *in vitro* testů však tento fakt nebyl ještě zcela zřejmý a aktivace reduktasami, resp. peroxidasami, se nezohlednila.

3.1.1. *o*-Nitroanisol

Jak už bylo zmíněno, *o*-nitroanisol (2-methoxynitrobenzen) se především používá jako prekurzor při průmyslové výrobě *o*-anisidinu^{21,22}. Organismus vystavený tomuto xenobiotiku se snaží tuto látku nejprve přeměnit na více polární, aby bylo možné ji eliminovat z buněk a následně vyloučit ven. Většina nitroarenů se v organismu může

redukovat cytosolickými reduktasami, kupříkladu xanthin oxidasou nebo DT-diaforasou, nebo může dojít k oxidaci cytochromy P450. *o*-Nitroanisol se převážně biotransformuje oxidační demethylací na atomu kyslíku (O-demethylace) *in vivo* na 2-nitrofenol, který se objevuje v moči jako sulfátový konjugát²⁸; tato cesta je detoxikační¹⁸. Druhým, minoritním způsobem metabolické přeměny tohoto xenobiotika, je jeho redukce na *o*-anisidin^{18,28}. Při vysokých dávkách však může první cesta biotransformace dosáhnout saturace a může se začít vytvářet větší množství *o*-anisidinu^{18,22}. Tato metabolická cesta je cestou aktivace *o*-nitroanisolu^{18,28}.

3.1.1.1. Metabolismus *o*-nitroanisolu cytochromy P450

Biotransformace *o*-nitroanisolu cytochromy P450 je detoxikační metabolickou dráhou¹⁸. Ke zjištění, jaké metabolity jsou touto biotransformací produkovány, byly při experimentech použity mikrosomální vzorky jaterních buněk (hepatocytů) lidských i laboratorních zvířat (králík, potkan). Cílem experimentu bylo zjistit, jaké metabolity jsou produkovány a zároveň, jaké konkrétní izoformy cytochromů P450 se na biotransformaci *o*-nitroanisolu podílejí¹⁸.

Po inkubaci vzorků hepatických mikrosomů v přítomnosti NADPH byly za použití vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) identifikovány tři produkty, vzniklé O-demethylací *o*-nitroanisolu¹⁸ a případnou následnou hydroxylací. Jeden z nich, minoritní produkt, byl určen jako 2,6-dihydroxynitrobenzen (ve větším množství vznikl oxidací lidskými mikrosomy)¹⁸. Další produkt byl opět dihydroxy derivátem nitrobenzenu, jedná se o 2,5-dihydroxynitrobenzen²⁹. Ten je také převažujícím produktem lidských mikrosomů. Třetím produktem je 2-nitrofenol¹⁸ (viz obr. 11, str. 26). Tento produkt vznikl ve větším množství oxidací *o*-nitroanisolu potkaními a králičími mikrosomy²⁹.

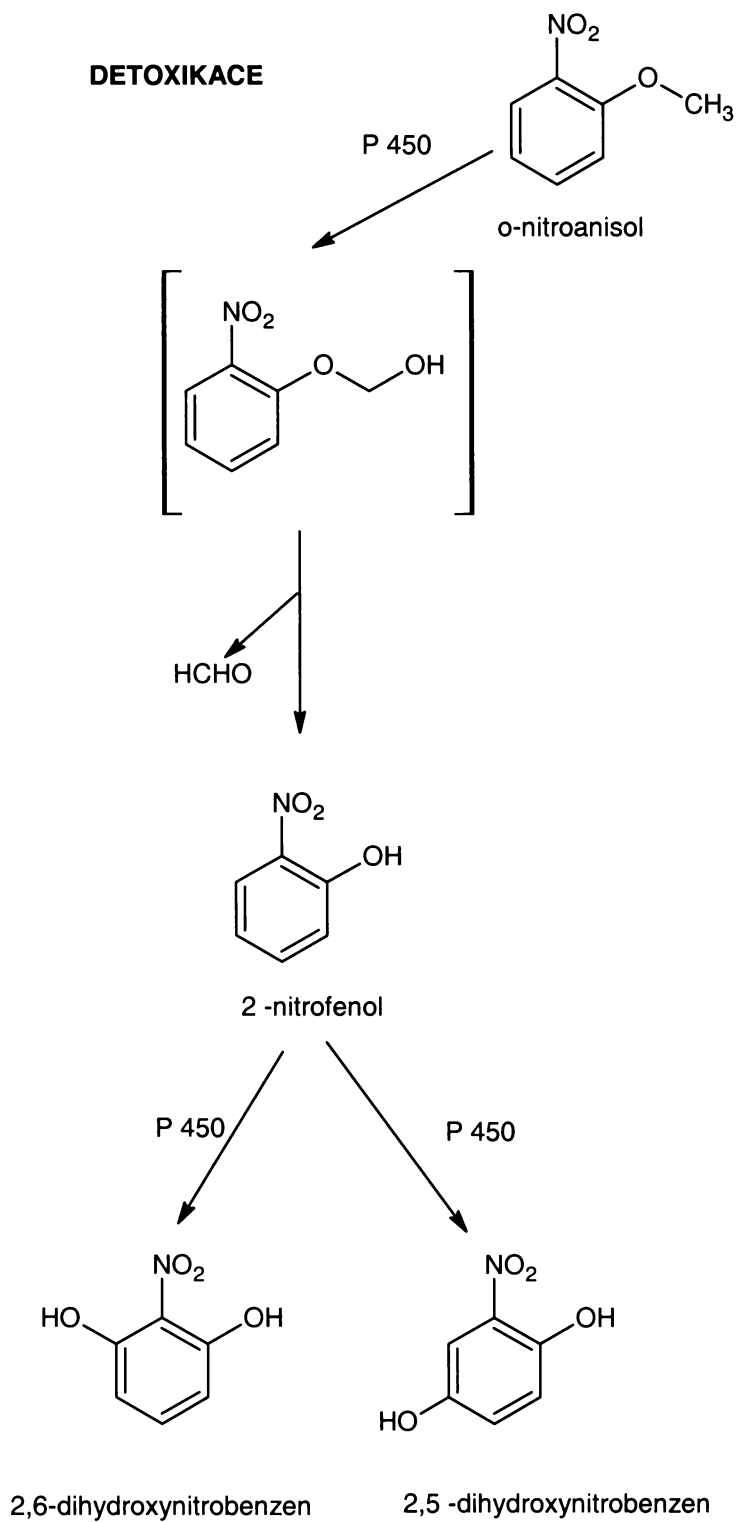
Následujícím zkoumáním, které izoenzymy katalyzují metabolismus *o*-nitroanisolu byly zjištěny následující údaje. Hlavními králičími katalyzátory O-demethylace *o*-nitroanisolu jsou cytochromy P450 2E1, 1A1 a 2B2 až 2B4¹⁸. Na následné hydroxylaci 2-nitrofenolu na dihydroxybenzen se podílí především králičí cytochromy P450 2E1, dále pak 3A6, 2B4 a 1A1¹⁸. Potkaními efektními katalyzátory O-demethylace *o*-nitroanisolu na 2-nitrofenol jsou především izoenzymy 2E1, 2D2 a 2C6, 2B2 a 1A1³⁰. Z lidských rekombinantních cytochromů P450 metabolizujících

o-nitroanisol na 2-nitrofenol, byly efektními cytochromy P450 1A1, 2E1, 2B6¹⁸, 2C19, 2C9¹⁸. Nejefektivnějším lidským rekombinantním cytochromem P450, oxidujícím *o*-nitroanisol, byl shledán cytochrom P450 1A1³⁰. Produkty následné hydroxylace 2-nitrofenolu, 2,5-Dihydroxynitrobenzen a 2,6-dihydroxynitrobenzen, vznikly zejména oxidací lidskými cytochromy P450 2E1, 1A, 2B6, 2C19, 3A4²⁹.

V případě lidských jaterních mikrosomů se katalytická aktivita různých izoenzymů cytochromů P450 (zejména P450 2E1, 1A1 a 2B6) velmi lišila u různých hepatických vzorků, což je dáno vlivem různých faktorů. Mezi tyto faktory řadíme zejména výživu, kouření, užíváním drog, vliv znečištěného prostředí, ve kterém jedinec žije atd. Hodnoty exprese a katalytické schopnosti cytochromů P450 se liší též mezi jedinci^{18,31-36}. Na základě korelačních studií² bylo však prokázáno, že *o*-nitroanisol je oxidován v lidských játrech převážně cytochromem P450 2E1¹⁸.

Pomocí užití značení *o*-nitroanisolu triciem ³H a technikou ³²P-postlabeling bylo zjištěno, že nejen za aerobních, ale ani za anaerobních podmínek nevznikají v přítomnosti lidských či králičích jaterních mikrosomů a NADPH žádné adukty s DNA¹⁸. Z toho vyplývá již předeslaná skutečnost, že metabolismus *o*-nitroanisolu cytochromy P450 probíhá detoxikačně a nedochází tudíž k aktivaci tohoto xenobiotika¹⁸. Souhrnně je tato dráha znázorněna na obr. 11, str. 26¹⁸.

Z prezentovaných studií vyplývá, že se na oxidaci *o*-nitroanisolu cytochromy P450 u potkaních a lidských mikrosomálních vzorků podílí obdobné podrodiny cytochromů (P450 2E1, podrodiny 2D, 2C, 2B, 1A)³⁰. Proto je možné považovat potkany za vhodný experimentální model pro předpovídání reakce lidského organismu na *o*-nitroanisol³⁰.



Obr. 11: Schéma metabolismu o-nitroanisolu cytochromy P450 (detoxikační dráha), hranaté závorky znázorňují nestabilní meziprodukt

3.1.1.2. Metabolismus *o*-nitroanisolu reduktasami

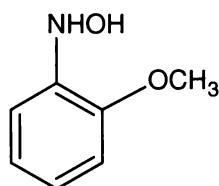
Minoritní metabolickou dráhou biotransformace *o*-nitroanisolu je jeho redukce na *o*-anisidin (2-methoxyanilin), který se tvoří v játrech. Tato redukce nitro skupiny (-NO₂) *o*-nitroanisolu je aktivačním procesem této látky. *o*-Nitroanisol je redukován *in vitro* cytolem jaterních buněk potkanů, králíků, prasat i cytolem lidských hepatocytů. Majoritním enzymem redukujícím *o*-nitroanisol je xanthin oxidasa (XO). K redukci *o*-nitroanisolu dochází také *in vivo*²⁶.

o-Nitroanisol vykazuje slabou mutagenitu při Amesově testu²² (test vyvinutý v 60. letech 20. století Brucem Amesem, rychlý a levný způsob identifikace mutagenního potenciálu chemických látek)³⁷ se *Salmonella typhimurium* a nízkou aktivitu v cytogenetických testech²⁶. Indukuje slabý nárůst chromozomálních aberací a výměn genů mezi sesterskými chromatidami, ale pouze při vysokých koncentracích^{22,26}. Přesto po testech *in vivo* s laboratorními zvířaty (potkan, myš) bylo prokázáno, že se jedná o silný karcinogen způsobující nádory močového měchýře, v menší míře tumory ledvin atd.²². Vysvětlení rozdílných výsledků testů *in vitro* a *in vivo* spočívá pravděpodobně ve skutečnosti, že reakční směs buď neobsahuje žádný enzymový biotransformační aparát, nebo obsahuje pouze fragmenty endoplazmatického retikula. Proto při testech *in vitro* nedocházelo k aktivaci *o*-nitroanisolu reduktasami. Při testování *in vivo* je laboratorní zvíře vystaveno působení dané látky jako celek (má tedy kompletní enzymatickou výbavu), a proto se *o*-nitroanisol již jednoznačně reduktasami aktivuje.

Ke zjištění, zda *o*-nitroanisol po biotransformaci reduktasami modifikuje DNA, byly použity techniky značení této látky triciem ³H a ³²P-postlabeling. V experimentech byly za anaerobních podmínek použity cytosolické vzorky lidských hepatocytů, vykazující obdobnou aktivitu xanthin oxidasy a vysoké aktivity enzymů druhé fáze biotransformace, sulfotransferasy a N,O-acetyltransferasy (SULT a NAT). Použité cytosolické vzorky aktivovaly triciem značený *o*-nitroanisol na metabolity vážící se na DNA²⁶. Tyto vazby byly zanedbatelné, když byl z inkubované směsi vyjmut cytosol nebo hypoxanthin (substrát xanthin oxidasy). Přítomnost kofaktoru sulfotransferasy, PAPS (3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát), zvýšila četnost vazeb značeného *o*-nitroanisolu na DNA, zatímco přítomnost kofaktoru N,O-acetyltransferasy, acetyl koenzymu A, neměla na modifikaci DNA vliv²⁶. Pomocí modifikace klasické metody ³²P-

postlabeling, která odhalí i menší, polárnější adukty, bylo zjištěno, že metabolity vzniklé z *o*-nitroanisolu a kovalentně interagující s DNA, obsahující jedno benzenové jádro²⁶.

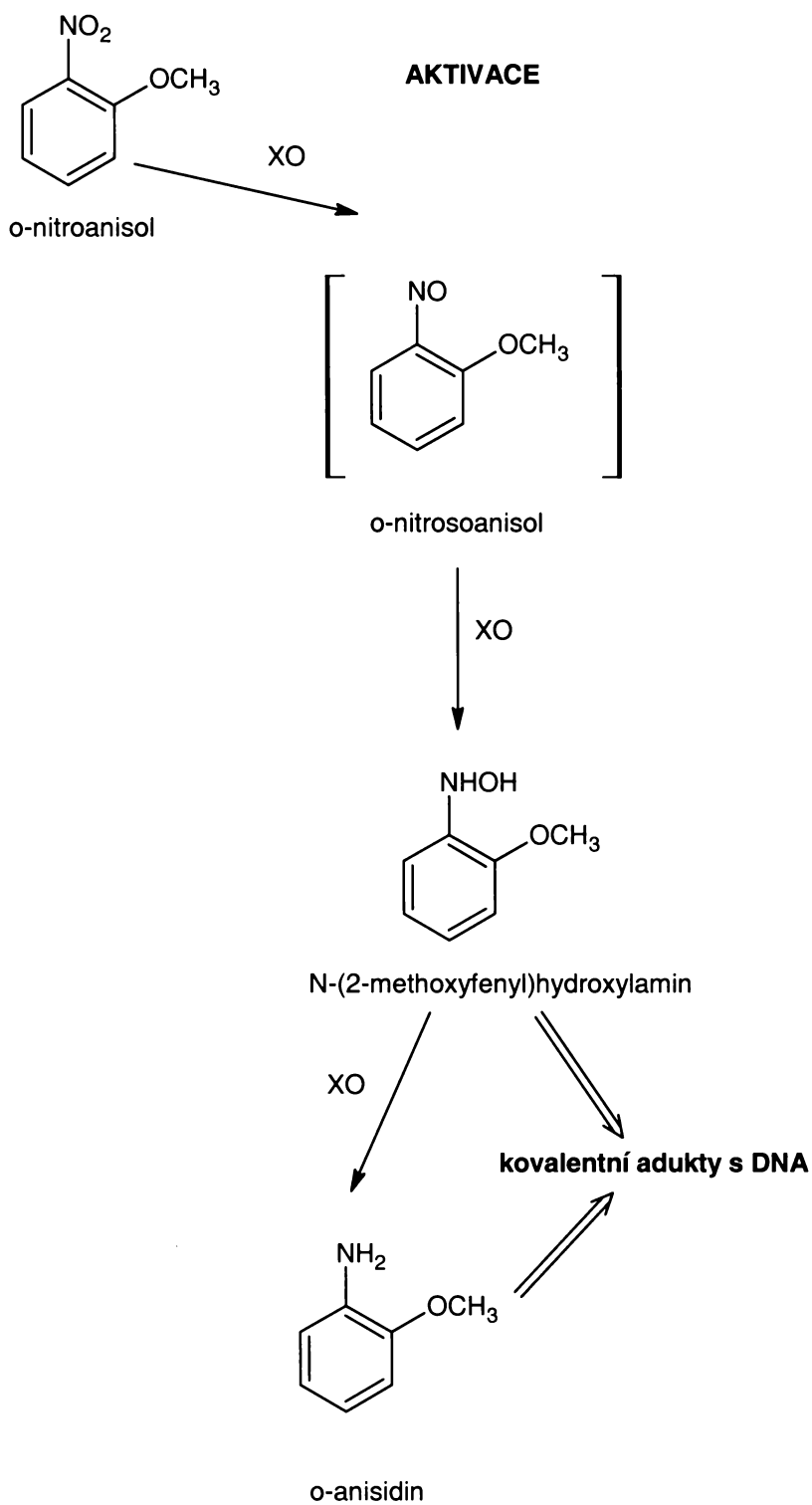
Během enzymatické redukce *o*-nitroanisolu lidskými hepatocyty a xanthin oxidasou vznikl N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin (obr. 12), který je velmi reaktivní a nestabilní²⁶. Jde o proximální karcinogen, metabolit *o*-nitroanisolu, který se jako konjugát v II. fázi biotransformace v kyselém prostředí močového měchýře rozpadá a vzniklý nitreniový iont, nyní již jako ultimální karcinogen, způsobuje modifikaci DNA v tomto orgánu^{26,38}. Druhým metabolitem vzniklým redukcí nitroskupiny *o*-nitroanisolu je *o*-anisidin. Bylo také zjištěno, že adukty *o*-nitroanisolu na DNA značené metodou ³²P-postlabeling byly stabilní za alkalického pH²⁶.



Obr. 12: N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin

Další zkoumání bylo zaměřeno na zjišťování, zda *o*-nitroanisol tvoří též adukty s DNA *in vivo*, k čemuž byli použiti potkaní jedinci. DNA-adukty *o*-nitroanisolu, které byly podobné těm, které se vytvořily *in vitro*, byly nalezeny v cílovém orgánu karcinogenního působení tohoto xenobiotika, tj. v močovém měchýři, a dále také v játrech, ledvinách a slezině. V těchto orgánech způsobuje neoplastické změny²⁶. Naopak tyto adukty nebyly nalezeny v plicích, srdci, ani mozku potkanů²⁶.

o-Nitroanisol se do lidského organismu může dostat především vdechnutím, respiračními cestami. Epiteliální buňky plic jsou prvními obrannými liniemi bránícími se tomuto xenobiotiku. Dochází v nich k expresi sulfotransferas, které katalyzují konjugaci N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu s aktivním sulfátem²⁶, a jak již bylo výše uvedeno, nitreniový iont vzniklý rozpadem tohoto konjugátu je zodpovědný za modifikaci DNA²⁶.



Obr. 13: Schéma metabolismu o-nitroanisolu reduktasou; XO- xanthin oxidasa,; hranaté závorky označují nestabilní produkt

Redukcí *o*-nitroanisolu vznikají u potkanů i u lidí stejné produkty, tato látka je u obou druhů redukována totožným enzymatickým systémem²⁶. Je-li tedy *o*-nitroanisol karcinogenní pro potkany, existuje vysoké riziko, že je karcinogenní i pro lidi.

V experimentech s dalšími živočišnými druhy se sledovala aktivita ještě jedné reduktasy, a sice DT-diaforasy (NAD(P)H: chinon oxidoreduktasa). Zatímco xanthin oxidasa redukuje *o*-nitroanisol u většiny živočichů využitých v experimentu, především u lidí a potkanů, DT-diaforasa se aktivně podílí na redukci *o*-nitroanisolu také v králičím a prasečím cytosolu³⁹. Zdá se, že DT-diaforasa je jakýmsi přídavným enzymem, podílejícím se na metabolismu tohoto xenobiotika u králíků a prasat³⁹. Aktivity xanthin oxidasy a DT-diaforasy se liší mezi různými lidskými jedinci. To je způsobeno mnoha faktory, jako jsou užívání drog, kouření, polutanty obsažené v prostředí a genetický polymorfismus³⁹.

o-Nitroanisol byl shledán genotoxickým karcinogenem, jeho biotransformace reduktasami zdá se být drahou aktivační. Deriváty, které se jeho biotransformací tvoří, jsou schopny ataku DNA a tvorby aduktů s deoxyguanosinem²⁶.

Obecné schéma aktivační dráhy *o*-nitroanisolu reduktasou (zde xanthin oxidasou) je znázorněno na obr. 13, str. 29.

3.1.2. *o*-Anisidin

o-Anisidin (2-methoxyanilin) je používán jako intermediát při výrobě azobarviv a pigmentů^{21,22}. Tato látka je karcinogenní, vyvolává nádory močového měchýře myši a potkanů a je i potenciálním lidským karcinogenem^{25,27,40}. Kromě karcinogenních účinků vykazuje *o*-anisidin také vysokou toxicitu, způsobuje hematologické změny, anémii a nefrotoxicitu^{25,27,40}. V Amesově testu se *Salmonella typhimurium* vykazuje mutagení změny^{25,40}.

Biotransformace *o*-anisidinu probíhá hydroxylačními reakcemi katalyzovanými cytochromy P450^{21,41,42}. Majoritním produktem oxidace tohoto karcinogenu cytochromy P450 je derivát N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin^{21,41,42}. Efektivněji však probíhá oxidace *o*-anisidinu jednoelektronovými redikálovými reakcemi např. laktoperoxidasou, křenovou peroxidasou a prostaglandin H syntasou^{27,41}.

3.1.2.1. Metabolismus *o*-anisidinu peroxidasami

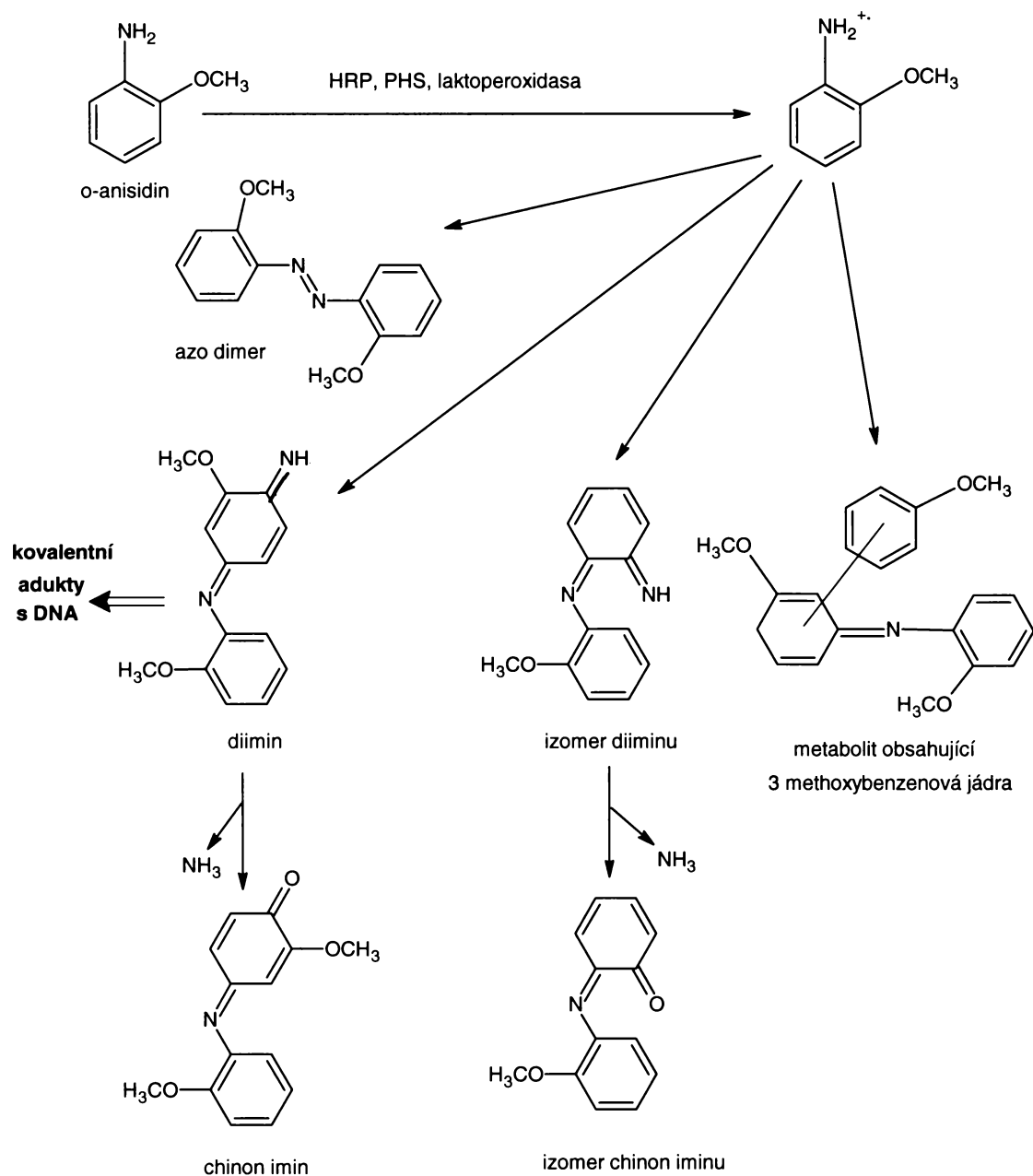
Při experimentech, zabývajících se oxidací *o*-anisidinu peroxidasami *in vitro*, byly použity tři typy peroxidas: prostaglandin H syntasa (PHS), která je hlavním enzymem obsaženým v močovém měchýři (byla získána z beraních semenných váčků), laktoperoxidasa, jako modelová peroxidasa savců (je obsažena v mléce a mléčných žlázách) a křenová peroxidasa (HRP)²⁷. Vyhodnocení výsledků bylo prováděno pomocí metod vysokoučinné kapalinové chromatografie (HPLC), hmotnostní spektrometrie, tenkovstvé chromatografie; zda-li vznikají kovalentní adukty s DNA bylo zkoumáno metodou ³²P-postlabeling a metodou využívající *o*-anisidin značený [¹⁴C]

Jedním z cílů experimentu bylo zjistit, zda je *o*-anisidin vhodným substrátem pro prostaglandin H syntasu. Cyklooxygenasová aktivita prostaglandin H syntasy spočívá v zabudování molekulárního kyslíku do molekuly kyseliny arachidonové, produktem této reakce je prostaglandin G₂^{27,43}. Ten je poté redukován peroxidasovou aktivitou enzymu na prostaglandin H₂, přičemž dojde k oxidaci substrátu^{27,43}. Spotřeba kyslíku slouží ke sledování aktivity prostaglandin H syntasy^{44,45}. Jelikož spotřeba kyslíku vzrostla přidáním *o*-anisidinu do reakční směsi, bylo prokázáno, že *o*-anisidin je substrátem pro prostaglandin H syntasu²⁷. Biotransformace *o*-anisidinu tímto enzymem však není tak efektivní jako biotransformace této látky laktoperoxidasou či křenovou peroxidasou²⁷.

Během reakce *o*-anisidinu s peroxidasami vznikají jak stabilní, tak i nestabilní produkty. Stabilním produktem je azo dimer, nestabilními jsou diimin a chinon imin²⁷. Dále ještě vzniká metabolit, o kterém víme, že obsahuje tři methoxybenzenové cykly²⁷. Zjistilo se, že z produktů peroxidasové reakce se pouze diimin může kovalentně vázat na nukleové kyseliny²⁷. Schéma peroxidasové reakce *o*-anisidinu je znázorněno na obr. 14, str. 32.

Dále bylo zjištěno, že křenová peroxidasa je nejefektivnější v přeměně *o*-anisidinu na metabolity, které se vážou na nukleové kyseliny²⁷. Následují ji laktoperoxidasa a prostaglandin H syntasa²⁷. Obě savčí peroxidasy byly v přítomnosti kyseliny arachidonové nebo peroxidu vodíku schopné aktivovat *o*-anisidin značený [¹⁴C] na metabolity vážící se na DNA či tRNA²⁷. Přídavek indomethacinu (inhibitor aktivity PHS) nebo nedostatek kyseliny arachidonové ve směsi způsobil inhibici vazby produktů reakce *o*-anisidinu s prostaglandin H syntasou na nukleové kyseliny²⁷. Nedostatek

peroxidu vodíku rovněž způsobil snížení vazby produktů biotransformace laktoperoxidasou či křenovou peroxidasou na DNA či tRNA²⁷.



Obr.14: Schéma předpokládané metabolické dráhy oxidace o-anisidinu peroxidasami *in vitro*²⁷, HRP – křenová peroxidasa, PHS – prostaglandin H syntasa

Při experimentu se také zjišťovalo, které deoxyribonukleotidy jsou cílem vazby ultimálního karcinogenu diiminu. Vyšlo najevo, že majoritními adukty DNA jsou adukty deoxyguanosinu²⁷.

Všechny tři uvedené peroxidasy oxidovaly *o*-anisidin *in vitro* radikálovým mechanismem. Vznikající radikály nejsou pravděpodobně přímo zodpovědné za vazbu na DNA⁴³, nicméně produkce těchto radikálů při peroxidasové reakci může být dalším významným faktorem nejen v promoční, ale i progresní fázi karcinogeneze². Oxidace *o*-anisidinu peroxidasami byla shledána aktivační reakcí, při níž vznikají genotoxické produkty, vážící se na nukleofily, včetně DNA²⁷.

3.1.2.2. Metabolismus *o*-anisidinu cytochromy P450

Cílem experimentů zkoumajících oxidaci *o*-anisidinu cytochromy P450 bylo zjistit, které izoenzymy P450 jej metabolizují nejefektivněji, jaké produkty vznikají *in vivo* a *in vitro* a zda jde o aktivační dráhu. Dále se experimenty zaměřily na zjišťování, zda se v cílových orgánech karcinogenního působení tvoří kovalentní adukty s nukleovými kyselinami. Použité mikrosomální vzorky jaterní tkáně pocházely nejen od laboratorních zvířat - králíků a potkanů, ale též od lidských dárců.

Po inkubaci *o*-anisidinu s králíčími a potkaními mikrosomy v přítomnosti NADPH byly pomocí tenkovstvé chromatografie rozeznány tři metabolity *o*-anisidinu, jeden majoritní a dva minoritní²¹. Pomocí hmotnostní spektrometrie byl majoritní produkt vyhodnocen jako N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin (obr. 12, st. 28)²¹. Poté byla reakční směs analyzována pomocí HPLC, která odhalila dva metabolity²¹. Ani jeden z nich však nekorespondoval s původním N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminem, což mohlo být způsobeno oxidací původního nestabilního produktu N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu mikrosomálními enzymy²¹. Když byl tento experiment prováděn s lidskými jaterními mikrosomy v modifikovaných podmínkách, a sice s nižší koncentrací *o*-anisidinu, bylo možné identifikovat N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin⁴¹. U experimentu se zvířecími vzorky doplňující výsledky ukázaly, že dva vzniklé neurčené produkty jsou metabolity N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu, přičemž mezi těmito dvěma metabolity dochází k určité konverzi²¹. Zvýšení tvorby jednoho produktu je totiž provázeno snížením obsahu produktu druhého ve směsi. V této souvislosti byla diskutována možnost cyklické oxidačně-redukční reakce²¹. V prvním kroku je

o-anisidin oxidován na N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin a tento produkt je dále enzymaticky anebo spontánními reakcemi přeměňován na dva další metabolity a současně také redukován zpět na *o*-anisidin²¹, což způsobuje obtížnou kvantifikaci produktů metabolismu *o*-anisidinu a to hlavně N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu touto metabolickou drahou. Tato problematika bude dále diskutována v kapitole č. 4.

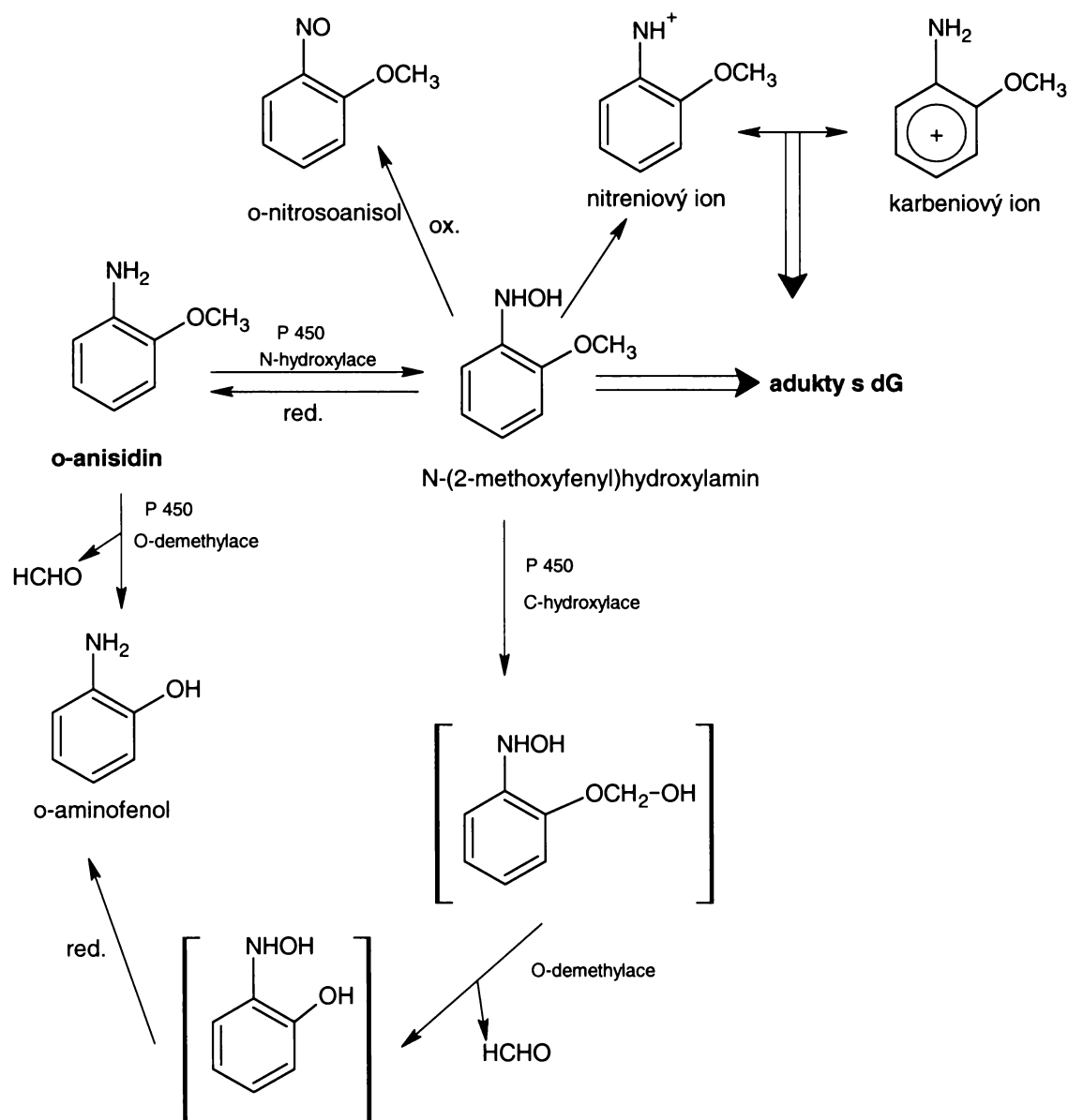
Zmíněný oxidační produkt *o*-anisidinu, N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin, je velmi reaktivní metabolit, který se snadno rozpadá na karbeniový nebo nitreniový ion⁴². Tyto ionty jsou schopné tvorby kovalentních aduktů s DNA, přesněji s deoxyguanosinem *in vitro*⁴¹. Oba zmíněné ionty jsou však schopny tvorby kovalentních aduktů také *in vivo*, což bylo prokázáno experimenty s potkany vystavenými působení *o*-anisidinu⁴¹. V cílovém orgánu karcinogenního účinku, tedy v močovém měchýři, byly identifikovány stejné DNA adukty jako při výše zmíněných experimentech *in vitro*⁴¹.

Další experimenty se zaměřily na studium cyklické oxidačně-redukční reakce *o*-anisidinu (viz výše) a přinesly zjištění, že N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin může být dále ještě oxidován na *o*-nitrosoanisol anebo redukován na původní *o*-anisidin⁴². Ten se může dále oxidovat, přičemž vznikne *o*-aminofenol⁴² (viz kapitola 3.1.3.), za současného uvolnění formaldehydu (dle Wiliamse a Smithe)^{42,46,47}. O formaldehydu je známo, že modifikuje DNA, je mutagenní a karcinogenní v testech s laboratorními zvířaty⁴⁸. Dle Mezinárodní Agentury pro výzkum rakoviny (International Agency for Research in Cancer, IARC) je také lidským karcinogenem⁴⁸. Schéma celkového metabolismu *o*-anisidinu cytochromy P450 je znázorněno na obr. 15, str. 35.

Ke zjištění, které izoenzymy cytochromu P450 oxidují *o*-anisidin, byly použity rekonstituované potkaní a králičí cytochromy P450 (rekonstituovány s NADPH:P450 reduktasou a lipidovou složkou). Zdá se však, že *o*-anisidin je promiskuitním substrátem cytochromů P450⁴², jelikož je oxidován širokou škálou jeho izoenzymů. Aktivní v této reakci byly zejména cytochromy P450 podrodin 1A, 2B, 2E a 3A²¹. Nejefektivnějšími cytochromy v oxidaci tohoto substrátu byly králičí cytochromy P450 2E1²¹.

Experimenty se vzorky lidských hepatocytů ukázaly, že cytochrom P450 2E1 je pravděpodobně nejefektivnější v oxidaci *o*-anisidinu na jeho produkty⁴¹. Byly-li použity lidské rekombinantní cytochromy P450, ukázalo se, že nejefektivnějšími izoenzymy cytochromu P450 v oxidaci *o*-anisidinu byly 1A2, 2B6 a 2E1⁴¹. V menším rozsahu oxidovaly tento substrát izoenzymy 1A1, 2A6, 2D6 a 3A4⁴¹. Aktivace *o*-anisidinu

lidskými hepatocyty je obdobná i u potkanů; adukty s DNA, které vznikly aktivací lidskými cytochromy P450 jsou prokazatelně tytéž, jako ty, které vznikly v potkanech exponovaných *o*-anisidinem *in vivo*⁴¹. Zdá se tedy, že potkan je vhodný modelový organismus pro studium a predikci karcinogenního chování *o*-anisidinu u lidí.



Obr. 15: Schéma celkového metabolismu *o*-anisidinu⁴² a jeho možné cyklické přeměny na N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin; dG značí deoxyguanosin, red. = redukce, ox. = oxidace, HCHO = formaldehyd

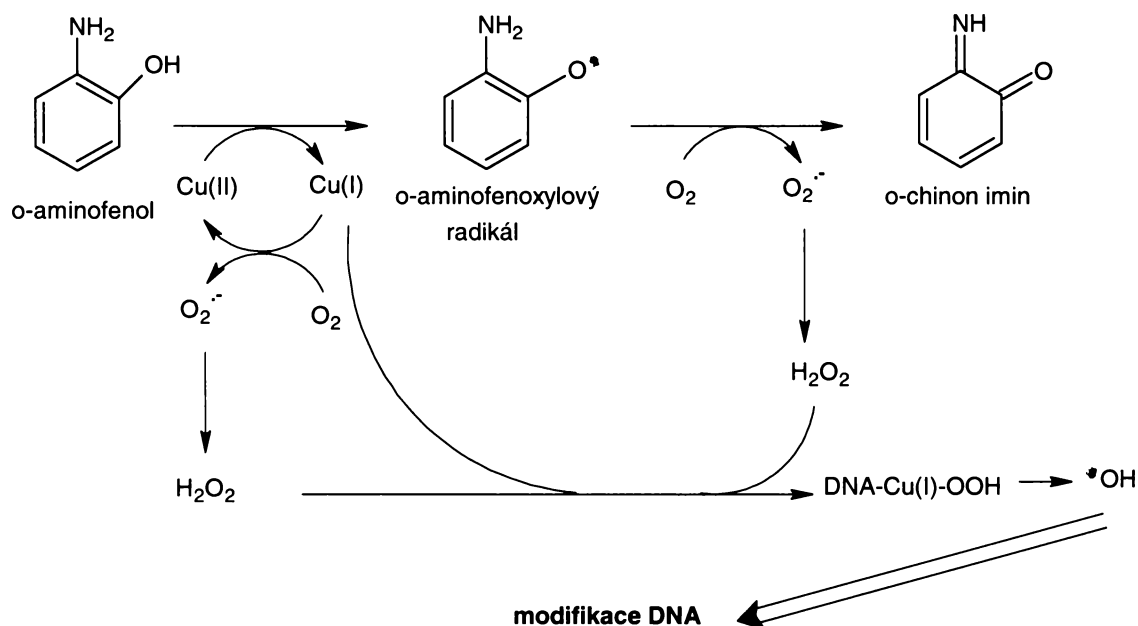
3.1.3. *o*-Aminofenol

Jedním z produktů oxidace *o*-anisidinu cytochromy P450 je i *o*-aminofenol (viz obr. 15, str. 35). O *o*-aminofenolu je známo, že v lidském těle způsobuje methemoglobinémií⁵⁰. Jeho intravenosní podání má za následek prudkou oxidaci hemoglobinu v erythrocytech⁵⁰ a dále byla zjištěna jeho rychlá schopnost redukovat methemoglobin⁵⁰. Během experimentů s lidským hemoglobinem se projeví oxidoredukční vlastnosti *o*-aminofenolu⁵¹. Ukázalo se, že tato látka při inkubaci s lidskými erythrocyty je schopna nejprve oxidovat intracelulární oxyhemoglobin na methemoglobin a poté redukovat methemoglobin zpět na oxyhemoglobin⁵¹ (tato skutečnost byla zjištěna na základě změn v absorpčním spektru intracelulárního hemoglobinu⁵¹). *o*-Aminofenol se považuje za mutagenní, jelikož způsobuje indukci výměn mezi sesterskými chromatidami v lidských lymfocytech *in vitro* a v morku kostí křečka čínského *in vivo*⁵². Přestože nebylo zjištěno, že by *o*-aminofenol tvořil kovalentní adukty s DNA, bylo prokázáno, že může v přítomnosti měďnatých iontů způsobovat poškození DNA⁵³, jak bude podrobněji vysvětleno dále

Schmidt a kolektiv v roce 1973 detekovali *o*-aminofenol, který vznikl dealkylací *o*-anisidinu *in vitro* potkaními jaterními mikrosomy⁴⁷. Později Okhuma a Kawanishi zkoumali *o*-aminofenol a jeho izomery, *p*- a *m*-aminofenol, v prostředí iontů kovů a jejich schopnost modifikovat DNA. Tento experiment byl prováděn metodou značených 5'-konců ³²P. Zjistili, že *o*-aminofenol v prostředí měďnatých iontů způsobuje poškození DNA, nicméně DNA nebyla poškozena přítomností samotného *o*-aminofenolu⁵³. Dále *o*-aminofenol způsobil mírné narušení DNA v přítomnosti železných iontů⁵³. Intenzita poškození DNA byla závislá na použitém množství iontů kovů a délce experimentu⁵³. Naopak, přidavek katalasy, methionalu i bathokuproinu (specifický chelátor Cu^I) inhiboval poškození DNA⁵³. *o*-Aminofenol v prostředí měďnatých iontů modifikoval guanin, nacházející se na 5'-konci a často také cytosin uprostřed sekvence 5'-ACG-3' použitého lidského protoonkogenu⁵³. Při použití denaturované DNA došlo častěji k porušení guaninových a adeninových zbytků⁵³.

Nyní bude popsána neenzymatická přeměna *o*-aminofenolu za přítomnosti měďnatých iontů. Předpokládaný mechanismus působení *o*-aminofenolu v prostředí měďnatých iontů na DNA navrhli již zmínění Okhuma a Kawanishi. *o*-Aminofenol se v přítomnosti měďnatých iontů oxiduje na *o*-aminofenoxylový radikál a dále

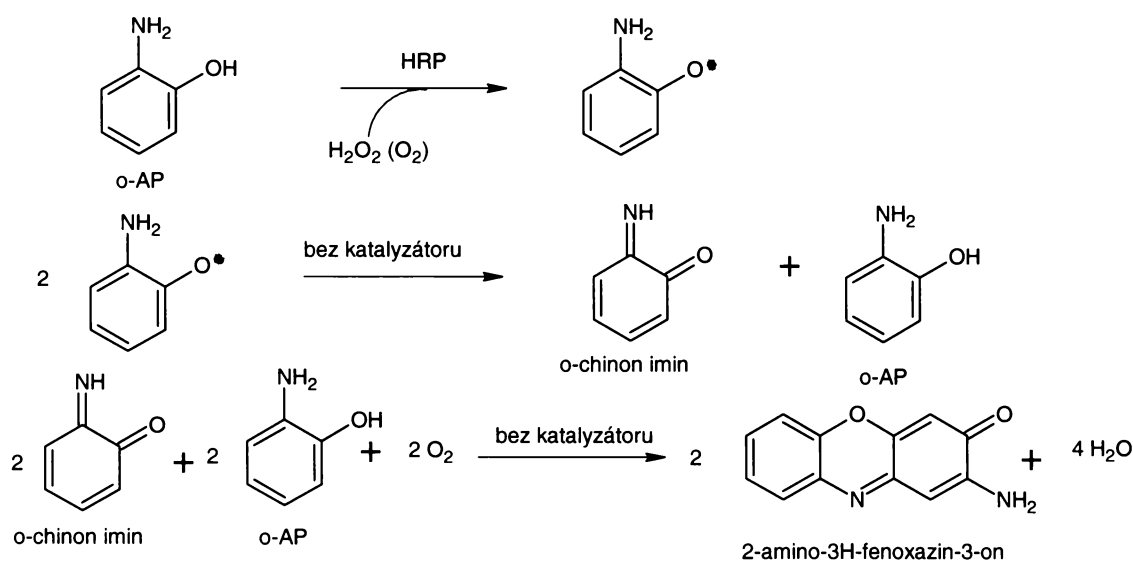
pravděpodobně podléhá autooxidaci na *o*-chinon imin⁵³. Během první oxidace *o*-aminofenolu se redukuje ionty mědi na Cu^I, dochází k cyklické redoxní reakci z Cu^{II} na Cu^I a zpět, a zároveň se kyslík redukuje na peroxidový anionradikál O₂^{-•}. Rekombinací anionradikálů vzniká peroxid vodíku. Další oxidací *o*-aminofenoxylového radikálu vzniká další peroxid vodíku, který tvoří komplex s DNA a ionty mědi DNA-Cu^I-H₂O₂⁵⁴. Je známo, že peroxid vodíku reaguje s měďnými ionty za vzniku reaktivních sloučenin kyslíku poškozujících DNA^{55,56,57}. Také v tomto případě tzv. ternární komplex DNA-Cu(I)-OOH je přechodný málo stabilní komplex, který se rozpadá za vzniku reaktivních hydroxidových radikálů, reagujících s DNA⁵³. Schéma celkového navrhovaného mechanismu je uvedeno na obr. 16.



Obr. 16: Navrhovaný mechanismus modifikace DNA indukované *o*-aminofenolem v prostředí iontů mědi⁵³, Cu(I)-OOH je tzv. ternární komplex

Význam iontů mědi v interakci s *o*-aminofenolem souvisí s faktem, že měď má schopnost katalyzovat produkci reaktivních forem kyslíku a podporovat tak oxidativní změny DNA. To umocňuje ještě fakt, že se měď nachází v jádře savčích buněk^{58,59,60}. Tento poznatek přispívá k předpokladu, že změny DNA jsou způsobeny produkcí reaktivních forem kyslíku právě interakcí *o*-aminofenolu s ionty mědi⁵³.

o-Aminofenol však může být také substrátem enzymatické přeměny zprostředkované buď tyrosinase nebo některými hemovými peroxidasami. *o*-Aminofenol a jeho deriváty podléhají oxidaci v prostředí tyrosinasy na *o*-chinon iminy⁶¹. Tyrosinasa je monooxygenasa obsahující měď, která katalyzuje hydroxylaci fenolů v poloze *ortho* a oxidaci *o*-difenolů na *o*-chinony⁶². V prostředí křenové peroxidasy je *o*-aminofenol oxidován na *o*-aminofenoxylový radikál z něhož dále vzniká také *o*-chinon imin, jako v případě tyrosinasy a neenzymatické přeměny v přítomnosti Cu^{II} iontů (viz výše). Jako finální produkt vzniká netoxický stabilní 2-amino-3H-fenoxazin-3-on (APX)⁶³. Vznik takovéto stabilní sloučeniny se ukázal být výhodný v souvislosti s čištěním odpadních vod, ve kterých se *o*-aminofenol vyskytuje jako odpadní průmyslový produkt^{64,65}. Zjednodušený model oxidace *o*-aminofenolu⁶³ je uveden na obr. 17.



Obr. 17: Schématické znázornění oxidačních kroků oxidace *o*-aminofenolu; HRP-*křenová peroxidasa*, *o*-AP – *o*-aminofenol, APX - 2-amino-3H-fenoxazin-3-on⁶³

4. Návrh řešení a vysvětlení neobjasněných otázek ohledně biotransformace *o*-nitroanisolu a *o*-anisidinu

4.1. Problematika detekce N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu při oxidaci *o*-anisidinu cytochromy P450

Tato kapitola se bude zabývat především metabolismem *o*-anisidinu cytochromy P450, zejména pak problematikou detekce jeho produktu N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu.

N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin se tvoří oxidací *o*-anisidinu cytochromy P450^{21,41,42} (kapitola 3.1.2.2.) ale také redukcí *o*-nitroanisolu reduktasami (xanthin oxidasou a DT-diaforasou) v anaerobním prostředí^{26,39} (kapitola 3.1.1.2.). V případě redukční reakce s detekcí produktu problémy nejsou, narozdíl od oxidace *o*-anisidinu cytochromy P450. N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin pravděpodobně podléhá degradaci v aerobním prostředí nebo se účastní cyklické redoxní reakce, čímž je zkomplikována kvantifikace tohoto produktu (viz kapitola 3.1.2.2.). V případě degradace v aerobním prostředí obsahujícím mikrosomální systém vyvstává ještě otázka, zda rozpad vznikajícího produktu *o*-anisidinu souvisí s působením kyslíku nebo aerobně působících enzymů v reakční směsi.

4.1.1. Návrh řešení problematické detekce N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu

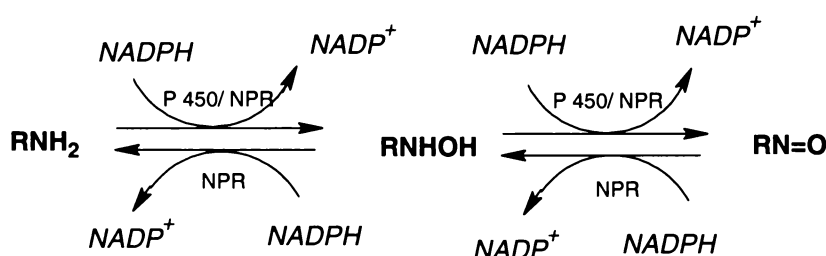
- Cyklická redoxní reakce heterocyklických aromatických aminů a její možná analogie s *o*-anisidinem

Heterocyklické aromatické aminy jsou zde zmíněny v možné souvislosti jejich chemických vlastností s vlastnostmi *o*-anisidinu. Zejména je možná analogie cyklické redoxní reakce heterocyklických aromatických aminů při metabolismu cytochromy P450 s cyklickými oxidačně-redukčními reakcemi *o*-anisidinu (uvedeno v kapitole 3.1.2.2.). To by vysvětlovalo nesnadnou kvantifikaci produktů takového metabolismu.

Heterocyklické aromatické aminy vznikají jako produkt pyrolytických reakcí, ku příkladu přepalováním masa během jeho smažení či také při kouření cigarety^{15,66,67} a

spousta z nich je potenciálními bakteriálními mutageny a potenciálními lidskými karcinogeny^{15,67,68,69}. Jsou aktivovány N-oxidačními reakcemi, které jsou katalyzovány cytochromy P450 1A2 a též izoenzymy 1A1 a 1B1 na mutagenní či karcinogenní meziprodukty^{67,70-74}.

Skupina Donghaka a Guengeriche se zabývala zkoumáním přeměny heterocyklického aromatického aminu 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolinu (IQ) prostřednictvím cytochromu P450 1A2 a NADPH:P450 reduktasy⁶⁷. Byla sledována spotřeba NADPH, přičemž závislost této spotřeby na čase vykazovala sigmoidální závislost. Meziproduktem reakce byl hydroxylamin (IQ-NHOH), jehož další oxidací vznikl nitroso derivát výchozí látky (IQ-N=O)⁶⁷. Redukce obou produktů nevyžadovala přítomnost cytochromů P450, pouze NADPH:P450 reduktasy, za současné další spotřeby NADPH. Předpokládané schéma tohoto mechanismu cyklické redoxní reakce je uvedeno na obr. 18.

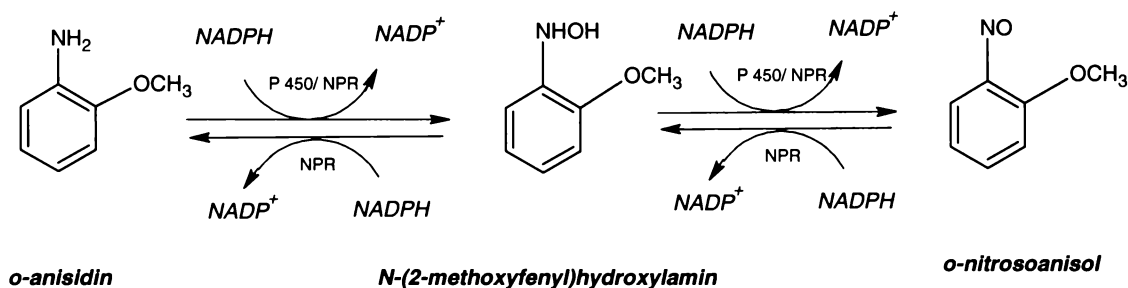


Obr. 18: Obecné schéma cyklické redoxní reakce heterocyklických aromatických aminů⁶⁷; P450 značí cytochromy P450, NPR = NADPH:P450 reduktasa, R je obecný heterocyklický aromatický zbytek

Kdyby probíhala pouze oxidace (v uvedeném schématu směrem doprava), byla by spotřeba NADPH v čase lineární závislostí. Pokud však probíhá i redukce dle uvedeného schématu cyklické redoxní reakce, je celková závislost spotřeby na čase sigmoidální závislostí.

Analogicky k uvedeným skutečnostem můžeme navrhnout cyklické redoxní reakce přeměny *o*-anisidinu, viz obr. 19, str. 41. Pro důkaz, zda probíhá redoxní cyklus *o*-anisidinu při jeho oxidaci cytochromy P450 navrhovaným mechanismem by bylo třeba sledovat závislost spotřeby NADPH v čase. Pokud by tato závislost byla sigmoidální, vyplývalo by, že redoxní cyklus se při oxidaci *o*-anisidinu uplatňuje.

Bude-li však závislost lineární, pak k reakci redoxním cyklem nedochází, anebo reakce probíhá jiným mechanismem (bez účasti NPR).



Obr. 19: Teoretický navrhovaný mechanismus cyklické redoxní reakce přeměny *o*-anisidinu v prostředí NADPH podle analogie s reakcí heterocyklických aromatických aminů⁶⁷; P450 značí cytochromy P450, NPR = NADPH:P450 reduktasa

4.1.2. Návrh řešení problematické detekce *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu

- Spektrofotometrické stanovení

Druhá metoda, která by mohla být klíčovou pro kvantifikaci produktu oxidace *o*-anisidinu, *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu, vychází ze stanovení *N*-hydroxylace heterocyklických aminů, prezentované v práci Kima a Guengeriche⁷⁵. Jedná se o citlivou metodu používanou právě v případě nestabilních aryl *N*-hydroxylaminů⁷⁵.

Doposud byla ke kvantifikaci *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu používána metoda HPLC. Tato metoda je ale zdlouhavá (řádově desítky až stovky minut), přičemž není možné vyvíjet současně více paralelních vzorků či volit podmínky, při kterých se bude provádět (např. teplota). Kolorimetrická metoda, kterou se zabývá tato kapitola, je méně časově náročná (řádově sekundy), umožňuje provádět současně několik reakcí a též volit podmínky reakce. Zejména díky rychlosti tohoto stanovení bude možné se pokusit předejít degradaci *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu v reakční směsi.

Reakční směs podle Kima a Guengeriche⁷⁵ se skládá z těchto složek: 0,1 μM P450, odpovídající koncentrace NADPH:P450 reduktasy, 100 mM pufru fosforečnanu draselného o pH 7,4 a systém generující NADPH, tj. 0,5 mM NADP^+ , 10 mM glukosa-

6-fosfátu a 1,0 IU glukosa-6-fosfát dehydrogenasy mL^{-1} . V systému se dále nachází proměnná koncentrace substrátu v celkovém objemu 0,5 mL. Tato reakce probíhá 10 minut při 37°C, poté je reakce zastavena přidáním dvou dílů dichlormethanu a produkty reakce jsou extrahovány. Poté je extrakt vysušen pomocí dusíku. Extrakt je znovu rozpuštěn přidáním 200 μL *Batho* roztoku (složení: 40 mM octanu sodného, 60 mM kyseliny octové, 20% ní vodou saturovaný pentyl ethanoát, 1 mM 4,7-difenyl-1,10-fenantrolinu, 0,4 mM chloridu železitého). Po 3 minutách je barevná reakce ukončena přidáním kyseliny fosforečné a ihned je měřena absorbance při 535 nm⁷⁵.

Principem této metody je redukce železitých Fe^{3+} iontů N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminem, přičemž jeden ekvivalent N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu připadá na redukci dvou ekvivalentů železitých kationtů⁷⁵. Železnaté ionty pak tvoří barevný komplex s 4,7-difenyl-1,10-fenantrolinem. Absorpční maximum vzniklého komplexu je při vlnové délce 535 nm a extinkční koeficient $\epsilon_{535} = 39200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

5. Závěr

Předkládaná práce je rešerší dosavadních výsledků vědeckých bádání, týkajících se potenciálních lidských karcinogenů *o*-nitroanisolu a *o*-anisidinu (schéma souhrnného metabolismu obou látek viz obr. 20, str. 44).

1) *o*-Nitroanisol je oxidován cytochromy P450, tato biotransformace je detoxikační. Vzniká 2,5-dihydroxynitrobenzen, 2,6-dihydroxynitrobenzen a 2-nitrofenol.

2) *o*-Nitroanisol je anaerobně redukován reduktasami XO a DT-diaforasou, tato dráha je aktivační, produktem je N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin, který tvoří kovalentní adukty s dG.

3) *o*-Anisidin je metabolizován peroxidasami HRP, PHS a laktoperoxidasou, dráha je aktivační, produkt diimin je schopen modifikace DNA. Radikály *o*-anisidinu zasahují do promoční a progresní fáze karcinogenese.

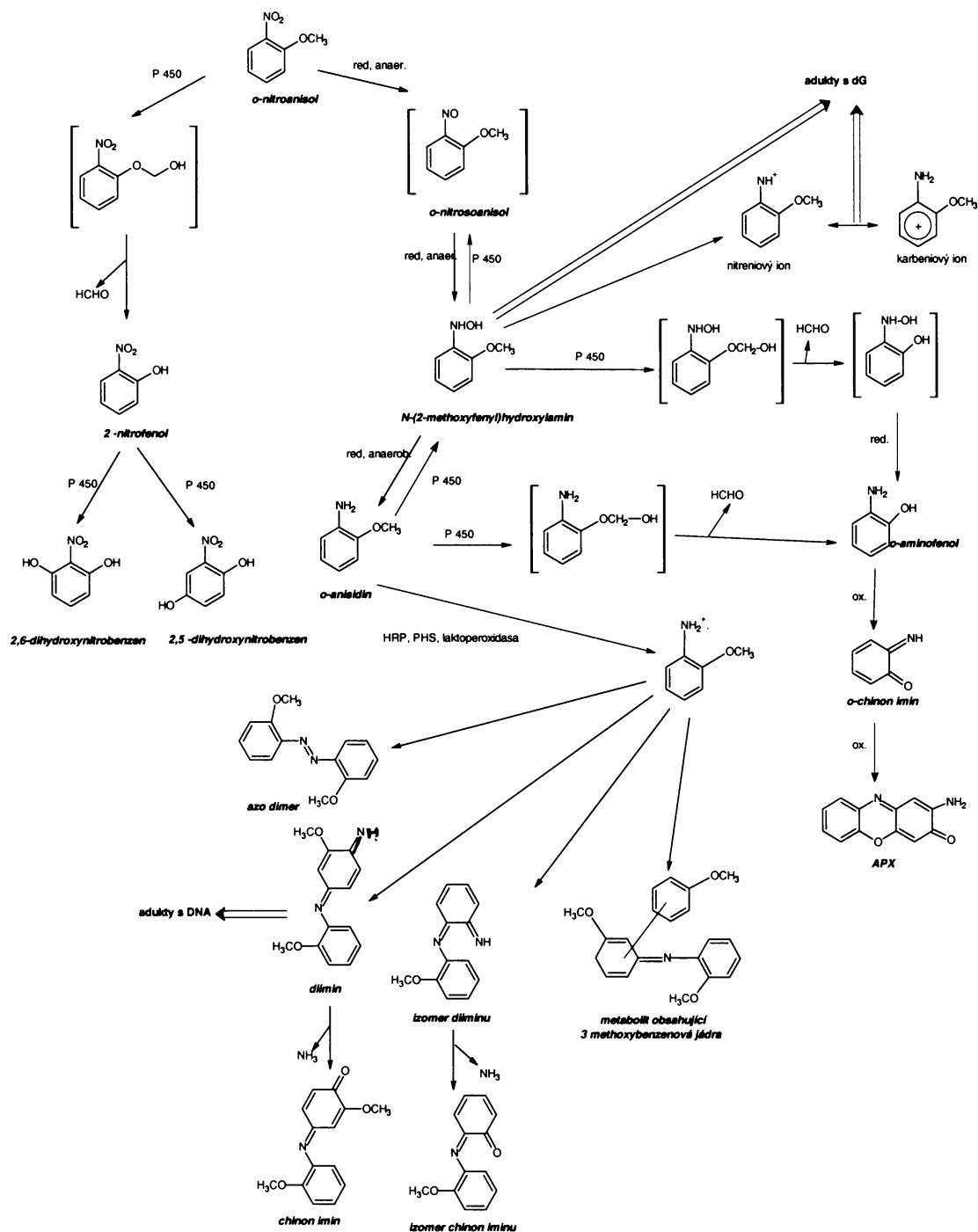
4) *o*-Anisidin je oxidován cytochromy P450, aktivační dráha, vznik N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin, který tvoří kovalentní adukty s dG. Též vzniká *o*-aminofenol.

5) *o*-Aminofenol je neenzymatickou cestou oxidován ionty mědi na *o*-aminofenoxylový radikál, a ten dále na *o*-chinon imin; zároveň se tvoří reaktivní formy kyslíku způsobující poškození DNA. Enzymaticky je *o*-aminofenol přeměňován peroxidasami nebo tyrosinase na *o*-chinon imin. Následná přeměna na stabilní produkt 2-amino-3H-fenoxazin-3-on (APX) zřejmě není enzymaticky katalyzována.

Tato práce také předkládá teoretický návrh možného řešení problematické detekce N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu jako produktu oxidace *o*-anisidinu cytochromy P450:

1) Ověření, zda na aminoskupině neprobíhá redoxní cyklus - měření spotřeby NADPH v čase při oxidaci *o*-anisidinu cytochromy P450.

2) Rychlé spektrofotometrické stanovení N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu.



Obr. 20: Schematické znázornění souhrnného metabolismu *o*-NA a *o*-A; hranaté závorky označují nestabilní produkty, red., anaer. vyjadřuje redukcí za anaerobních podmínek, ox. vyjadřuje oxidaci, dG = deoxyguanosin, P450 značí reakci v přítomnosti cytochromů P450, APX - 2-amino-3H-fenoxazin-3-on^{18 27,32,36,42}

6. Přehled použité literatury

1. M. Stiborová, Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace (staženo 26.3.2007)
<<http://teacher.vscht.cz/dokumenty/download/sbornik2005.pdf>>
2. Martínková, M.: osobní sdělení
3. Chromá, L., Macková, M., Macek, T., Martínek, V., Stiborová, M.: Chem. Listy 95, 212-222 (2001)
4. Stiborová, M., Mikšanová, M., Martínek, V., Frei E.: Collect. Czech. Chem. Commun. (Vol. 65) 297-323 (2000)
5. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: Chemické Listy 93, 229-237 (1999)
6. Gut, I., Souček, P., Hodek, P.: Pracovní lékařství 1, 15-20 (1992)
7. Mueller, G. C., Miller, J. A.: J. Biol. Chem. 180, 1125-1136 (1949)
8. Mueller, G. C., Miller, J. A.: J. Biol. Chem. 202, 579-588 (1953)
9. Axelrod, J.: Pharmacol 114, 430-438 (1955)
10. Brodie, B., Axelrod, J., Cooper, J. R., Gaudette, B. N. La Du, C., Mitoma, S., Udenfriend, S.: Science 121, 603-604 (1955)
11. Garfinkel, D: Arch. Biochem. Biophys. 77, 493-509 (1958)
12. Klingenberg, M.: Arch. Biochem. Biophys. 75, 376-386 (1958)
13. Omura, T., Sato, R.: J. Biol. Chem. 239, 2370-2379 (1964)
14. Omura, T., Sato, R.: J. Biol. Chem. 239, 2379-2385 (1964)
15. Sugimura, T.: Cancer 49, 1970-1984 (1982)
16. Voet, D., Voet, J. G.: v knize Biochemistry, Victoria Publishing, London, str. 851-852 (1990)
17. Vasiliou, V., Ross, D., Nebert, D.W.: Hum Genomics 2, 329-35 (2006)
18. Mikšanová, M., Šulc, M., Rýdlová, H., Schmeiser, H. H., Frei, E., Stiborová, M.: Chem. Res. Toxicol. 17, 663-671 (2004)
19. Garner, R.C., Martin, C. N., Clayson, D. B.: Carcinogenic aromatic amines and related compounds, v knize Chemical Carcinogenesis 2nd ed. (Searle, C. ed.) Washington DC, sv. 1, str. 175-302 (1984)

20. International Agency for Research in Cancer (IARC): Diesel and Gasoline Exhausts and Some Nitroarenes, sv. 46, Lyon (1989)
21. Rýdlová, H., Mikšanová, M., Ryšlavá, H., Stiborová, M.: Biomed Pap. 149, 441-447 (2005)
22. NTP Technical Report: Toxicology and carcinogenesis, Studies of *o*-Nitroanisole, č. 416, National Institute of Health, Bethesda, MD (1993)
23. Hengsler, J. G., Fuchs, J., Bolmaudorff, U., Meyer, S., Oesch, F.: Scand. J. Work Environ. Health 21, 36-42 (1995)
24. Sabbioni G., Jones C.R.: Biomarkers 7, 347-421 (2002)
25. NTP Technical Report: Bioassay of *o*-Anisidine Hydrochloride for Possible Carcinogenicity, National Cancer Institute, Bethesda, MD (1978)
26. Stiborová, M., Mikšanová, M., Smrček, S., Bieler, Ch. A., Breuer, A., Klokow, K. A., Schmeiser, H. H., Frei, E.: Carcinogenesis 25, 833-840 (2004)
27. Stiborová, M., Mikšanová, M., Havlíček, V., Schmeiser, H. H., Frei, E.: Mutation Research 500, 49-66 (2002)
28. Miller, M. J., Sipes, I. G., Perry, D. F., Carter, D. E.: Drug Metab. Dispos. 13, 527-531 (1985)
29. Dračínská, H., Mikšanová, M., Svobodová, M., Smrček, S., Frei, E., Schmeiser, H. H., Stiborová, M.: Neuro Endocrinol Lett 27/2, 9-13 (2006)
30. Svobodová, M., Dračínská, H., Martínková, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E., Stiborová, M.: Interdisc Toxicol. 1(2), 182-185 (2008)
31. Rendic, S., DiCarlo, F. J.: Drug Metab. Rev. 29, 413-480 (1997)
32. Mace, K., Bowman, E. D., Vautravers, P., Shields, P. G., Harris, C. C., Pfeifer, A. M. A.: Eur. J. Cancer 34, 914-920 (1998)
33. Landi, M. T., Sinha, R., Lang, N. P., Kandlubar, F. F.: Human cytochrome P450 1A2, v knize Metabolic Polymorphism and Susceptibility to Cancer (IARC Scientific Publication, No. 148), Lyon, str. 173-195 (1999)
34. Guengerich, F. P., Parikh, A., Turesky, R. J., Josephy, P. D.: Mutat. Res. 428, 115-124 (1999)
35. Kato, S., Shields, P. G., Caporaso, N. E., Sugimura, H., Trievers, G. E., Tucker, M. A., Trump, B. F., Weston, A.: Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev. 3, 515-518 (1994)
36. Perera, F. P.: Science 278, 1068-1073 (1997)
37. <<http://biol.lf1.cuni.cz/ucebnice/slovník.htm>> (staženo 8.5.2007)

38. Kadlubar, F. F., Badawi, A. F.: *Toxicol. Lett.* 82 627-632 (1995)
39. Mikšanová, M., Novák, P., Frei, E., Stiborová, M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 69 589-602 (2004)
40. International Agency for Research in Cancer (IARC): *Ortho- and Para-anisidine and their hydrochlorides*, sv. 27, Lyon (1982)
41. Stiborová, M., Mikšanová, M., Šulc, M., Rýdlová, H., Schmeiser, H. H., Frei, E.: *Int. J. Cancer* 116, 667-678 (2005)
42. Naiman, K., Dračínská, H., Martínková, M., Šulc, M., Dračínský, M., Kejíková, L., Hodek, P., Hudeček, J., Liberda, J., Schmeiser, H. H., Frei, E., Stiborová, M.: *Chem Res. Toxicol.* 21, 1610-1621 (2008)
43. Eling, T. E., Thompson, D. C., Foureman, G. L., Curtis, J. F., Hughes, M. F.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 30, 1-45 (1990)
44. Eling, T. E., Curtis, J. F.: *Pharm. Ther.* 53, 261-273 (1992)
45. O'Brien, P.: *Free Radical Biol. Med.* 4, 169-183 (1988)
46. Smith, J. N., Williams, R. T.: *Biochem. J.* 44 250-255 (1949)
47. Schmidt, H. L., Möller, M. R., Weber, N.: *Biochem. Pharmacol.* 22, 2989-2996 (1973)
48. International Agency for Research in Cancer (IARC): *Formaldehyde, 2-butoxyethanol a 1-terc-butoxypropan-2-ol*, sv. 88, 39-325, Lyon (2006)
49. Kiese, M., Rachor, M.: *Arch. Exp. Path. Pharmacol.* 249, 225-236 (1964)
50. Kiese, M., Weger, N.: *Eur. J. Pharmacol.* 7, 97-105 (1969)
51. Akazawa, M., Takasaki, M., Tomoda, A.: *Tohoku J. Exp. Med.* 192, 301-312 (2000)
52. Kirchner, G., Bayer, U.: *Hum. Toxicol.* 1, 387-392 (1992)
53. Ohkuma, Y., Kawanishi, S.: *Arch. Biochem. Biophys.* 389, 49-56 (2001)
54. Yamamoto, K., Kawanishi, S.: *J. Biol. Chem.* 264, 15435-15440 (1989)
55. Sagripanti, J. L., Kraemer, K. H.: *J. Biol. Chem.* 264, 1729-1734 (1989)
56. Aruoma, O. I., Halliwell, B., Gajewski, E., Dizdaroglu, M.: *Biochem. J.* 273, 601-604 (1991)
57. Stoewe, R., Prutz, W. A.: *Free Radical Biol. Med.* 3, 97-105 (1987)
58. Liang, R., Senturker, S., Shi, X., Bal, W., Dizdaroglu, M., Kasprzak, K., S.: *Carcinogenesis* 20, 893-898 (1999)
59. Guyton, K. Z., Kensler, T. W.: *Br. Med. Bull.* 49, 523-544 (1993)

60. Okhuma, Y., Hiraku, Y., Oikawa, S., Yamashita, N., Murata, M., Kawanishi, S.: Arch. Biochem. Biophys. 372, 97-106 (1999)
61. Toussaint, O., Lerch, K.: Biochemistry 26, 8567-8571 (1987)
62. Mason, H. S.: Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 19, 79-223 (1957)
63. Puiu, M., Raducan, A., Babaligea, I., Oancea, D.: Bioprocess Biosyst. Eng. 31, 579-586 (2008)
64. Horvath, T., Kaizer, J., Speier, G.: J. Mol. Cat. A. Chem. 215, 9-15 (2004)
65. Simandi, T., Simandi, L. I., Gyor, M., Rockenbauer, A., Gomory, A.: Dalton Trans. 7, 1056-1060 (2004)
66. Sugimura, T. Cancer Lett. 114, 3-5 (1997)
67. Donghak, K., Kandlubar, F. F., Candee, H. T., Guegenerich F. P.: Chem. Res. Toxicol. 17, 529-536 (2004)
68. Felton, J.S., Knize, M., Shen, N.H., Wu, R., Becher, G.: Mutagenic heterocyclic imidazoamines in cooked foods, v knize Carcinogenic and Mutagenic Responses to Aromatic Amines and Nitroarenes, Elsevier, New York, str. 73-85 (1988)
69. Wakabayashi, K., Nagao, M., Esumi, H., Sugimura, T.: Cancer Res. 52, 2092-2098 (1992)
70. Butler, M. A., Iwasaki, M., Guengerich, F. P., Kandlubar, F.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 7696-7700 (1989)
71. Shimada, T., Iwasaki, M., Martin, M. V., Guengerich, F.P.: Cancer Res. 49, 3218-3228 (1989)
72. McManus, M. E., Burgess, W. M., Veronesse, M. E., Hugett, A., Quattrochi, L. C., Turkey, R.H.: Cancer Res. 50, 3367-3376 (1990)
73. Shimada, T., Hayes, C.L., Yamazaki, H., Amin, S., Hecht, S. S., Guengerich, F. P., Sutter, T.R.: Cancer Res. 56, 2979-2984 (1996)
74. Turesky, R.J., Constable, A., Richoz, J., Vargu, N., Markovic, J., Martin, M. V., Guengerich, F. P.: Chem. Res. Toxicol. 11, 925-936 (1998)
75. Kim, D., Guengerich, F. P.: Biochemistry 43, 981-988 (2004)

