

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biochemie

Studijní obor: Biochemie



Eliška Brabencová

Studium interakce cytochromů P450 s potravními karcinogeny
Study of cytochrome P450 interaction with dietary carcinogens

Bakalářská práce

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

Praha, 2011

Prohlášení:

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

V Praze, 1.6. 2011

Podpis

Ráda bych poděkovala svému školiteli panu prof. RNDr. Petru Hodkovi CSc. za cenné rady, ochotu a čas, který mi při vypracování bakalářské práce věnoval.

Abstrakt

Během života na nás působí různé karcinogenní látky. Jedním z hlavních zdrojů těchto látek je potrava, která hraje významnou roli v procesu vzniku nádorových onemocnění. V této práci jsou popsány karcinogeny vznikající při technologickém zpracování potravin či při jejich tepelné úpravě - polycyklické aromatické uhlovodíky, heterocyklické aminy a nitrosaminy, dále karcinogeny produkované plísněmi - mykotoxiny a karcinogeny produkované rostlinami - safrol, estragol a pyrrolizidinové alkaloidy. Na metabolismu karcinogenů se podílí řada enzymů, mezi nejdůležitější patří cytochromy P450. Tyto enzymy představují velkou rodinu hemthiolátových proteinů, které se významně podílí na metabolismu mnoha cizorodých látek (např. karcinogenů, léčiv, polutantů). Cytochromy P450 katalyzují reakce, které vedou především k detoxikaci látek. Vedle těchto detoxikačních reakcí může však docházet k metabolické aktivaci xenobiotik na látky s vyšší toxicitou. Cytochromy P450 se významně podílí na aktivaci karcinogenů na reaktivní elektrofilní látky, které mohou poškozovat DNA. Mechanismy metabolické aktivace uvedených karcinogenů jsou předmětem této práce.

Klíčová slova: cytochromy P450, karcinogeneze, potravní karcinogeny

Abstract

Humans are exposed to various carcinogens during their life. One of the main sources of carcinogens is a human diet which plays an important role in the cancer development. This bachelor thesis deals with carcinogens that are formed during a technological food processing or cooking of food - polycyclic aromatic hydrocarbons, heterocyclic amines and nitrosamines, then carcinogens produced by fungi - mycotoxins, and carcinogens that are produced by plants - safrole, estragole and pyrrolizidine alkaloids. Among numerous enzymes involved in metabolism of carcinogens, cytochromes P450 belong to the most important ones. These enzymes constitute a superfamily of haem-thiolate proteins, which is significantly involved in the metabolism of many foreign compounds (e.g. carcinogens, drugs, pollutants). Cytochromes P450 catalyze mainly reactions leading to detoxification of harmful compounds. Besides these reactions, the metabolic activation of compounds to more toxic products may occur. Cytochromes P450 play an important role in the activation of carcinogens to reactive electrophiles causing DNA damage. The subject of this bachelor thesis is to show mechanisms of metabolic activation of carcinogens.

Key words: cytochromes P450, carcinogenesis, food carcinogens

(In Czech)

Obsah

Seznam použitých zkratk	8
1 Úvod	10
2 Cíl práce	11
3 Metabolismus xenobiotik	12
3.1 I. fáze biotransformace	12
3.2 II. fáze biotransformace	13
3.3 Aktivace xenobiotik	14
4 Cytochrom P450	15
4.1 Nomenklatura	15
4.2 Lokalizace	16
4.3 Evoluce	16
4.4 Struktura	17
4.5 Funkce a reakční cyklus cytochromů P450	19
4.6 Indukce	21
4.6.1 AhR	22
4.6.2 CAR, PXR, PPAR α	23
4.7 Inhibice cytochromů P450	23
5 Karcinogeneze	25
5.1 Mechanismus chemické karcinogeneze	28
6 Potravní karcinogeny	29
6.1 Heterocyklické aminy	30
6.1.1 PhIP	32
6.2 Polycyklické aromatické uhlovodíky	33
6.2.1 Benzo[a]pyren	35
6.3 N-nitrosaminy	36
6.4 Mykotoxiny	38
6.4.1 Aflatoxiny	39
6.4.2 Aflatoxin B ₁	39
6.5 Karcinogeny produkované rostlinami	41

6.5.1	Safrol a estragol	41
6.5.2	Pyrrrolizidinové alkaloidy.....	43
7	Závěr.....	46
	Seznam použité literatury	47

Seznam použitých zkratek

AhR	receptor pro aromatické uhlovodíky („aryl hydrocarbon receptor”)
Arnt	jaderný heterodimerizační partner Ah receptoru („Ah receptor-nuclear translocator”)
A α C	2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indol
BaP	benzo[a]pyren
BPDE	benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid
CAR	konstitutivní androstanový receptor („constitutive androstane receptor“)
CYP	cytochrom P450
dA- <i>N</i> ⁶ -BPDE	benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid- <i>N</i> ⁶ -deoxyadenosin
dG- <i>N</i> ² -BPDE	benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid- <i>N</i> ² -deoxyguanosin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
FAD	flavinadenindinukleotid oxidovaný
FMN	flavinmononukleotid oxidovaný
Glu-P-1	2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
Glu-P-2	2-aminodipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazol
GSH	glutathion redukovaný
HA	heterocyklické aminy
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny („International Agency for Research on Cancer”)
IQ	2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin
MeA α C	2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indol
MeIQ	2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]chinolin
MeIQ _x	2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin
MFO	systém monooxygenas se smíšenou funkcí („mixed function oxygenases”)
NAD ⁺ (NADH)	nikotinamidadenindinukleotid oxidovaný (redukovaný)
NADP ⁺ (NADPH)	nikotinamidadenindinukleotidfosfát oxidovaný (redukovaný)
NDEA	<i>N</i> -nitrosodiethylamin
NDMA	<i>N</i> -nitrosodimethylamin

NHR	jaderný hormonální receptor („nuclear hormone receptor“)
NPIP	<i>N</i> -nitrosopiperidin
NPRO	<i>N</i> -nitrosoprolin
NPYR	<i>N</i> -nitrosopyrrolidin
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PAS	Per („Period“)- Arnt („Ah receptor-nuclear translocator“)- Sim („Single minded“)
PhIP	2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-b]pyridin
PhIP-C8-dG	<i>N</i> -(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-b]pyridin
PPAR α	receptor, který je aktivován proliferátorem peroxisomu („peroxisome proliferator activated receptor“)
PXR	pregnanový X receptor („pregnane X receptor“)
P450 _{nor}	NO reduktasa („nitric oxide reductase“)
RH	substrát - obecný uhlovodík
RNA	ribonukleová kyselina
ROH	oxygenovaná forma substrátu
ROS	reaktivní formy kyslíku („reactive oxygen species“)
(R/S)DHP	(R/S)-6,7-dihydro-7-hydroxy-1-hydroxymethyl-5H-pyrrolizin
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzyzo- <i>p</i> -dioxin
Trp-P-1	3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indol
Trp-P-2	3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indol
UDP	uridindifosfát
UV	ultrafialové záření
XOOH	peroxosloučenina

1 Úvod

Nádorová onemocnění jsou jednou z nejčastějších příčin úmrtí lidí na celém světě. Vznik nádoru je mnohastupňový proces, na kterém se podílí jak vnitřní, tak vnější faktory (Hodek a kol., 2009). Pouze 5-10% všech případů rakoviny je způsobeno genetickými defekty, zatímco zbylých 90-95% environmentálními faktory a životním stylem (strava, kouření, konzumace alkoholu, znečištěné životní prostředí atd.) (Anand a kol., 2008). V hospodářsky vyspělých státech se na vzniku nádorových onemocnění podílí hlavně nevhodná strava složená z potravin s převahou tuků a cukrů, velkého podílu živočišných a malého podílu rostlinných potravin (luštěnin, ovoce a zeleniny) (Stratil a Kubáň, 2004).

Během života na nás působí mnoho různých karcinogenů, právě potravou přijímáme řadu mutagenních a karcinogenních látek. Některé se vyskytují v potravinách přirozeně, jako např. mykotoxiny produkované plísněmi, jiné mohou vznikat během výroby či tepelné úpravy potravin (např. heterocyklické aminy). Tyto cizorodé látky, xenobiotika, jsou v těle metabolizovány řadou enzymů. Mezi klíčové enzymy biotransformace patří cytochromy P450, které jsou v poslední době velmi intenzivně studovány (Stiborová a kol., 1999). Cytochromy P450 představují velkou skupinu enzymů obsahujících ve své struktuře hem b. Podílí se na metabolismu mnoha cizorodých látek (např. karcinogenů, léčiv, polutantů) (Hodek a kol., 2002). Cytochromy P450 katalyzují reakce 1. fáze biotransformace cizorodých látek, které vedou především k jejich detoxikaci. Vedle detoxikačních reakcí však může docházet také k metabolické aktivaci, a mohou tak vznikat sloučeniny s vyšší toxicitou než původní molekuly. Cytochromy P450 jsou jedny z nejvýznamnějších enzymů, které se podílí na aktivaci karcinogenů (Stiborová a kol., 1999).

2 Cíl práce

V potravě se vyskytuje řada karcinogenních látek. Většina z nich jsou prokarcinogeny, které musí být nejprve metabolicky aktivovány, aby vykazovaly mutagenní či karcinogenní účinky. Cílem této bakalářské práce bylo podat informace o různých karcinogenních látkách, které se vyskytují v potravě. A to o karcinogenech, které vznikají při technologickém zpracování potravin či při jejich tepelné úpravě, a také o karcinogenech produkovaných rostlinami a plísněmi. Předmětem této práce bylo studování mechanismu metabolické aktivace jednotlivých karcinogenů a úlohy cytochromů P450, jakožto hlavních enzymů, které se na ní podílí.

3 Metabolismus xenobiotik

Xenobiotika, látky tělu cizorodé, jsou sloučeniny, které se v organismu normálně nevyskytují, nejsou nutné pro vývoj organismu a neslouží ani jako zdroj energie (Knejzlík a kol., 2000). Mezi xenobiotika patří např. různé toxikanty, karcinogeny a léčiva. Jedná se o látky, které jsou pro organismus mnohdy potenciálně škodlivé, organismus se proto snaží tyto látky odbourat pomocí mechanismů vedoucích k pozměnění jejich chemické struktury za vzniku produktů, které se dají z organismu snadno vyloučit.

Metabolická přeměna xenobiotik do jisté míry závisí na polaritě. Hydrofilní látky jsou z organismu vylučovány zpravidla poměrně snadno. V případě hydrofobních látek může docházet k jejich kumulaci v organismu, jelikož mohou procházet membránami. Tyto hydrofobní látky nemohou být většinou z těla vyloučeny přímo, nejprve musí být přeměněny na látky s vyšší polaritou (Stiborová, 2005).

Během evoluce se u jednotlivých organismů vyvinula řada detoxikačních mechanismů. Rozlišujeme dvě hlavní fáze biotransformace cizorodých látek:

- I. fáze biotransformace - derivatizační
- II. fáze biotransformace – konjugační.

Hlavním místem biotransformace jsou především játra (dále pak ledviny, plíce atd.). Na metabolismu xenobiotik participuje mnoho enzymových systémů, většina z nich je lokalizována v membránách endoplazmatického retikula nebo v cytosolu (Ioannides, 2001).

3.1 I. fáze biotransformace

V první fázi biotransformace, nazývané též derivatizační fáze, dochází ke zvýšení hydrofility xenobiotika zavedením (nebo odkrytím) polárních skupin (např. skupin -OH, -SH a -NH₂). K tomu dochází především prostřednictvím reakcí oxidačních, dále redukčních a také reakcí hydrolytických, při nichž dochází k odkrytí polárních skupin. Příklady jednotlivých reakcí:

- oxidační reakce: např. alifatická a aromatická hydroxylace, dealkylace, deaminace, tvorba epoxidů, sulfoxidace (Knejzlík a kol., 2000; Hodgson, 2004)

- redukce: např. azoredukce a nitroredukce (Hodgson, 2004)
- hydrolytické reakce: např. hydrolyza esterů, amidů (Ioannides, 2001).

Uvedené reakce modifikují molekulu xenobiotika tak, aby mohla podstoupit konjugační reakce v II. fázi biotransformace.

Mezi enzymy, které se účastní I. fáze biotransformace, patří zejména cytochromy P450 (viz kapitola 4). Dále jsou to např. flavinové monooxygenasy, peroxidasy, monoaminoxidasy, alkoholdehydrogenasa, aldehyddehydrogenasa a hydrolasy (Beedham, 1997; Hodgson, 2004).

II. fáze biotransformace

Během druhé fáze biotransformace dochází ke konjugačním reakcím, při nichž reagují xenobiotika s endogenní sloučeninou za vzniku konjugátu, který je obvykle více hydrofilní než původní látka (Knejzlík a kol., 2000). Aby mohla cizorodá látka podstoupit konjugační reakci, musí ve své molekule obsahovat skupinu vhodnou pro reakci s konjugačním činidlem. Tato skupina se buď vytvoří během první fáze biotransformace, nebo ji xenobiotikum ve své struktuře již obsahuje (může tedy vynechat derivatizační fázi biotransformace a podstoupit rovnou fázi konjugační) (Knejzlík a kol., 2000; Ioannides, 2001). Enzymy konjugační fáze biotransformace jsou převážně transferasy: UDP-glukuronosyltransferasy, sulfotransferasy, N-acetyltransferasy, glutathion-S-transferasy a různé methyltransferasy (Jancová a kol., 2010). Mezi konjugační reakce druhé fáze biotransformace (Knejzlík a kol., 2000) patří:

- konjugace s kyselinou glukuronovou (glukuronidace)
- sulfatace, methylace, acetylace
- konjugace s glutathionem
- konjugace s aminokyselinou (např. s glycinem).

Konjugačními reakcemi druhé fáze biotransformace je usnadněna exkrece xenobiotik z organismu. Přeměněné xenobiotikum se z buněk dostává do krve a následně je z organismu vylučuje ve stolici, moči, potu a vydechaném vzduchu (Knejzlík a kol., 2000).

3.2 Aktivace xenobiotik

Jak bylo již uvedeno, v průběhu první a druhé fáze biotransformace dochází ke zvýšení hydrofility xenobiotika. Tyto hydrofilní metabolity však nemusí být jen netoxické látky. Místo detoxifikace xenobiotika totiž může nastat jeho aktivace. Metabolickou aktivací mohou vznikat sloučeniny s vyšší toxicitou než původní molekuly. Touto cestou je aktivováno mnoho genotoxických karcinogenů (tj. karcinogenů, které tvoří kovalentní adukty s DNA, viz kapitola 5).

Během I. i II. fáze biotransformace se mohou tvořit reaktivní elektrofilní intermediáty, které mohou následně interagovat s makromolekulami jako DNA, RNA či proteiny (Ioannides, 2001). Příkladem reaktivních metabolitů jsou epoxidy, radikály, karbeniové nebo nitreniové ionty. Tyto velmi reaktivní elektrofilní skupiny mohou atakovat nukleofilní centra DNA, a vytvořit tak kovalentní adukty. Pokud adukty nejsou opraveny reparačními mechanismy, mohou způsobit mutace. Reaktivní elektrofilní skupiny mohou poškodit DNA i jiným způsobem. Jedná se o poškození reaktivní formou kyslíku (ROS neboli „reactive oxygen species“), jako např. velmi reaktivním hydroxylovým radikálem (Ioannides, 2001).

Mezi nejefektivnější mechanismy ochrany proti reaktivním intermediátům patří jejich detoxikace prostřednictvím konjugace s endogenními nukleofilními substráty, jako je tripeptid glutathion (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycin) (Ioannides, 2001). Tuto konjugační reakci katalyzuje enzym glutathion-S-transferasa, která je schopna vázat reaktivní intermediáty (zvláště epoxidy) a katalyzovat jejich vazbu s glutathionem (Stiborová, 2005). Vzniklý glutathionový konjugát může být vyloučen přímo nebo podstupuje další reakce a je vyloučen jako merkapturát (Ioannides, 2001).

Procesy detoxikační a aktivační od sebe nelze vzájemně oddělit. Stejný enzym může participovat na detoxikaci jedné chemické látky a zároveň zvyšovat toxicitu látky jiné. Mezi detoxikačními a aktivačními procesy existují složité vztahy rovnováhy, které mohou být v důsledku působení vnějších i vnitřních faktorů snadno posunuty na jednu či druhou stranu (Stiborová, 2005).

4 Cytochrom P450

Cytochromy P450 tvoří rozsáhlou skupinu hemthiolátových proteinů. Vyskytují se téměř u všech organismů od bakterií až po rostliny a živočichy. Hrají klíčovou roli v metabolismu jak některých hydrofobních endogenních substrátů (např. sterolů, mastných kyselin, prostaglandinů), tak xenobiotik (např. léčiv, karcinogenů, polutantů) (Hodek a kol., 2002). Typickou vlastností těchto hemoproteinů je jejich schopnost v redukovaném stavu vytvářet komplex s CO, který absorbuje při 450 nm, odtud tedy plyne název P450 (písmeno P označuje pigment) (Omura a Sato, 1962). Tím se odlišují od ostatních hemoproteinů, jejichž CO komplexy absorbují při nižší vlnové délce okolo 420 nm. Příčinou absorpce cytochromů P450 v oblasti okolo 450 nm je přítomnost neobvyklého ligandu železa v jejich struktuře – thiolátové síry (Danielson, 2002).

Jak již bylo řečeno (viz kapitola 3.1), cytochromy P450 se účastní reakcí 1. fáze biotransformace xenobiotik. Jejich substrátová specifita je poměrně široká, společnou vlastností substrátů je jejich hydrofobní charakter.

Cytochromy P450 obecně přeměňují xenobiotika na méně toxické produkty. Kromě těchto detoxikačních reakcí může však dojít i ke vzniku biologicky aktivnějších derivátů. Pozměnění struktury původní sloučeniny může mít jak pozitivní efekt, např. v případě vzniku aktivní formy léčiva, tak negativní efekt, v případě vzniku toxických, mutagenních či karcinogenních derivátů (Stiborová a kol., 1999).

4.1 Nomenklatura

Superrodina cytochromů P450 je rozdělena na základě podobnosti aminokyselinové sekvence do rodin a podrodin. Do stejné rodiny patří cytochromy P450, které mají sekvenční homologii větší než 40%. Do jedné podrodiny pak náleží ty cytochromy P450, které vykazují více než 55% shodu aminokyselinové sekvence (<http://drnelson.uthsc.edu/talks/P450lect.2009.pdf>). Označení každého cytochromu P450 se skládá ze zkratky CYP, za níž následuje arabská číslice označující rodinu (např. CYP1), dále písmeno značící podrodinu (např. CYP1B), poslední arabská číslice označuje

konkrétní enzym (CYP1B1). Tato současná nomenklatura byla zavedena Nerbterem a spolupracovníky (Nelson a kol., 1996).

V lidském genomu bylo doposud nalezeno 57 genů pro různé formy CYP, které jsou zařazeny do 18 rodin a 44 podrodin. Také bylo identifikováno 58 pseudogenů, tedy defektních genů, které neprodukují funkční protein (<http://drnelson.uthsc.edu/talks/P450lect.2009.pdf>).

Vedle metabolismu xenobiotik mají cytochromy P450 významnou roli v metabolismu endogenních substrátů, účastní se např. biosyntézy steroidních hormonů, prostaglandinů, vitamínu D a mastných kyselin. Z 18 rodin lidských CYP se na metabolismu xenobiotik podílí členové rodin CYP1, CYP2, CYP3 a v menší míře též CYP4 (Stiborová, 2005.). Ostatní rodiny CYP metabolizují především endogenní substráty.

4.2 Lokalizace

Zatímco u prokaryot jsou CYP rozpustné proteiny lokalizované v cytosolu (cytosolární typ), u eukaryot jsou obvykle vázané na membránu. Převážná většina eukaryotních cytochromů P450 se vyskytuje v membránách hladkého endoplazmatického retikula (mikrosomální typ) nebo v membránách mitochondrií (mitochondriální typ). Dalším typem jsou rozpustné cytosolární formy, které jsou však u eukaryot velmi ojedinělé (Danielson, 2002).

V lidském těle se vyskytují zejména v játrech, v gastrointestinálním traktu (především v tenkém střevě), ledvinách a plicích, tedy v orgánech, které jsou velmi vystaveny působení cizorodých látek. Dále se vyskytují v mozku, kůži, nadledvinkách a placentě (Hodek a kol., 2009; Stiborová a kol., 1999).

4.3 Evoluce

Z hlediska evoluce jsou cytochromy P450 považovány za velmi staré hemoproteiny. Předpokládá se, že první gen pro cytochrom P450 vznikl již před 3,5 miliardami let, tedy v době, kdy atmosféra neobsahovala téměř žádný kyslík (Nelson a kol., 1993). Z jediného genu se postupně vyvinulo ohromné množství odlišných genů kódujících cytochromy P450

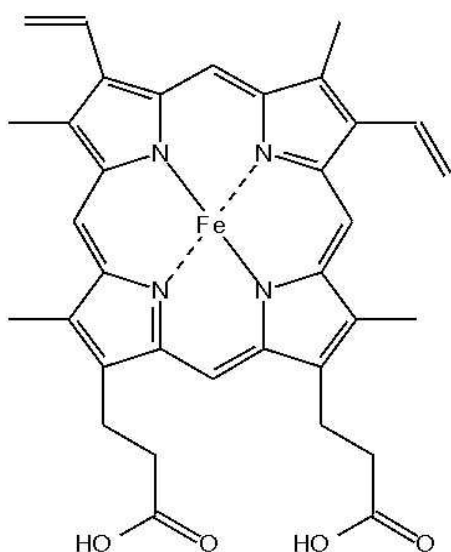
prokaryotních i eukaryotních organismů. Opakované genové duplikace postupně daly vznik jedné z největších multigenových rodin (Danielson, 2002).

Předpokládá se, že prehistorické mikroorganismy využívaly cytochrom P450 k hydroxylaci organických látek, které mohly být následně využity jako zdroj energie. CYP s touto funkcí nalezneme i u některých současných mikroorganismů (Stiborová a kol., 1999). Se vznikem mnohobuněčnosti se vyvinuly další funkce cytochromů P450 jako např. biosyntéza barviv květů, mastných kyselin, steroidních hormonů, vitamínu D a prostaglandinů (Stiborová a kol., 1999). S vývojem živočišné říše vznikla další funkce cytochromů P450, tou je jejich významná role v procesu detoxikace cizorodých látek. Koexistence rostlin a živočichů měla za následek ještě další rozrůznění CYP. Rostliny si na svou ochranu před býložravými živočichy vybudovaly obranné mechanismy, založené např. na produkci různých fyto toxinů a fytoalexinů. Živočichové na to reagovali množstvím a adaptací svých CYP pro účely detoxikace a rychlejší eliminace těchto látek (Stiborová a kol., 1999).

V současnosti bylo identifikováno víc jak 11200 cytochromů P450, z nichž nejvíc je známo u rostlin (více než 4200), 2 cytochromy P450 byly dokonce nalezeny u virů (mimivirus) (<http://drnelson.uthsc.edu/P450.statistics.Aug2009.pdf>).

4.4 Struktura

Cytochromy P450 obsahují jako prosthetickou skupinu hem b, který je tvořen komplexem Fe-protoporfyrin IX. Struktura hemu b je znázorněna na obr. 1 (str. 18). Jak již bylo uvedeno, ve své struktuře mají cytochromy P450 neobvyklý ligand - thiolátový anion (S^-), který je pátým ligandem železa (čtyřmi ligandy jsou atomy dusíku porfyrinového kruhu). Šestým ligandem je pak atom kyslíku molekuly vody (v případě, kdy není navázán substrát). Thiolátová síra pochází ze sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu. Toto uspořádání odlišuje CYP od ostatních hemoproteinů. Většina savčích hemoproteinů (např. hemoglobin, cytochrom b) obsahuje jako pátý ligand atom dusíku pocházející z imidazolové skupiny histidinu (Hasler a kol., 1999). Vedle toho, že tato struktura dává CYP jejich charakteristické spektrální vlastnosti, umožňuje aktivovat molekulární kyslík (Anzenbacher a Anzenbacherová, 2001).



Obr. 1: Struktura hemu b (převzato z Křížková, 2010)

Ačkoliv shoda sekvencí aminokyselin mezi rodinami cytochromů P450 je často velmi malá (10-30%) (Hasemann a kol., 1995), strukturní „fold“ těchto enzymů je velmi konzervovaný. Všechny CYP obsahují konzervované oblasti sekvencí v blízkosti vazného místa pro hem (Stiborová a kol., 1999). Konzervovaná vnitřní struktura (oblast kolem hemu) je tvořeno ze svazku 4 α helixů - D, E, I a L, z helixů J a K, dále ze dvou souborů struktur skládaného listu a ze závitů nazvaného „meandr“.

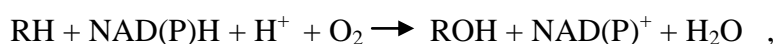
Smyčka vázající hem obsahuje typickou konzervovanou sekvenci cytochromů P450 (Phe-X-X-Gly-X-Arg-X-Cys-X-Gly), která se nachází na proximální straně hemu před helixem L a obsahuje absolutně konzervovaný cystein (pátý ligand hemového železa). Dále, helix K obsahuje absolutně konzervovaný motiv Glu-X-X-Arg. Tento motiv se nachází také na proximální straně hemu a je pravděpodobně potřebný pro stabilizaci vnitřní struktury CYP (Werck-Reichhart a Feyereisen, 2000). Helix I obsahuje velmi konzervovaný threonin, který je důležitý pro aktivaci kyslíku.

Variabilní oblasti ve struktuře CYP jsou obvykle spojeny s rozpoznáváním a vázáním substrátu. Oblasti CYP, které slouží k rozlišování substrátů (tzv. „substrate-recognition sites“), se nachází blízko katalytického místa a vstupního kanálu. Mezi variabilní oblastí, které se účastní vazby substrátu, patří helixy A, B, B', F, G a jejich sousední smyčky (Peterson a Graham, 1998).

4.5 Funkce a reakční cyklus cytochromů P450

Cytochromy P450, které metabolizují především xenobiotika, jsou součástí mikrosomálního monooxygenasového systému neboli systému monooxygenas (oxidase) se smíšenou funkcí („mixed function oxidases“, MFO systém), ve kterém mají funkci terminální oxidasy (Stiborová a kol., 1999). Mikrosomální MFO systém obsahuje vedle cytochromů P450 flavoproteinový enzym NADPH:cytochrom P450 reduktasu, která slouží jako dělič elektronového páru a dodává postupně elektrony cytochromu P450. Fakultativně může tento systém obsahovat také cytochrom b₅ a NADH:cytochrom b₅ reduktasu (Stiborová, 2005).

Obecnou reakci katalyzovanou cytochromem P450 vyjadřuje následující rovnice:



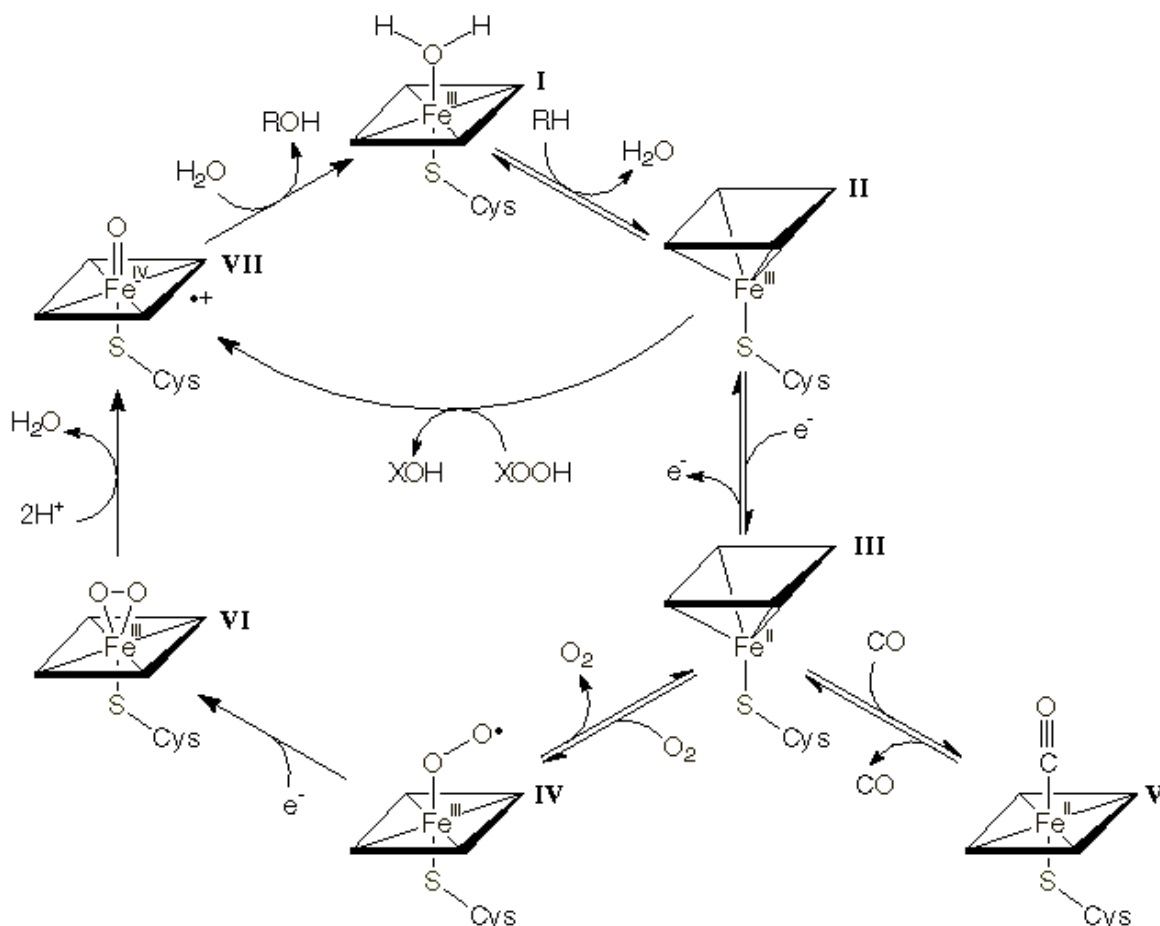
kde RH je substrát a ROH představuje oxygenovanou formu substrátu. CYP začleňují jeden atom molekulárního kyslíku do substrátu a z druhého vzniká voda (odtud název monooxygenasy).

Podle redoxního partnera, kterého CYP potřebují pro katalyzování monooxygenasových reakcí, jelikož přenáší elektrony z NAD(P)H na cytochrom P450, můžeme CYP rozdělit do dvou hlavních tříd. Do I. třídy patří mitochondriální a bakteriální CYP, které pro přenos elektronů z NAD(P)H vyžadují enzym NAD(P)H ferredoxin reduktasu (obsahuje prosthetickou skupinu FAD) a FeS protein. Do II. třídy spadají mikrosomální cytochromy P450. Ty využívají NADPH: cytochrom P450 reduktasu, která obsahuje prosthetické skupiny FAD a FMN. FAD slouží jako akceptor elektronů z NADPH, FMN pak přenáší elektrony na cytochrom P450. Dále existuje ještě III. třída CYP, která nepotřebuje donora elektronů NAD(P)H (např. tromboxansynthasa - CYP5A1), a IV. třída CYP, která nemá redoxního partnera a přijímá elektrony přímo od NAD(P)H (např. P450nor - „nitric oxide reductase“ neboli CYP55A) (Peterson a Graham, 1998).

Z hlediska významnosti mikrosomálních cytochromů P450 v procesu metabolismu xenobiotik zde bude popsán právě jejich reakční cyklus. Ten probíhá mechanismem znázorněným na obr. 2 (str. 21). V klidovém stavu má hemové železo oxidační číslo III (je ve „ferri“ formě) a je hexakoordinováno. Šestým ligandem je atom kyslíku molekuly vody. V prvním kroku reakčního cyklu CYP se substrát (RH) naváže do aktivního místa cytochromu P450, molekula vody je vytěsněna a atom železa se stává pentakoordinovaným. Během tohoto kroku zároveň probíhá konformační změna CYP.

V druhém kroku je přenesen jeden elektron z NADPH:cytochrom P450 reductasy na CYP, a dochází tak k redukci hemového železa na Fe^{2+} („ferro“ forma), železo zůstává pentakoordinováno. Tato forma CYP může vázat molekulární kyslík nebo jiné ligandy (CO, viz obr. 2, str. 21). Navázáním molekulárního kyslíku na Fe^{2+} ve třetím kroku je železo opět hexakoordinované a vzniká ternární „ferri-superoxidový“ komplex (není příliš stabilní). Ve čtvrtém kroku dochází k jednoelektronové redukci tohoto komplexu enzymem NADPH:cytochrom P450 reductasou nebo cytochromem b_5 , molekula kyslíku se tak aktivuje na peroxidový anion. V dalším kroku je štěpena vazba O-O. Jeden atom kyslíku je redukován, přijme dva protony a dojde k uvolnění vody. Druhý atom kyslíku zůstane navázaný na hemovém železe, vzniká „ferrioxenový“ komplex, který je stabilizován mezomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík. Ten je pak schopný vytrhnout vodíkový atom z molekuly substrátu (RH), čímž vzniká radikál substrátu a hydroxylový radikál, který je navázaný na hemovém železe. Následnou rekombinací radikálů pak dochází k obnovení výchozího stavu a k uvolnění hydroxylovaného substrátu ROH (Stiborová a kol., 2004; Andersson a Dawson, 1991).

Pro oxidativní reakce mohou cytochromy P450 využít vedle kyslíku také peroxidy a peroxokyseliny, které jsou donorem již aktivované formy kyslíku (Stiborová a kol., 1999). Na obr. 2 (str. 21) je znázorněna i tato situace, kdy reakcí komplexu II s peroxosloučeninou (XOOH) vzniká přímo stav VII. Tato reakce je označována jako peroxidasová aktivita CYP.



Obr. 2: Reakční cyklus cytochromu P450
(převzato z <http://metallo.scripps.edu/promise/P450.html>)

4.6 Indukce

Z pohledu množství (obsahu) CYP v jednotlivých tkáních či orgánech můžeme cytochromy P450 dělit na konstitutivní a indukibilní. Obsah konstitutivních CYP je stabilní, tyto CYP se podílí především na metabolismu endogenních substrátů. Většina cytochromů P450 metabolizujících xenobiotika je indukibilní. U indukibilních CYP dochází po expozici organismu cizorodým látkám k jejich biosyntéze. Obsah indukibilních CYP v organismu (tkáních, orgánech) tedy může za přítomnosti induktoru značně narůst. Často právě indukovaný CYP dokáže danou cizorodou látku metabolizovat. Tato adaptivní odpověď, známá jako indukce, je pevně regulovaný proces (Williams a kol., 2005). Indukce cytochromů P450 je řízena různými mechanismy, především regulací exprese

CYP na úrovni transkripce, dále stabilizací příslušné mRNA a proteinu, a postranlační modifikací (Monostory a Pascussi, 2008).

Při transkripční regulaci exprese CYP hrají významnou roli jaderné receptory. Jaderné receptory jsou signalizační molekuly, které fungují jako transkripční faktory vázající ligand. Navázáním ligandu se jaderné receptory aktivují, jsou přeneseny z cytosolu do jádra, kde se vážou na specifické sekvence DNA a regulují tak transkripci genů CYP (Williams a kol., 2005). Regulace zprostředkovaná těmito receptory představuje přeměnu extra- a intracelulárních signálů na buněčné odpovědi spuštěním transkripce cílových genů jaderných receptorů (Monostory a Pascussi, 2008). Jaderné receptory obsahují doménu pro navázání ligandu, doménu pro navázání DNA, která je velmi konzervovaná, a transaktivační domény. Transkripční regulace exprese genů CYP je modifikována korepresory a koaktivátory, s nimiž jaderné receptory interagují. Pokud není přítomen ligand, jaderné receptory mohou být vázány v komplexu s korepresory, které inhibují transkripční aktivitu (posílením histonových deacetylas). Koaktivátory mohou naproti tomu zvýšit genovou transkripci, mají totiž histonovou acetyltransferasovou (nebo methyltransferasovou) aktivitu. Acetylací histonů dojde ke změně struktury chromatinu (k relaxaci chromatinu) a ke zvýšení transkripce genů (Monostory a Pascussi, 2008).

Jaderné receptory regulující transkripci genů CYP můžeme rozdělit do dvou skupin:

1. superrodina jaderných hormonálních receptorů (NHR, „nuclear hormone receptor“)
2. superrodina PAS [Per („Period“)-Arnt („Ah receptor-nuclear translocator“)-Sim („Single minded“)].

Do první uvedené skupiny patří konstitutivní androstanový receptor (CAR, „constitutive androstane receptor“), PXR („pregnane X receptor“) a PPAR α („peroxisome proliferator activated receptor“). Do druhé skupiny jaderných receptorů pak patří AhR („aryl hydrocarbon receptor“) (Williams a kol., 2005).

4.6.1 AhR

AhR je zodpovědný za regulaci enzymů rodiny CYP1, konkrétně indukuje CYP1A1, CYP1A2 a CYP1B1 (Guengerich, 2001). V klidovém stavu se nachází v cytosolu. Navázáním ligandu je AhR aktivován, poté se přemístí do jádra a vytvoří heterodimer

s jaderným faktorem Arnt („Ah receptor-nuclear translocator“). Tento dimerový komplex se poté váže na specifickou sekvenci DNA a indukuje genovou transkripci (Waxman, 1999). Mezi ligandy AhR patří např. polycyklické aromatické uhlovodíky (např. benzo[a]pyren), TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin), polychlorované bifenylly a polychlorované dibenzofurany (Williams a kol., 2005).

4.6.2 CAR, PXR, PPAR α

Tyto jaderné receptory po navázání ligandu tvoří heterodimery s retinoidním X receptorem (Guengerich, 2001). CAR a PXR hrají hlavní roli v indukci CYP2 a CYP3, zatímco PPAR α zprostředkovává indukci enzymů rodiny CYP4 (Waxman, 1999). Příkladem ligandu pro CAR je fenobarbital, PXR je aktivován např. rifampicinem (Monostory a Pascussi, 2008; Williams a kol., 2005).

4.7 Inhibice cytochromů P450

K inhibici jsou obzvlášť náchylné tři kroky v reakčním cyklu cytochromů P450 (popsán výše, viz kapitola 4.5). Mezi ně patří navázání substrátu, vazba molekulárního kyslíku a krok, ve kterém dochází k oxygenaci substrátu (Correia a Ortiz de Montellano, 2005). Inhibice cytochromů P450 může být reverzibilní, ireverzibilní nebo kvazi-ireverzibilní.

Mechanismus reverzibilní inhibice je pravděpodobně zodpovědný za mnoho mezilékových interakcí. Inhibice metabolismu léčiva může mít za následek nežádoucí zvýšení koncentrace léčiva v plazmě a způsobit neočekávané toxické účinky (Lin a Lu, 1998; Monostory a Pascussi, 2008). Reverzibilní inhibitory soutěží se substrátem o obsazení vazebného místa CYP a působí převážně v prvním kroku reakčního cyklu cytochromů P450 (navázání substrátu) (Lin a Lu, 1998). Tyto sloučeniny se mohou vázat na hydrofobní oblasti aktivního místa CYP nebo se mohou koordinovat na hemové železo (Correia a Ortiz de Montellano, 2005; Lin a Lu, 1998). Inhibitory, které se na CYP vážou současně oběma uvedenými způsoby, jsou přirozeně účinnější.

Při ireverzibilní a kvazi-ireverzibilní inhibici je inhibitor nejprve metabolicky aktivován cytochromem P450 na reaktivní intermediát. Ten poté způsobí

(kvazi-)ireverzibilní deaktivaci cytochromu P450, který jej aktivoval. Podle uvedeného mechanismu se tyto inhibitory označují jako „katalyticky-dependentní“ nebo sebevražedné deaktivátory (deaktivace enzymu nastane předtím, než dojde k uvolnění substrátu z aktivního místa enzymu) (Correia a Ortiz de Montellano, 2005). Existuje více mechanismů, kterými dochází k deaktivaci CYP. Reaktivní intermediát se může kovalentně navázat na protein nebo hem. Dalším příkladem je kvazi-ireverzibilní koordinace na hem cytochromu P450: inhibitor je nejprve aktivován CYP na reaktivní metabolický intermediát, který se koordinuje na hemové železo, a vytváří tak s hemem CYP velmi stabilní komplex. Metabolický intermediát je v tomto komplexu vázán tak pevně, že k jeho odstranění (nebo k disociaci komplexu), a tedy k následnému obnovení katalytické funkce příslušného CYP může dojít jen za specifických reakčních podmínek (Correia a Ortiz de Montellano, 2005; Lin a Lu, 1998). Zatímco v případě ireverzibilní inhibice k obnovení katalytické funkce dojít nemůže.

5 Karcinogeneze

Karcinogeneze (nebo kancerogeneze) je komplexní proces vzniku nádoru. Jako nádor (tumor či neoplazma) se označuje nová a abnormální tkáň v mnohobuněčném organismu, která se dělí neregulovaným způsobem. Transformace normální buňky na nádorovou je mnohostupňový proces. K tomu, aby došlo ke vzniku rakoviny, je zapotřebí několika mutací, jediný defekt genu rakovinu většinou nezpůsobí. Rakovina má obvykle dlouhou dobu latence. Doba, od níž dojde ke vzniku nádoru po vystavení organismu působení karcinogenu, může být několik let až desetiletí. Na vzniku rakoviny se podílí jak vnitřní, tak vnější faktory. Vedle dědičných genových mutací patří mezi kritické vnitřní faktory vývoje rakoviny také věk, hormonální stav a imunita daného jedince (Hodek a kol., 2009). Mezi vnější faktory (Nečas, 2004) pak řadíme faktory:

- fyzikální : např. UV záření, rentgenové záření, γ -záření
- biologické: onkogenní viry (např. lidský DNA papilomavirus), infekční mikroorganismy jako *Helicobacter pylori* (Hodek a kol., 2009)
- chemické: chemické karcinogeny.

Chemické karcinogeny jsou považovány za nejvýznamnější z vnějších faktorů vzniku karcinogeneze.

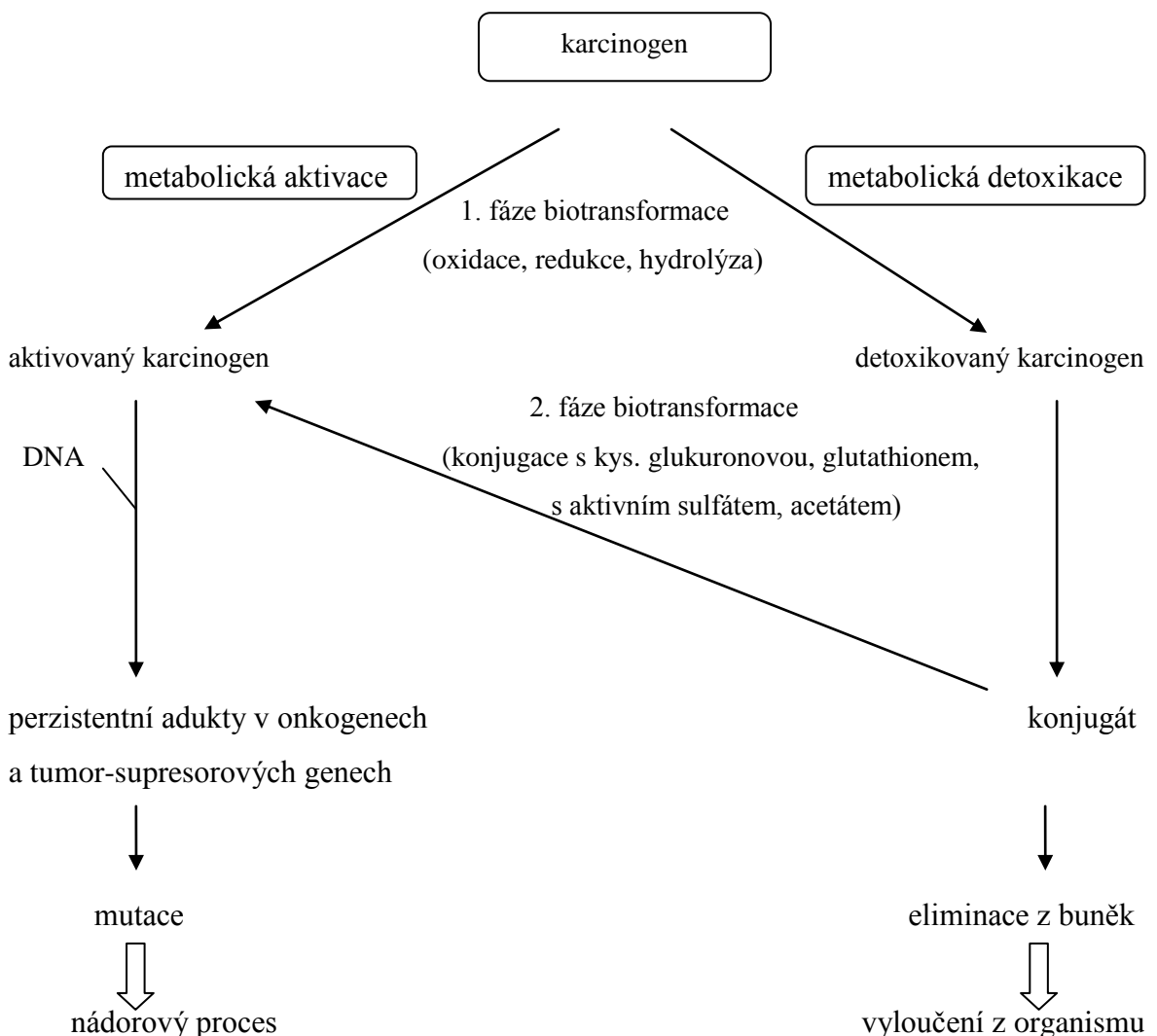
Karcinogen je látka nebo fyzikální faktor vyvolávající vznik rakoviny. Chemické karcinogeny můžeme podle mechanismu jejich působení rozdělit do dvou skupin:

- genotoxické karcinogeny: kovalentně modifikují DNA a vytváří tak adukty s DNA, které jsou základem pro neoplastickou transformaci
- negenotoxické (epigenetické) karcinogeny: jedná se o sloučeniny, které nejsou chemicky reaktivní, a tudíž nevytváří adukty s DNA, neindukují genové mutace DNA, na druhé straně ovšem podporují expanzi potenciálních nádorových buněk, působí jako tzv. promotory (Williams, 2001; Rosypal, 2000).

Genotoxické karcinogeny mohou již ve své struktuře obsahovat reaktivní elektrofilní skupiny nebo jsou metabolicky aktivovány na elektrofilní reaktanty. Mezi genotoxické karcinogeny patří některé heterocyklické aminy (např. 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-b]pyridin, PhIP), polycyklické aromatické uhlovodíky (benzo[a]pyren), mykotoxiny (aflatoxin B₁). Epigenetické karcinogeny naproti tomu postrádají molekulární

struktury potřebné pro tvorbu elektrofilů, patří sem např. fenobarbital, polychlorované bifenyly, TCDD (Williams, 2001).

Většina exogenních chemických karcinogenních sloučenin není aktivní ve své původní formě, ale vyžadují metabolickou aktivaci (Stratil a Kubáň, 2004; Miller a Miller, 1981). Takové látky se označují jako prokarcinogeny. Za aktivaci prokarcinogenu na reaktivní elektrofilní formu zodpovídají především enzymy I. fáze biotransformace cytochromy P450 (Stiborová a kol., 1999). Avšak i během II. fáze biotransformace může dojít k jejich aktivaci, např. konjugací některých karcinogenů s aktivním sulfátem (sulfatace) nebo acetátem, jak je znázorněno na obr. 3. (Stiborová, 2002).



Obr. 3: Schéma mechanismu působení chemických karcinogenů (upraveno podle Stiborová, 2002)

Nádorové onemocnění vzniká obvykle v důsledku celoživotní expozice organismu různým karcinogenům. Čím víc je člověk vystaven těmto karcinogenním faktorům, tím dříve a více vzniká poruch DNA, a tím tedy i roste riziko vzniku nádorového onemocnění. Karcinogeneze může být navíc značně urychlena v případě vrozené poruchy některého genu klíčového pro regulaci buněčných procesů (Stratil a Kubáň, 2004). Pouze 5-10% všech případů rakoviny je způsobeno genetickými defekty, zatímco zbylých 90-95% environmentálními faktory a životním stylem (Anand a kol., 2008).

Jak již bylo uvedeno, aby došlo k nádorovému bujení, je zapotřebí několika mutací. Pouze některé mutace však mohou vést ke vzniku rakoviny. Jedná se o mutace v genech, které jsou klíčové pro regulaci buněčných procesů jako buněčné dělení, diferenciaci, apoptóza atd. (Oster a kol., 2005). Mezi tyto klíčové geny patří protoonkogeny a tumor-supresorové geny (Stiborová, 2005). Protoonkogeny jsou strukturní geny kódující proteiny, které se podílejí na regulaci dělení buněk a na jejich diferenciaci. Přítomnost protoonkogenů v buňce je důležitá pro normální růst, dělení a regulovanou diferenciaci buňky. Pokud dojde k jejich mutaci, dělení a diferenciaci buněk jsou neregulované a mohou vést k tvorbě maligního nádoru. Takto aktivované protoonkogeny se nazývají onkogeny. Onkogen je tedy varianta protoonkogenu vyvolávající neoplastickou transformaci buňky (Rosypal, 2000). Jednotlivé geny se vyskytují v genomu buňky ve dvou kopiích (alelách). Mutace v protoonkogenech jsou dominantní, k přeměně protoonkogenu na onkogen stačí mutace pouze jedné z alel těchto genů (Grandér, 1998; Oster a kol., 2005). Tumor-supresorové geny (též antionkogeny) jsou geny, jejichž produkty zasahují do buněčného růstu tak, že ruší účinky onkogenů (Stiborová, 2002). Tumor-supresorové geny chrání buňku před nádorovou transformací. Produkty těchto genů mají různé funkce, např. potlačují proliferaci buňky tím, že ji udržují ve stavu klidu - v G₀ fázi, dále zpomalují buněčný cyklus a umožňují provedení reparací DNA atd. (Nečas, 2004). Ztráta funkce tumor-supresorových genů, tedy jejich deaktivace vlivem mutace, vede k maligní transformaci. Mutace v tumor-supresorových genech mají naopak recesivní charakter. Pouze mutace v obou alelách těchto genů tedy vede ke ztrátě jejich funkce (Grandér, 1998; Oster a kol., 2005).

5.1 Mechanismus chemické karcinogeneze

Proces chemické karcinogeneze zahrnuje tři fáze: iniciaci, promoci a progresi. V iniciační fázi dochází prostřednictvím ireverzibilních genetických změn DNA k přeměně normální (zdravé) buňky na buňku iniciovanou. Tento proces je způsoben hlavně různými modifikacemi DNA. Z hlediska karcinogeneze je za nejzávažnější modifikaci DNA považována tvorba kovalentních aduktů. Přibližně 90% sloučenin, které byly prokázány jako karcinogenní pro člověka, tvoří kovalentní adukty s DNA (Stiborová a kol., 1998). Většina těchto aduktů je z DNA odstraněna reparačními procesy. Pokud nedojde k jejich eliminaci, některé perzistentní adukty pak mohou způsobit permanentní mutace v klíčových genech - onkogenech a tumor-supresorových genech - a vyvolat tak nádorový proces.

Vedle kovalentních aduktů mezi další modifikace DNA patří tvorba hydroxyderivátů bázi DNA (oxidativní léze tvořené radikálovými formami kyslíku), tvorba pyrimidinových dimerů, apurinace a apyrimidinace DNA, tvorba interkalátů a tvorba cyklických aduktů tvořených z bifunkčních genotoxických činidel (Stiborová a kol., 1999)

Po iniciační fázi následuje fáze promoci, ve které dochází ke zvýšené proliferaci iniciovaných buněk. Po expozici iniciovaných buněk faktorům s promočním účinkem - epigenetické (negenotoxické) karcinogeny, se jejich genetická informace ještě více poškodí a následuje proliferace buněk s porušenou diferenciací a mezibuněčnou komunikací (Stiborová, 2005). V této fázi vzniká benigní nádor (nezhoubný, nešíří se do jiných tkání).

Fáze progresu může být přirovnána k fázi iniciace. V této fázi jsou však procesy modifikace DNA ještě razantnější, dochází ke vzniku maligního nádoru (zhoubný nádor), který se infiltruje do jiné tkáně, v těle se šíří ve formě metastáze.

6 Potravní karcinogeny

Strava hraje významnou roli v procesu karcinogeneze. V hospodářsky vyspělých státech je strava jedním z nejvýznamnějších faktorů působících při vzniku nádorových onemocnění (Stratil a Kubáň, 2004). Odhaduje se, že až 35% úmrtí na nádorová onemocnění je spojeno právě s potravou (Anand a kol., 2008). V potravě se může vyskytovat řada karcinogenních sloučenin. Potravní karcinogeny poškozují DNA různým způsobem, např. bodovou mutací (záměnou nukleotidů) či chromosomální aberací. Příčinou vzniku těchto mutací je většinou tvorba aduktů s DNA (Goldman a Shields, 2003). Většina karcinogenních látek v potravinách musí být nejprve metabolicky aktivována, aby vykazovala mutagenní či karcinogenní účinky. Za tuto aktivaci zodpovídají především cytochromy P450, jak již bylo uvedeno (Stiborová a kol., 1999).

Potravní karcinogeny, které jsou popsány v této kapitole, lze rozdělit do tří skupin:

- karcinogeny vznikající při technologickém zpracování potravin a při jejich tepelné úpravě: polycyklické aromatické uhlovodíky, heterocyklické aminy, nitrosaminy
- karcinogeny produkované mikroby (plísněmi): mykotoxiny
- karcinogeny produkované rostlinami: safrol, estragol, pyrrolizidinové alkaloidy.

Je důležité zmínit, že vedle karcinogenních látek se v potravě vyskytují zároveň i látky s antikarcinogenními či antimutagenními účinky, jako např. antioxidanty a vláknina, které snižují riziko vzniku rakoviny (např. snižováním účinků potravních karcinogenů či jejich detoxikací) (Goldman a Shields, 2003; Sutandyo, 2010).

V potravinách se může nacházet řada mutagenních a karcinogenních sloučenin, které se jako individuální látky vyskytují většinou ve velmi malém množství. Jejich jednotlivě přijímaná množství u lidí obvykle nepředstavují významnější riziko pro vznik nádorů, nicméně účinky všech přijímaných karcinogenů se sčítají a poruchy DNA se postupně hromadí (Stratil a Kubáň, 2004). Rakovina tedy většinou není způsobena jednou karcinogenní látkou, ale spíše je výsledkem působení více karcinogenních sloučenin (Sugimura a kol., 1996).

6.1 Heterocyklické aminy

Heterocyklické aminy (HA) jsou skupinou silně toxických látek. Vznikají při zpracování masa za vysokých teplot, a to pyrolýzou proteinů, aminokyselin nebo kreatinu (Schut a Snyderwine, 1999). HA obsahují ve své struktuře často několik heterocyklických aromatických kruhů s exocyklickou aminoskupinou. Aminoskupina je nezbytná pro metabolickou aktivaci, mutagenicitu a karcinogenitu těchto sloučenin (Snyderwine, 2002). Některé HA vykazují vyšší mutagenicitu než aflatoxin B₁ a benzo[a]pyren (Wakabayashi a kol., 1992).

Heterocyklické aminy lze rozdělit do dvou základních skupin:

- HA typu IQ (imidazochinolinového typu), které obsahují 2-aminoimidazolovou strukturu
- HA jiného typu („non IQ type“), které obsahují aminopyridinovou strukturu (Sugimura a kol., 1996).

V tabulce 1 jsou uvedeny příklady zástupců obou skupin.

Tab. 1: Příklady některých zástupců heterocyklických aminů (Sugimura, 2000) a jejich klasifikace podle IARC (IARC 1987; IARC, 1993)

Označení HA	Chemický název	Klasifikace karcinogenu podle IARC
IQ	2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]chinolin	skupina 2A
MeIQ	2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]chinolin	skupina 2B
MeIQx	2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]chinoxalin	skupina 2B
PhIP	2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-b]pyridin	skupina 2B
Trp-P-2	3-amino-1-methyl-5H-pyrido[4,3-b]indol	skupina 2B
Trp-P-1	3-amino-1,4-dimethyl-5H-pyrido[4,3-b]indol	skupina 2B
Glu-P-1	2-amino-6-methyldipyrido[1,2-a:3',2'-d]-imidazol	skupina 2B
Glu-P-2	2-aminodipyrido[1,2-a:3',2'-d]imidazol	skupina 2B
AαC	2-amino-9H-pyrido[2,3-b]indol	skupina 2B
MeAαC	2-amino-3-methyl-9H-pyrido[2,3-b]indol	skupina 2B

IARC - „International Agency for Research on Cancer“

Podle IARC („International Agency for Research on Cancer“), jež shromažďuje studie o karcinogenitě látek, je IQ klasifikován jako karcinogen skupiny 2A („probably carcinogenic to humans“) - tedy pravděpodobně karcinogenní pro lidi (IARC, 1993). MeIQ, MeIQx, PhIP (IARC, 1993), Glu-P-1, Glu-P-2, Trp-P-1, Trp-P-2, AαC a MeAαC (IARC, 1987) jsou podle IARC klasifikovány jako karcinogeny skupiny 2B („possibly carcinogenic to humans“) - tedy možná karcinogenní pro lidi (viz tab. 1, str. 30).

Heterocyklické aminy typu IQ se tvoří zahřátím směsi kreatinu (kreatininu), aminokyselin a cukrů. Heterocyklické aminy druhé skupiny („non IQ type“) vznikají pyrolýzou aminokyselin jako L-tryptofanu nebo kyseliny glutamové (Sugimura a kol., 1996). Tyto HA jsou produkovány při teplotě vyšší než 300°C. Při teplotách do 300°C vznikají heterocyklické aminy typu IQ, jako MeIQ, MeIQx, PhIP atd., které jsou však silnější mutageny (Stratil a Kubáň, 2005). Mezi nejhojněji zastoupené HA v potravě patří PhIP, který je popsán podrobněji níže (kapitola 6.1.1).

Mechanismus karcinogeneze heterocyklických aminů začíná jejich metabolickou aktivací cytochromy P450 - především CYP1A2, dále pak CYP1A1 (Hammons a kol., 1997; Shimada a Guengerich, 1991). Heterocyklické aminy jsou N-hydroxyací prostřednictvím CYP přeměněny na hydroxyamino-deriváty, které mohou být následně aktivovány esterifikací prostřednictvím enzymů N-acetyltransferasy a sulfottransferasy, spontánním rozpadnutím esteru vznikají nitreniové ionty. Nitreniové ionty jsou ultimální karcinogeny schopné tvořit adukty s DNA, mohou se navázat na guanin v pozici C8. Tím může dojít k mutaci DNA a následně tedy ke změnám v sekvenci DNA (Sugimura 2000; Sutandyo, 2010).

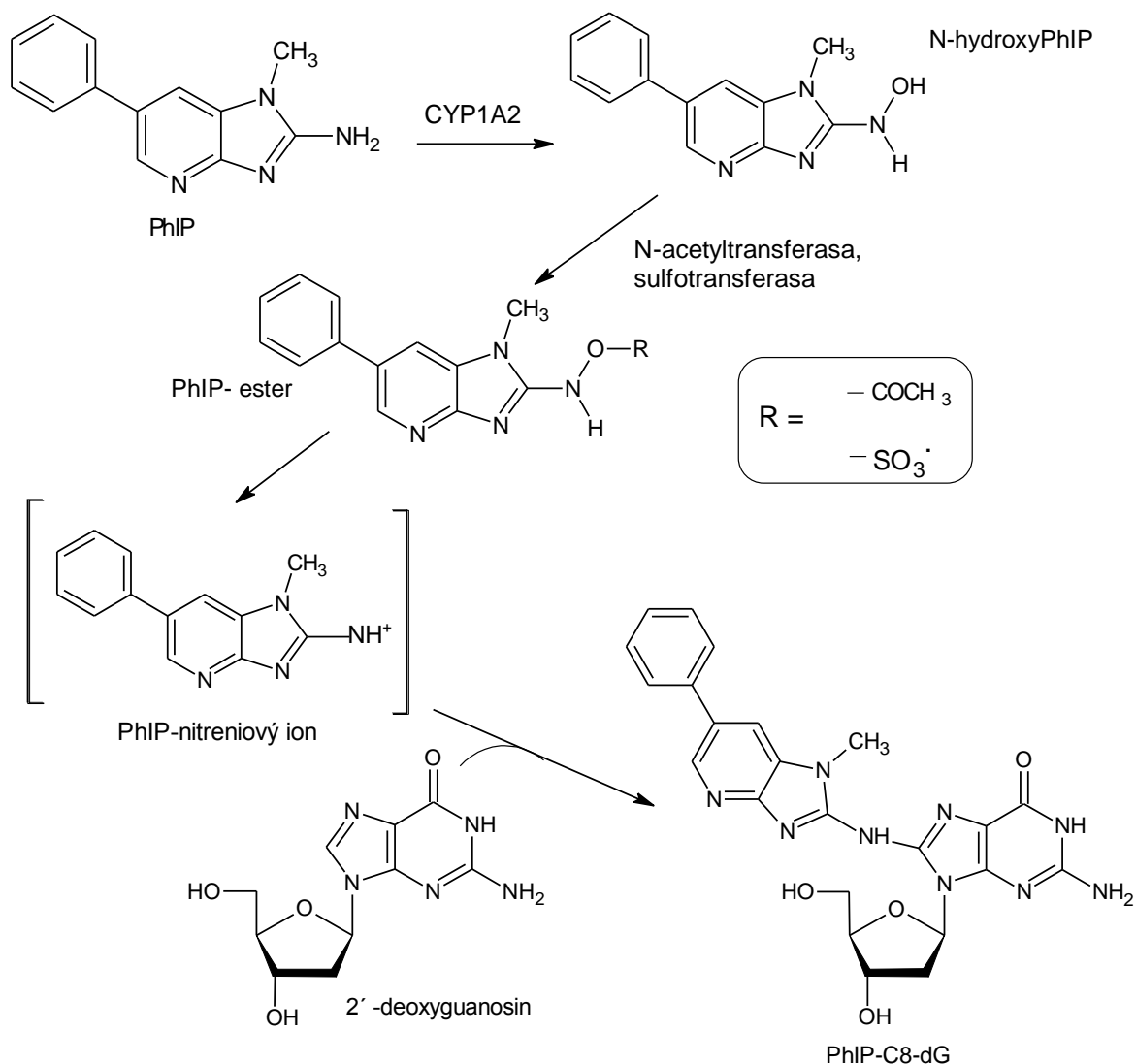
HA jsou přítomny v tepelně upraveném mase (v hovězím, vepřovém, v rybách). Další zdroje proteinů (jako např. mléko, vejce, játra) obsahují velmi malé množství HA nebo neobsahují žádné HA (Sutandyo, 2010). Tvorba HA je ovlivněna čtyřmi faktory: typem potravin, způsobem jejich úpravy, teplotou a časem (Skog a kol., 1998). Způsob přípravy pokrmů hraje významnou roli. Při smažení, rožnění a grilování je produkováno největší množství HA (Keating a kol., 1999). Menší množství HA je pak produkováno pečením v troubě. Nejlepší způsob úpravy masa je dušení a vaření, při nichž se tvoří zanedbatelné množství HA (Sutandyo, 2010). S tím souvisí i další faktor - teplota: čím vyšší teplota, tím větší množství HA je produkováno, proto je také dušení či vaření nejvhodnějším způsobem úpravy masa, jak již bylo zmíněno. Při delší době tepelné úpravy pokrmu vzniká také více HA (Skog a kol., 1998; Keating a kol., 1999).

Expozice HA může být značně redukována několika způsoby, jako např. omezením přípravy pokrmů z masa nad přímým plamenem, snížením teploty a zkrácením doby přípravy pokrmů, při pečení masa v troubě nejprve maso zabalit do aluminiové folie (Sugimura, 2000). Šťáva uvolněná při tepelné úpravě masa obsahuje HA, proto je vhodné před smažením nejprve použít mikrovlnnou troubu, čímž se zbavíme šťávy obsahující prekurzory HA (Felton a kol., 1994).

6.1.1 PhIP

PhIP patří mezi nejhojněji zastoupené HA v potravě. Bylo zjištěno, že indukuje nádory tlustého střeva u potkanů (především u samců), nádory mléčné žlázy u samic (Ito a kol., 1991) a prostaty u samců potkanů (Shirai a kol., 1997). Jelikož jsou tyto orgány běžnými místy vzniku rakoviny v Americe, kde lidé konzumují velké množství masa, PhIP vzbudil velkou pozornost jako možný rizikový faktor rakoviny u lidí (Shirai a kol., 1997; Snyderwine, 2002). Na rozdíl od ostatních karcinogenních heterocyklických aminů PhIP neindukuje u potkanů a myši rakovinu jater (Nagao a kol. 1994).

PhIP je (jako ostatní HA) prokarcinogen vyžadující metabolickou aktivaci, která je znázorněna na obr. 4 (str. 33). Probíhá následujícím způsobem: PhIP nejprve podstupuje iniciační oxidační krok, ve kterém je především prostřednictvím CYP1A2 (nebo též CYP1A1, CYP1B1) přeměněn na N-hydroxy-PhIP (Snyderwine, 2002; Crofts a kol., 1998). Následuje přeměna tohoto intermediátu N-acetyltransferasou nebo sulfottransferasou na ester, který podstupuje heterolytické štěpení za vzniku PhIP-nitreniového iontu, ultimální reaktivní látky, jež reaguje s DNA (Schut a Snyderwine, 1999). Jako hlavní kovalentní adukt vzniká *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridin (PhIP-C8-dG) (Lin a kol., 1992). Vedle aktivačních reakcí dochází též k detoxikačním reakcím, např. N-hydroxy-PhIP může být detoxikován konjugací s glukuronidem katalyzovanou UDP-glukuronosyltransferasou (Snyderwine, 2002).



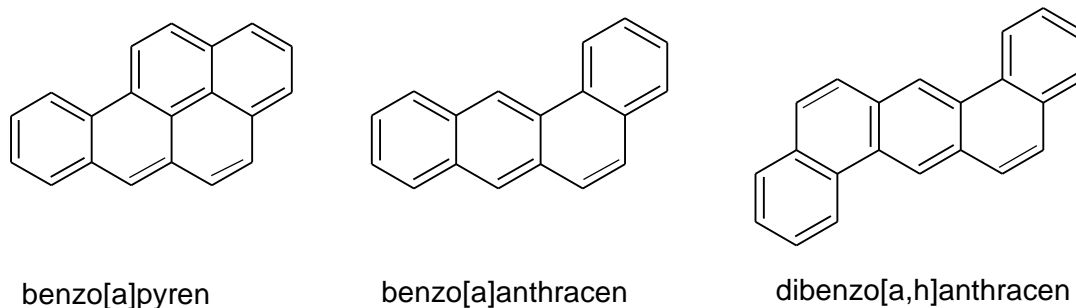
Obr. 4: Schéma metabolické aktivace PhIP (upraveno podle Singh a kol., 2010)

PhIP-C8-dG - *N*-(deoxyguanosin-8-yl)-2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo[4,5-*b*]pyridin

6.2 Polycyklické aromatické uhlovodíky

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) jsou další skupinou velmi toxických látek. Jsou přítomny ve všech složkách a oblastech životního prostředí. K tvorbě PAH dochází pyrolýzou nebo nedokonalým spalováním organického materiálu (uhlí, dřeva, fosilních paliv). Do okolí se jsou často emitovány z dopravních prostředků, jako vedlejší produkty průmyslových procesů nebo během zpracování potravin. Vznikají též při lesních požárech (Tomaniová a kol., 1997; Stratil a Kubáň, 2005).

PAH jsou chemicky inertní hydrofobní látky, které obsahují ve své struktuře spojená benzenová jádra (obvykle 3 a více). Struktura tří karcinogenních PAH, které se běžně vyskytují v tepelně zpracované potravě - benzo[a]pyren, benzo[a]anthracen a dibenzo[a,h]anthracen (Jägerstad a Skog, 2005), je znázorněna na obr. 5.



Obr. 5: Struktura benzo[a]pyrenu, benzo[a]anthracenu a dibenzo[a,h]anthracenu (upraveno podle Jägerstad a Skog, 2005)

Benzo[a]pyren je podle IARC klasifikován jako karcinogen skupiny 1 („carcinogenic to humans“), tedy látka karcinogenní pro lidi. Dibenz[a,h]anthracen patří mezi karcinogeny skupiny 2A, látky pravděpodobně karcinogenní pro lidi, do téže skupiny je řazen PAH dibenzo[a,l]pyren. Jako karcinogeny skupiny 2B, látky možná karcinogenní pro lidi, jsou klasifikovány např. benzo[a]anthracen, benzo[b]fluoranthren a indeno[1,2,3-cd]pyren (<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsGroupOrder.pdf>; IARC, 2010).

PAH patří mezi prokarcinogeny. Za jejich metabolickou aktivaci na reaktivní intermediáty jsou zodpovědné především cytochromy P450 - CYP1A1 a CYP1B1, které metabolizují PAH na epoxidové intermediáty (Shimada a Fujii-Kuriyama, 2004). Ty jsou následně přeměněny pomocí epoxidhydrólasy na dihydrodioly, jež mohou být dále metabolizovány CYP na ultimální karcinogeny, které vytvářejí adukty s DNA (zejména na atomu N^2 guaninu) (Stratil a Kubáň, 2005; Baird a kol., 2005).

Hlavním zdrojem PAH je pro lidi především potrava, pro kuřáky též tabákový kouř. PAH se do potravy dostávají kontaminací ze vzduchu, vody, půdy a také některými technologickými zásahy prováděnými během výroby potravin či během domácí přípravy potravin (Tomaniová a kol., 1997). Působením vyšších teplot při pražení, uzení, sušení, grilování, pečení potravin apod. vznikají PAH. V uzených rybách bylo např. identifikováno kolem 100 různých PAH. V domácích uzeninách pak bývá obsah PAH

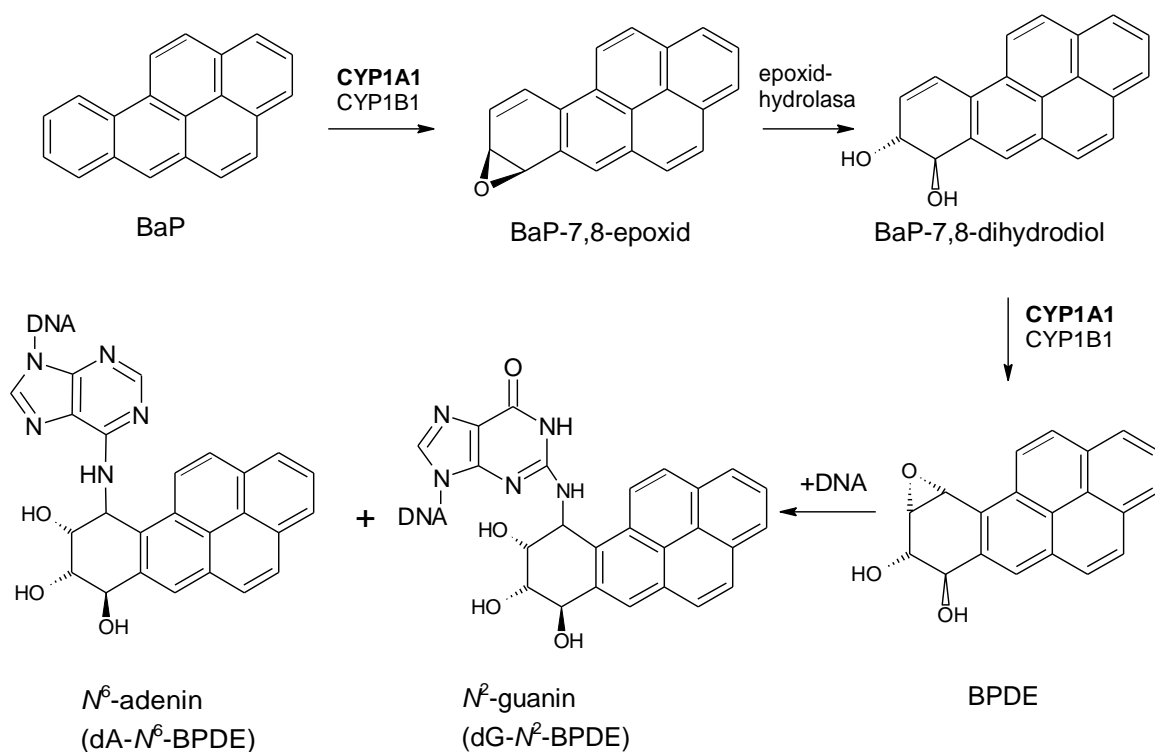
obvykle až 10x větší než ve většině uzenin vyráběných masným průmyslem (Stratil a Kubáň, 2005). Mezi potraviny s relativně vyššími hladinami PAH můžeme zařadit vedle uzeného a grilovaného masa též listovou zeleninu, olejnatá semena a tuky a oleje z nich vyrobené. Překvapivě i cereálie obsahují nízké hladiny PAH, vzhledem k jejich relativně velkému zastoupení v potravě však patří mezi jedny z nejvýznamnějších zdrojů PAH (Tomaniová a kol., 1997).

6.2.1 Benzo[a]pyren

Ačkoliv je známo několik stovek různých PAH, benzo[a]pyren je snad nejvíce studovaným PAH. Benzo[a]pyren je jedním z převládajících PAH v cigaretovém kouří. (Hodgson, 2004). Hlavním zdrojem expozice benzo[a]pyrenu je vedle kouření také potrava a znečištěné ovzduší (IARC, 1983).

Karcinogenní působení benzo[a]pyrenu spočívá v jeho metabolické aktivaci na elektrofilní intermediáty, které kovalentně modifikují DNA. Benzo[a]pyren je metabolicky aktivován CYP1A1 a CYP1B1 na epoxidové intermediáty, které jsou následně přeměněny mikrosomálními epoxidhydrolasami na dihydrodioly. Tyto sloučeniny mohou být dále metabolizovány CYP1A1 a CYP1B1 na reaktivní diol-epoxydy (Baird a kol., 2005; Shimada a Fujii-Kuriyama, 2004). Metabolickou aktivací benzo[a]pyrenu, která je znázorněna na obr. 6 (str. 36), vzniká proximální karcinogen benzo[a]pyren-7,8-epoxid a benzo[a]pyren-7,8-dihydrodiol, který je následně přeměněn na ultimální karcinogen benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid (BPDE) (Hodgson, 2004). BPDE vytváří adukty s DNA, váže se převážně na atom N^2 guaninu. V menší míře se BPDE může též vázat na atom N^6 adeninu (Alexandrov a kol., 2010), viz obr. 6 (str. 36). BPDE se může vyskytovat ve čtyřech izomerních formách. Pouze jeden z těchto izomerů, (+)-benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid-2, má však významný karcinogenní potenciál (Hodgson, 2004).

Mnoho metabolitů benzo[a]pyrenu je dále metabolizováno enzymy II. fáze biotransformace. Na detoxikaci benzo[a]pyrenu a jiných PAH se podílí např. glutathion-S-transferasa, glukuronosyltransferasa a methyltransferasa (Baird a kol., 2005).

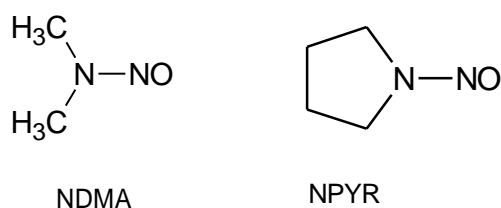


Obr. 6: Metabolická aktivace benzo[a]pyrenu a tvorba aduktů (upraveno podle Aimová a kol., 2008), BaP - benzo[a]pyren, BPDE - benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid, dG-*N*²-BPDE - benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid-*N*²-deoxyguanoin, dA-*N*⁶-BPDE - benzo[a]pyren-7,8-diol-9,10-epoxid-*N*⁶-deoxyadenosin

6.3 *N*-nitrosaminy

N-nitrosaminy jsou z hlediska karcinogeneze jedny z nejvýznamnějších *N*-nitrososloučenin. Nitrosaminy jsou obsaženy v masě konzervovaném dusitanu. Potraviny konzervované slaným nálevem nebo uzením a některé alkoholické nápoje (pivo, whisky) a tabákové výrobky rovněž obsahují nitrosaminy (Liu a Russell, 2008). Nitrosaminy se mohou tvořit též endogenně z dusitanů a dusičnanů (Liu a Russell, 2008). Dusičnany přijaté potravou mohou být redukovány bakteriemi ústní dutiny na dusitany, které jsou poté v kyselém prostředí žaludku přeměněny nitrosací na *N*-nitrososloučeniny, např. nitrosaminy, a to reakcí se sekundárními aminy či amidy (Liu a Russell, 2008; Stratil a Kubáň, 2005). Sekundární aminy a amidy jsou přítomny v potravě jako degradační produkty proteinů nebo jiných dusíkatých potravinových složek.

N-nitrososlučeniny mohou být rozděleny na těkavé a netěkavé. Mezi těkavé nitrosaminy patří *N*-nitrosodimethylamin (NDMA), *N*-nitrosodiethylamin (NDEA), *N*-nitrosopyrrolidin (NPYR) a *N*-nitrosopiperidin (NPIP). Struktura NDMA a NPYR je zobrazena na obr. 7. NDMA je nejčastěji zjišťovaný těkavý nitrosamin v sýrech, pivu a potravinách konzervovaných dusitany a dusičnany (uzeniny, šunka atd.) (Stratil a Kubáň, 2005). Netěkavé *N*-nitrososlučeniny v potravě převládají a nebyly shledány jako mutagenní či karcinogenní. Mohou však působit jako prekurzory těkavých karcinogenních nitrosaminů, např. netěkavý nitrosamin *N*-nitrosoprolin (NPRO) je prekurzorem NPYR.



Obr. 7: Struktura *N*-nitrosodimethylaminu (NDMA) a *N*-nitrosopyrrolidinu (NPYR) (upraveno podle Jägerstad a Skog, 2005)

Nitrosaminy přijaté potravou jsou spojovány s rakovinou jícnu a gastrointestinálního traktu, mohou také přispívat k rakovině plic (Goldman a Shields, 2003). NDMA a NDEA jsou podle IARC klasifikovány jako karcinogeny skupiny 2A (pravděpodobně karcinogenní pro lidi), NPYR a NPIP jako karcinogeny skupiny 2B (možná karcinogenní pro lidi) (IARC, 1987).

Nitrosaminy vznikají také při tepelné úpravě pokrmů, zejména při smažení tučných masných výrobků obsahujících dusitany nebo dusičnany (Stratil a Kubáň, 2005). Příkladem může být smažení slaniny, při kterém vzniká nitrosací aminokyseliny prolinu netěkavý nitrosamin NPRO, jenž je následně dekarboxylován na karcinogenní NPYR. S vyšší teplotou a delší dobou smažení je produkováno i více NPYR (Jägerstad a Skog, 2005).

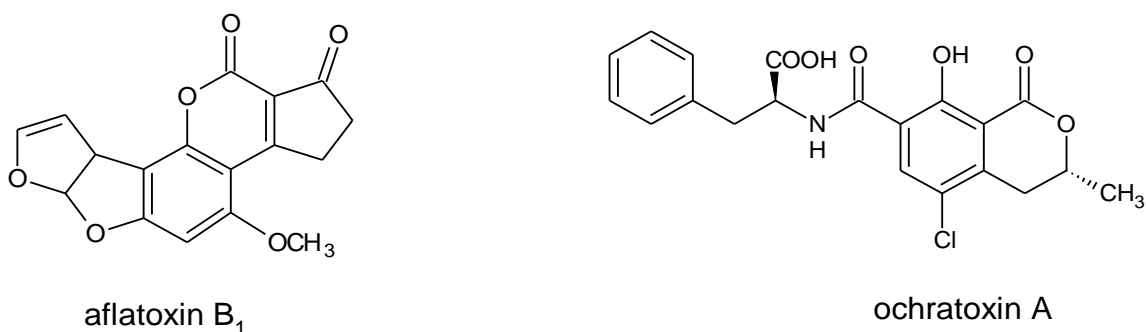
Aby nitrosaminy vykazovaly mutagenní či karcinogenní účinky, musí být nejprve metabolicky aktivovány (Jägerstad a Skog, 2005). Nitrosaminy mají společný mechanismus karcinogeneze, který bude popsán na příkladu aktivace *N*-nitrosodimethylaminu (NDMA), jenž je často obsažen v potravě. NDMA je nejprve hydroxylován, a to především enzymem CYP2E1, dále pak CYP2A6 (Goldman a Shields,

2003; Kamataki a kol., 1999). Následně je hydrolyzován na aldehyd a monoalkylnitrosamin, jehož přeskupením vzniká karbokation, silné alkylační činidlo, které může tvořit adukty s DNA. Aktivované nitrosaminy se mohou vázat na atom N- a atom O- bázi DNA. Tvorba O⁶-methylguaninu je snad nejzávažnější modifikací DNA, která zodpovídá za mutagenicitu a karcinogenitu těchto alkylačních činidel (Bartsch a Montesano, 1984; Goldman a Shields, 2003).

Pro snížení expozice nitrosaminů, a tedy i prevenci nádorových onemocnění je zapotřebí dle možnosti snižovat příjem prekurzorů nitrosaminů - dusitanů a dusičnanů a přijímat vitaminy C a E, jelikož inhibují tvorbu nitrosaminů (Bartsch a Montesano, 1984).

6.4 Mykotoxiny

Mykotoxiny jsou toxické sekundární metabolity produkované řadou plísní. Mají nepříznivý vliv na lidské zdraví (alergie, imunosuprese, karcinogeneze atd.) (Stratil a Kubáň, 2004). V rozvojových zemích tropických oblastí jsou mykotoxiny nejzávažnějšími potravními karcinogeny. Mohou vznikat v mnoha potravinách a krmivech kontaminovaných plísněmi (např. v obilovinách, kukuřici, olejnatých semenech), a to před či během sklizně plodin nebo během výroby a skladování potravin (Stark, 1980). Nejvýznamnější jsou mykotoxiny plísní rodu *Aspergillus*, *Penicillium* a *Fusarium* (Stratil a Kubáň, 2004). Z celosvětového hlediska jsou za nejzávažnější mykotoxiny považovány aflatoxiny, ochratoxin A (jejich struktura je znázorněna na obr. 8), zearalenon, některé trichotheceny a fumonisiny (Stratil a Kubáň, 2004).



Obr. 8: Struktura aflatoxinu B₁ a ochratoxinu A (upraveno podle Jay a kol., 2005)

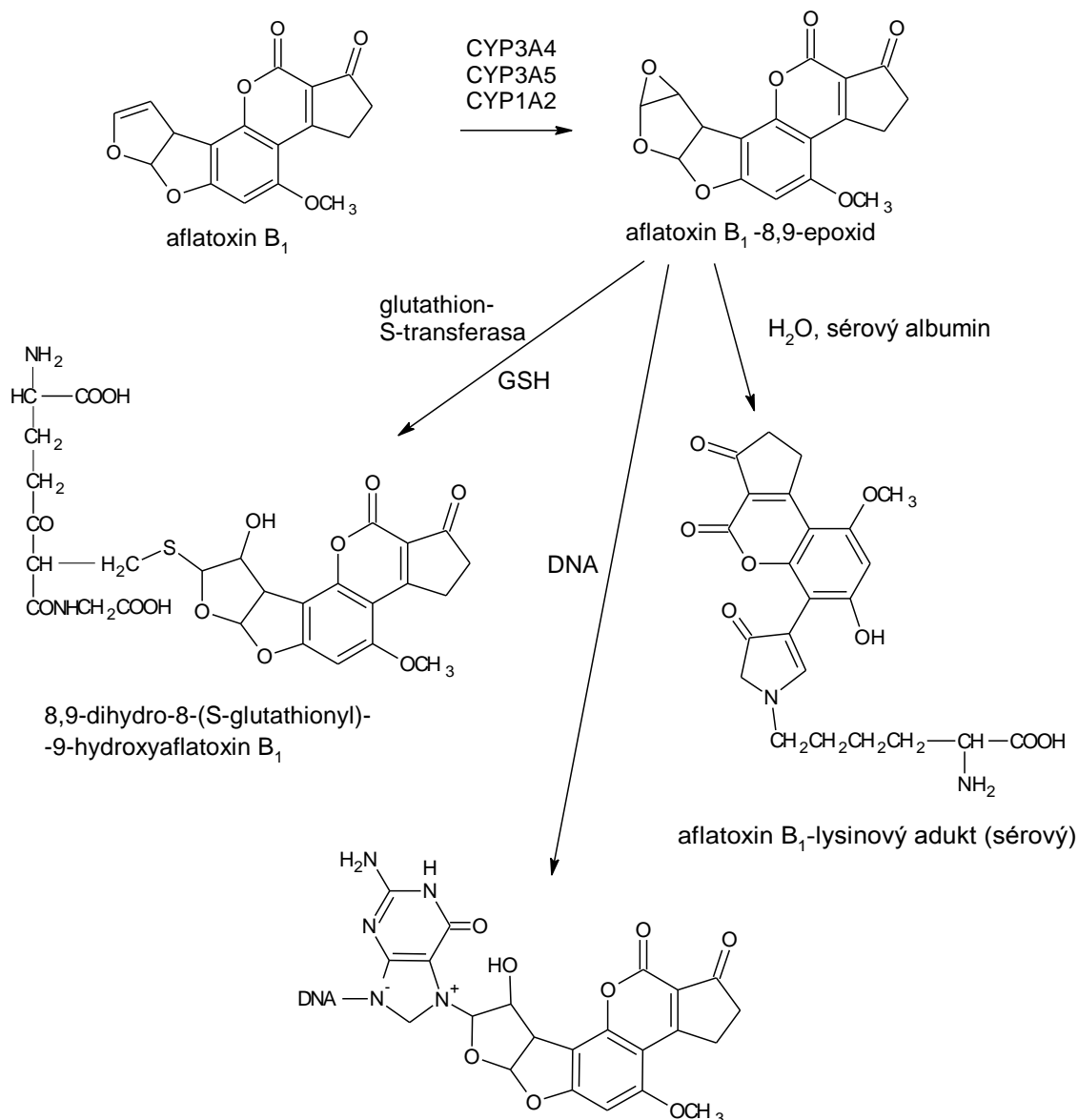
6.4.1 Aflatoxiny

Aflatoxiny jsou difuranokumarinové deriváty a s ohledem na jejich vysokou karcinogenitu jsou nejvíce studovanými mykotoxiny. Přírozně vyskytující se aflatoxiny jsou Podle IARC klasifikovány jako karcinogeny skupiny 1, tedy karcinogenní pro lidi (IARC, 1993). Mezi čtyři hlavní aflatoxiny patří aflatoxin B₁, B₂, G₁ a G₂, z nichž nejsilnější karcinogen je aflatoxin B₁ (Stark, 1980), který je zároveň i nejvíce produkovaným aflatoxinem. Aflatoxiny jsou produkovány především plísněmi *Aspergillus flavus*, který produkuje aflatoxin B₁ a B₂, a *Aspergillus parasiticus*, který je schopen produkovat všechny čtyři uvedené aflatoxiny (Jay a kol., 2005). Vyšší teplota a vlhkost jsou vhodné podmínky pro růst plísní produkujících aflatoxiny (Chu, 1991). Aflatoxiny kontaminují kukuřici, obiloviny, olejnatá semena, ořechy, fíky, arašidy, rýži a mnoho dalších plodin (Stratil a Kubáň, 2004; Chu 1991). Mléko a mléčné výrobky mohou být nepřímé zdroje aflatoxinů (Bennett a Klich, 2003). Pokud krávy konzumují krmivo kontaminované aflatoxinem B₁, v jejich mléce se může vyskytovat aflatoxin M₁, hydroxylovaný metabolický produkt aflatoxinu B₁, který je podle IARC klasifikován jako karcinogen skupiny 2B (možná karcinogenní pro lidi) (IARC, 1993). Dále se aflatoxiny mohou vyskytovat např. ve vajíčkách drůbeže či vepřovém mase, pokud jsou zvířata krmena potravou kontaminovanou aflatoxiny (Richard, 2007). Obsah aflatoxinů v potravě a krmivu je tedy v mnoha zemích přísně kontrolován a regulován. Primárním cílovým orgánem aflatoxinů jsou játra. Onemocnění způsobené aflatoxiny se nazývá aflatoxikóza. Akutní aflatoxikóza končí smrtí, výsledkem chronické aflatoxikózy může být rakovina či imunosuprese (potlačení obranyschopnosti imunitního systému) (Bennett a Klich, 2003).

6.4.2 Aflatoxin B₁

Aflatoxin B₁ je nejvíce produkovaným a studovaným aflatoxinem. Přítomnost dvojné vazby v krajním furanovém kruhu aflatoxinu B₁ je příčinou jeho silných toxických, mutagenních a karcinogenních účinků. Aflatoxin B₂, který tuto dvojnou vazbu postrádá, je mnohem méně mutagenní a karcinogenní (Stark, 1980; Miller a Miller, 1981). Aby měl aflatoxin B₁ mutagenní či karcinogenní účinky, musí být nejprve metabolicky aktivován cytochromy P450 - CYP3A4, CYP3A5 nebo CYP1A2 (Ueng a kol., 1995; Wang a kol.,

1998). Prostřednictvím uvedených enzymů je přeměněn na ultimální karcinogen 8,9-epoxid (ve starší literatuře je uváděn jako aflatoxin B₁-2,3-epoxid) (Lin a kol., 1977; Chu, 1991). Tento reaktivní intermediát může podstoupit konjugaci s glutathionem katalyzovanou glutathion-S-transferasou a následně být vyloučen z organismu, nebo se může vázat na DNA či proteiny, jak je znázorněno na obr. 9. Reaktivní intermediát 8,9-epoxid je schopný kovalentně modifikovat DNA vazbou na atom N⁷ guaninu, a vytvářet tak adukt 8,9-dihydro-8-(N⁷-guaninyl)-9-hydroxyaflatoxin B₁ (Sugimura, 2000).



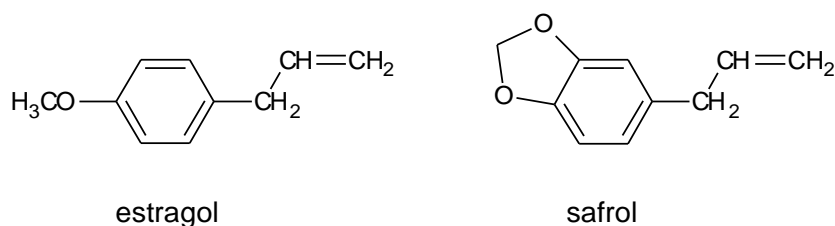
Obr. 9: Metabolická aktivace aflatoxinu B₁ na 8,9-epoxid, který tvoří adukty s DNA či sérovým albuminem nebo podstupuje konjugaci s glutathionem (GSH) (upraveno podle IARC, 1993)

6.5 Karcinogeny produkované rostlinami

Téměř všechny rostliny produkují toxické látky (např. přírodní pesticidy), které jim slouží k ochraně před plísněmi, hmyzem a živočichy. Množství přírodních pesticidů přijatých potravou je mnohonásobně vyšší než množství syntetických pesticidů (Ames a kol., 1990). Ačkoliv jsou tyto látky jedním z hlavních zdrojů toxických chemikálií pro lidi, jen málo z nich bylo testováno na karcinogenitu (Ames a kol., 1990). Přirozené pesticidy, které byly prokázány jako karcinogenní pro hlodavce, jsou obsaženy např. v koření (v anýzu, fenyklu, skořici, bazalce, černém pepři, muškátovém oříšku), v zelenině (v celeru, kvěťáku, kapustě, rajčatech), ale i v ovoci (v jablku, švestkách) (Ames a kol., 1990). Mezi tyto látky patří např. 5- či 8-methoxypsoralen (celer), allylisothiokyanát (kapusta, kvěťák, hořčice), D-limonen (pomerančový džus), kávová kyselina (mrkev, brambory, jablko, švestka, anýz, bazalka) (Ames a kol., 1990), dále pak safrol, estragol a pyrrolizidinové alkaloidy, které budou popsány podrobněji.

6.5.1 Safrol a estragol

Safrol (1-allyl-3,4-methylenedioxybenzen) a estragol (1-allyl-4-methoxybenzen) patří do skupiny alkenylbenzenů, jejich struktura je znázorněna na obr. 10.

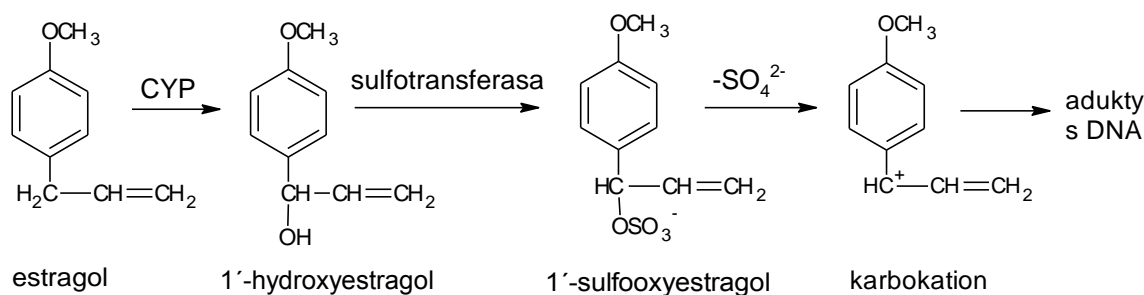


Obr. 10: Struktura estragolu a safrolu

Safrol je součástí mnoha koření, vyskytuje se v muškátovém květu a oříšku, skořici, anýzu, černém pepři či v bazalce. Je také obsažen v kokakolových nápojích. Estragol se vyskytuje v estragonu, bazalce, fenyklu a anýzu (Rietjens a kol., 2005). Safrol a estragol byly shledány jako hepatokarcinogenní pro myši, safrol i pro potkany (Miller a kol., 1983). Safrol je podle IARC klasifikován jako karcinogen skupiny 2B, tedy možná karcinogenní pro lidi (IARC, 1987). Jelikož jsou obě tyto látky přijímány potravou jen v malém

množství (jako minoritní komponenty), zdá se, že jejich příspěvek k celkové zátěži karcinogenů, kterým je náš organismus vystaven, je relativně malý (Miller a Miller, 1983).

Mechanismus karcinogeneze safrolu a estragolu je podobný, hlavní cesta jejich metabolické aktivace spočívá v přeměně na 1'-hydroxyderiváty. Na této aktivaci se podílí cytochromy P450, u estragolu jsou to hlavně CYP1A2 a CYP2A6, dále pak CYP2C19, CYP2D6 a CYP2E1, u safrolu pak CYP2A6, CYP2C9, CYP2D6 a CYP2E1 (Jeurissen a kol., 2007). Proximální karcinogen 1'-hydroxyestragol (či 1'-hydroxysafrol) je následně přeměněn sulfotransferasou na 1'-sulfooxyestragol (či 1'-sulfooxysafrol). Tento intermediát je nestabilní a spontánně se rozpadá na sulfát a karbokation - ultimální karcinogen, který může tvořit adukty s DNA (Zhou a kol., 2007; Miller a Miller, 1983). Metabolická aktivace estragolu je znázorněna na obr. 11.



Obr. 11: Hlavní cesta metabolické aktivace estragolu (upraveno podle Jeurissen a kol., 2007)

Vedle uvedené metabolické aktivace může estragol a 1'-hydroxyestragol také podstupovat epoxidaci, a tvořit tak další elektrofilní a karcinogenní metabolity, estragol-2',3'-oxid a 1'-hydroxyestragol-2',3'-oxid. Tyto intermediáty mohou být ovšem rychle detoxikovány epoxidhydrolasou a glutathion-S-transferasou, a nejsou tedy hlavními karcinogenními metabolity (Guenthner a Luo, 2001; Zhou a kol., 2007). Obdobné metabolity tvoří taktéž safrol, který může být metabolicky aktivován ještě dalším způsobem. *O*-dealkylací safrolu katalyzovanou CYP vzniká 4-allylkatechol, který může být oxidován na 4-allyl-*o*-chinon, elektrofilní toxický metabolit (Bolton a kol., 1994; Zhou a kol., 2007).

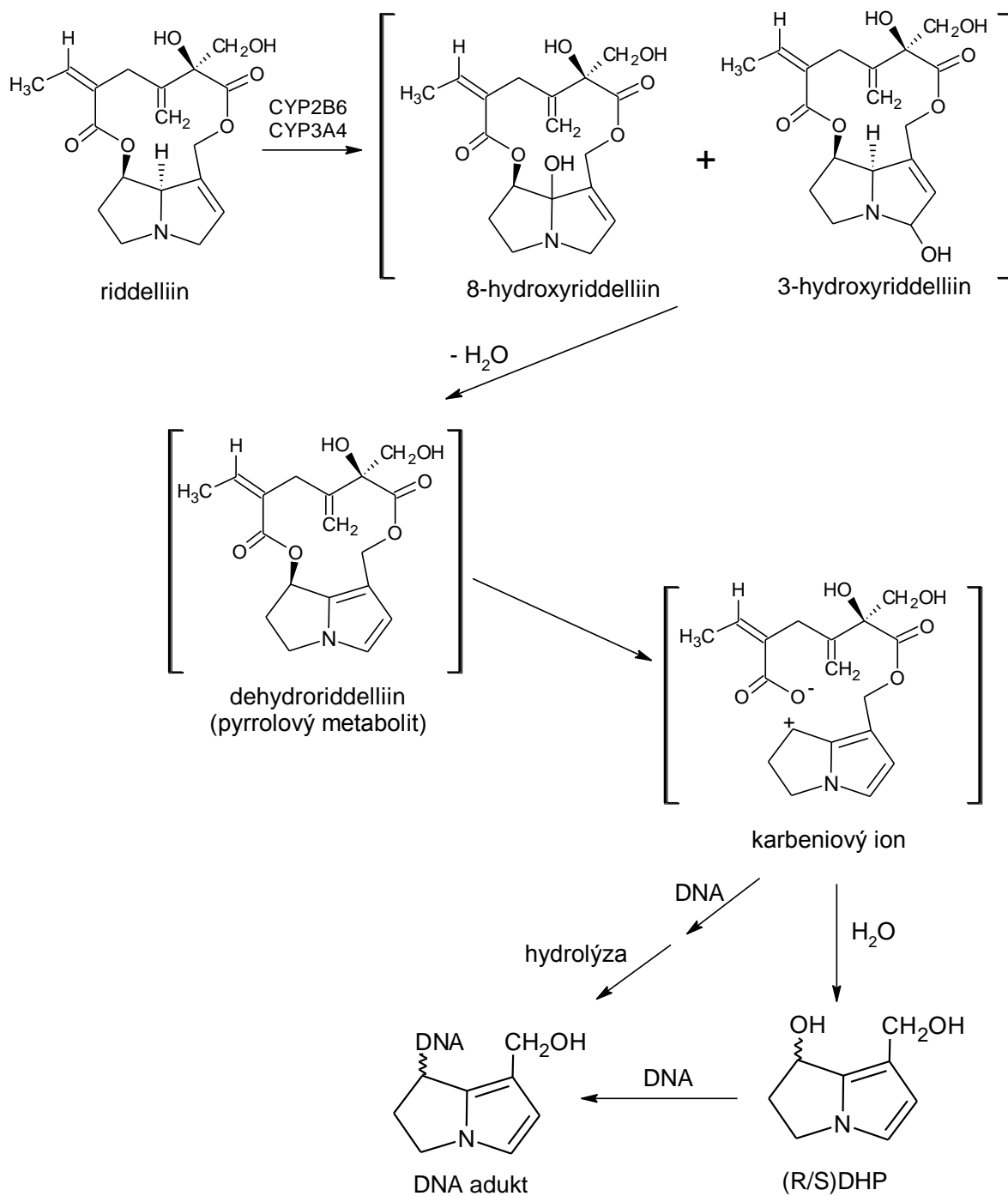
6.5.2 Pyrrolizidinové alkaloidy

Pyrrolizidinové alkaloidy představují velkou skupinu alkaloidů obsahujících ve své struktuře pyrrolizidinové jádro, mnoho z nich je toxických. Rostliny obsahující pyrrolizidinové alkaloidy jsou rozšířeny po celém světě a způsobily již mnoho otrav u lidí i hospodářských zvířat. Nachází se zejména v rostlinách z čeledi brutnákovitých, hvězdicovitých a bobovitých (Cheeke, 1988). Mnoho pyrrolizidinových alkaloidů je hepatotoxických, některé jsou též karcinogenní (Cheeke, 1988). Většina hepatotoxických pyrrolizidinových alkaloidů jsou estery nenasycených necinových bází, dvojná vazba mezi atomem C1 a C2 je klíčová pro toxicitu (Cheeke, 1988). Mezi pyrrolizidinové alkaloidy, které indukují nádory u experimentálních zvířat, patří např. lasiokarpin, monokrotalin, senkirkin, retrorsin či jakobin (Fu a kol., 2001). První dva jmenované jsou podle IARC klasifikovány jako karcinogeny skupiny 2B, tedy možná karcinogenní pro lidi (IARC, 1987).

Bylinné čaje a medikamenty mohou obsahovat toxické pyrrolizidinové alkaloidy. Některé evropské byliny jako kostival lékařský (čeleď brutnákovité), podběl lékařský, starček přímětník a starček obecný (čeleď hvězdicovitá) obsahují tumorogenní pyrrolizidinové alkaloidy (Fu a kol., 2001). Některé byliny používané v tradiční čínské medicíně obsahují toxické pyrrolizidinové alkaloidy (Fu a kol., 2001). Pyrrolizidinové alkaloidy se mohou kontaminací dostat též do pšenice, mléka či medu (Fu a kol., 2004).

Pyrrolizidinové alkaloidy musí být nejprve metabolicky aktivovány, aby vykazovaly toxické účinky (Fu a kol., 2001). Metabolická aktivace začíná hydroxylací nenasyceného pyrrolizidinového kruhu za vzniku 8- nebo 3-hydroxynecinového derivátu. Tento intermediát není stabilní a jeho dehydratací vzniká dehydropyrrolizidinový (pyrrolový) derivát. Pyrrolový metabolit je reaktivní alkylační činidlo, které může modifikovat DNA či proteiny tvorbou aduktů s DNA nebo může způsobit tzv. „cross-linking“ (propojení molekul), a to „DNA-DNA cross-linking“ či „DNA-protein cross-linking“ (Fu a kol., 2001). Za metabolickou aktivaci pyrrolizidinových alkaloidů na reaktivní pyrrolové metabolity zodpovídají především cytochromy P450 - CYP2B6 a CYP3A4 (Fu a kol., 2001). Pyrrolové metabolity mohou být detoxikovány glutathion-S-transferasou. Na detoxikaci pyrrolizidinových alkaloidů se podílí též enzymy podrodiny CYP3 a flavinové monooxygenasy, které je přeměňují na *N*-oxidy (Fu a kol., 2004).

Na obr. 12 (str. 45) je schematicky znázorněna metabolická aktivace pyrrolizidinového alkaloidu riddelliinu na reaktivní dehydroriddelliin, který se rozpadá na karbeniový ion. Ten se může přímo vázat na DNA a tvořit tak adukty, nebo je hydrolyzován za vzniku racemické směsi dehydroretronecinu a dehydroheliotridinu - (R/S)-6,7-dihydro-7-hydroxy-1-hydroxymethyl-5H-pyrrolizinu neboli (R/S)DHP, který může též tvořit adukty s DNA (Fu a kol., 2001). Riddelliin je makrocyclický diester necinové báze retronecinu. Vyskytuje se zejména u rostlin rodu *Senecio* z čeledi hvězdnicovitých. Z evropských rostlin je přítomný např. ve starčeku přímětníku a starčeku obecném. Rostliny rodu *Senecio* obsahující riddelliin se ale vyskytují zejména ve Spojených státech amerických. Riddelliin způsobuje akutní toxicitu, zároveň je i genotoxický (Fu a kol., 2001). Způsobil již mnoho otrav dobytka. Kontaminací se může riddelliin dostat i do lidské potravy, byl např. nalezen v mléce a medu (Fu a kol., 2001).



Obr. 12: Metabolická aktivace riddelliinu (upraveno podle Fu a kol., 2001; Fu a kol., 2004)
 (R/S)DHP – (R/S)-6,7-dihydro-7-hydroxy-1-hydroxymethyl-5H-pyrrolizin (racemická směs)

7 Závěr

Potrava hraje významnou roli v procesu karcinogeneze. V potravě se nachází řada karcinogenních látek. Aby potravní karcinogeny vykazovaly karcinogenní účinky, musí být většinou metabolicky aktivovány. Za jejich metabolickou aktivaci zodpovídají především mikrosomální cytochromy P450 (CYP1A2, 1A1, 1B1, 2E1, 2A6, 2C9, 2C19, 2B6, 2D6, 3A4, 3A5), které je přeměňují na reaktivní elektrofilní intermediáty schopné modifikovat DNA (Stiborová a kol., 1999). Z hlediska karcinogeneze je za nejzávažnější modifikaci DNA považována tvorba kovalentních aduktů. Perzistentní adukty mohou způsobit mutace v klíčovách genech, onkogenech a tumor-supresorových genech, a vyvolat tak nádorový proces.

Pro prevenci nádorových onemocnění je důležité omezit expozici organismu karcinogenům. V této práci byly uvedeny různé skupiny potravních karcinogenů. Polycyklické aromatické uhlovodíky, heterocyklické aminy a nitrosaminy, které byly detailně popsány, vznikají při technologickém zpracování potravin či při tepelné úpravě masa. Omezením přípravy pokrmů z masa při vysokých teplotách (grilování, smažení, uzení) nebo též omezením konzumace uzenin můžeme snížit příjem těchto toxických látek. Aflatoxiny jsou produkovány především plísněmi *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*. Jsou to silně toxické a karcinogenní látky, jejichž obsah v potravinách je přísně kontrolován. Rostliny představují další zdroj toxických látek. Safrol a estragol, které jsou přítomny v koření (např. v bazalce, anýzu), a pyrrolizidinové alkaloidy (bylinné čaje) jsou zástupci potenciálně karcinogenních látek rostlinného původu. Vedle karcinogenních látek jsou v potravě přítomny též látky, které snižují riziko vzniku rakoviny (např. antioxidanty, vláknina a inhibitory aktivačních enzymů). Znalost mechanismu metabolické přeměny potravních karcinogenů a tedy i příslušných cytochromů P450, které se podílí na jejich metabolické aktivaci, je důležitá pro prevenci nádorových onemocnění. Detailní poznání mechanismu aktivity cytochromů P450 může významně přispět k pokroku v terapii i prevenci rakoviny, proto jsou tyto hemthiolátové enzymy intenzivně studovány.

Seznam použité literatury

- Aimová, D., Poljaková, J., Kotrbová V., Moserová, M., Frei, E., Arlt, V.M., Stiborová, M.:
Interdisc. Toxicol. 1, 160-168 (2008)
- Alexandrov, K., Rojas, M., Satarug, S.: Toxicol. Lett. 198, 63-68 (2010)
- Ames, B.N., Profet, M., Gold, L.S.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7777-7781 (1990)
- Anand, P., Kunnumakara, A.B., Sundaram, Ch., Harikumar, K.B., Tharakan, S.T., Lai,
O.S., Sung, B., Aggarwal, B.B.: Pharm. Res. 25, 2097-2116 (2008)
- Andersson, L.A., Dawson, J.H.: Structure Bonding 74, 1-40 (1991)
- Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E.: Cell. Mol. Life Sci. 58, 737-747 (2001)
- Baird, W.M., Hooven, L.A., Mahadevan, B.: Environ. Mol. Mutagen. 45, 106-114 (2005)
- Bartsch, H., Montesano, R.: Carcinogenesis 5, 1381-1396 (1984)
- Beedham, C.: Pharm. World Sci. 19, 255-263 (1997)
- Bennett, J.W., Klich, M.: Clin. Microbiol. Rev. 16, 497-516 (2003)
- Bolton, J.L., Acay, N.M., Vukomanovic, V.: Chem. Res. Toxicol. 7, 448-450 (1994)
- Correia, M.A., Ortiz de Montellano, P.R.: Inhibition of Cytochrome P450 Enzymes,
v knize Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry (Third Edition)
(Ortiz de Montellano, P.R. ed.) Kluwer Academic / Plenum Publishers, str. 247-322,
New York (2005)
- Crofts, F.G., Sutter T.R., Strickland, P.T.: Carcinogenesis 19, 1969-1973 (1998)
- Danielson, P.B.: Curr. Drug Metab. 3, 561-597 (2002)
- Felton, J. S., Fultz, E., Dolbeare, F.A., Knize, M.G.: Food Chem. Toxicol. 32, 897-903
(1994)
- Fu, P.P., Chou, M.W., Xia, Q., Yang, Y.C., Yan, J., Doerge, D.R., Chan, P.C.: Environ.
Carcinog. Ecotoxicol. Rev. 19, 353-385 (2001)
- Fu, P.P., Xia, Q., Lin. G., Chou, M.W.: Drug Metab. Rev. 36, 1-55 (2004)
- Grandér, D.: Med. Oncol. 15, 20-26 (1998)
- Goldman, R., Shields, P.G.: J. Nutr. 133, 965-973 (2003)
- Guengerich, F.P.: Cytochrome P450, v knize Enzyme Systems that Metabolise Drugs and
Other Xenobiotics, (Ioannides C. ed.) John Wiley & Sons, Chichester, str. 33-66
(2001)
- Guenther, T.M., Luo, G.: Toxicology 160, 47-58 (2001)

- Hammons, G.J., Milton, D., Stepps, K., Guengerich, F.P., Tukey, R.H., Kadlubar, F.F.:
Carcinogenesis 18, 851-854 (1997)
- Hasler, J. A., Estabrook, R., Murray, M., Pikuleva, I., Waterman, M., Capdevila, J., Holla, V., Helvig, Ch., Falck, J.R., Farrell, G., Kaminsky, L.S., Spivack, S.D., Boitier, E., Beaune, P.: Mol. Aspects Med. 20, 1-137 (1999)
- Hasemann, Ch. A., Kurumbail, R.G., Boddupalli, S.S., Peterson, J.A., Deisenhofer, J.:
Structure 3, 41-62 (1995)
- Hodek, P., Křížková, J., Burdová, K., Šulc, M., Kizek, R., Hudeček, J., Stiborová, M.:
Chem. Biol. Interact. 180, 1-9 (2009)
- Hodek, P., Trefil, P., Stiborová, M.: Chem. Biol. Interact. 139, 1-21 (2002)
- Hodgson, E.: A Textbook of Modern Toxicology (Third Edition). John Wiley & Sons,
Hoboken (2004)
- Cheeke, P.R.: J. Anim. Sci. 66, 2434-2350 (1988)
- Chu, F.S.: Mutat. Res. 259, 291-306 (1991)
- IARC: IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Hum. 32, 1-477 (1983)
- IARC: IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 56, 1-599 (1993)
- IARC: IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. 92, 1-853 (2010)
- IARC: IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum. Suppl. 7, 1-440 (1987)
- Ioannides, C.: Xenobiotic Metabolism: An Overview, v knize Enzyme Systems that
Metabolise Drugs and Other Xenobiotics, (Ioannides C. ed.) John Wiley & Sons,
Chichester, str. 1-32 (2001)
- Ito, N., Hasegawa, R., Sano, M., Tamano, S., Esumi, H., Takayama, S., Sugimura, T.:
Carcinogenesis 12, 1503-1506 (1991)
- Jancová, P., Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E.: Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky
Olomouc Czech Repub. 154, 103-116 (2010)
- Jägerstad, M., Skog, K.: Mutat. Res. 574, 156-172 (2005)
- Jay, J.M., Loessner, M.J., Golden, D.A.: Modern Food Microbiology (Seventh Edition).
Springer Science & Business Media, New York (2005)
- Jeurissen, S.M., Punt, A., Boersma, B.G., Boqaards, J.J., Fiameqos, Y.C., Schilter, B.,
van Bladeren, P.J., Cnubben, N.H., Rietjens, I.M.: Chem. Res. Toxicol. 20, 798-806
(2007)
- Kamataki, T., Nunoya, K., Sakai, Y., Kushida, H., Fujita, K.: Mutat. Res. 428, 125-130
(1999)

- Keating, G.A., Layton, D.W., Felton, J.S.: *Mutat. Res.* 443, 149-156 (1999)
- Knejzlík, Z., Káš, J., Ruml, T.: *Chem. Listy* 94, 913-918 (2000)
- Křížková, J.: Effects of chemopreventive compounds on cytochrome P450s: Doktorská disertační práce PřF UK Praha, katedra biochemie, str. 10 (2010)
- Lin, D., Kaderlik, K.R., Turesky, R.J., Miller, D.W., Lay, J.O., Kadlubar, F.F.: *Chem. Res. Toxicol.* 5, 691-697 (1992)
- Lin, J.H., Lu, A.Y.: *Clin. Pharmacokinet.* 35, 361-390 (1998)
- Lin J.K., Miller, J.A., Miller, E.C.: *Cancer Res.* 37, 4430-4438 (1977)
- Liu, Ch., Russell, R.M.: *Nutr. Rev.* 66, 237-249 (2008)
- Miller, E.C., Miller, J.A.: *Cancer* 47, 2327-2345 (1981)
- Miller, E.C., Miller, J.A.: *Br. J. Cancer* 48, 1-15 (1983)
- Miller, E.C., Swanson, A.B., Phillips, D. H., Fletcher, T.L., Liem, A., Miller, J.A.: *Cancer Res.* 43, 1124-1134 (1983)
- Monostory, K., Pascussi, J.M.: *Acta Chim. Slov.* 55, 20-37 (2008)
- Nagao, M., Ushijima, T., Wakabayashi, K., Ochiai, M., Kushida, H., Sugimura, T., Hasegawa, R., Shirai, T., Ito, N.: *Cancer* 74, 1063-1069 (1994)
- Nečas, E., Kofránek, J., Krijt, J., Maršálek, P., Maruna, P., Mělková, Z., Prokešová, L., Šimák, J., Šulc, K., Vokurka, M.: *Obecná patologická fyziologie (třetí vydání)*. Karolinum, Praha (2004)
- Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R. Gonzales, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., Okuda, K., Nebert, D.W.: *DNA Cell. Biol.* 12, 1-51 (1993)
- Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C., Nebert, D.W.: *Pharmacogenetics* 6, 1-42 (1996)
- Omura, T., Sato, R.: *J. Biol. Chem.* 237, 1375-1376 (1962)
- Oster, S., Penn, L., Stambolic, V.: *Oncogenes and Tumor Suppressor Genes*, v knize *Science of Oncology* (Tannock, I.F., Hill, R.P., Bristow, R.G., Harrington, L. ed.) (Fourth Edition), McGraw-Hill Companies, USA, str. 123-141 (2005)
- Peterson, J.A., Graham, S.E.: *Structure* 6, 1079-1085 (1998)
- Richard, J.L.: *Int. J. Food Microbiol.* 119, 3-10 (2007)
- Rietjens, I.M., Boersma, M.G., van der Woude, H., Jeurissen, S.M., Schutte, M.E., Alink, G.M.: *Mutat. Res.* 574, 124-138 (2005)

- Rosypal, S.: Úvod do molekulární biologie. Třetí díl, Molekulární biologie virů, mutagenese, kancerogeneze a rekombinace. Opravy poškozené DNA (třetí inovované vydání). Rosypal, Brno (2000)
- Shimada, T., Fujii-Kuriyama, Y.: *Cancer Sci.* 95, 1-6 (2004)
- Shimada, T., Guengerich F.P.: *Cancer Res.* 51, 5284-5291 (1991)
- Shirai, T., Sano, M., Tamano, S., Takahashi, S., Hirose, M., Mitsuru, F., Hasegawa, R., Imaida, K., Matsumoto, K., Wakabayashi, K., Sugimura, T., Ito, N.: *Cancer Res.* 57, 195-198 (1997)
- Schut, H.A.J., Snyderwine, E.G.: *Carcinogenesis* 20, 353-368 (1999)
- Singh, R., Arlt, V.M., Henderson, C.J., Phillips, D.H., Farmer, P.B., Gamboa da Costa, G.: *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 878, 2155-2162 (2010)
- Skog, K.I., Johansson, M.A.E., Jägerstad, M.I.: *Food. Chem. Toxicol.* 36, 879-896 (1998)
- Snyderwine, E.G.: *Environ. Mol. Mutagen.* 39, 165-170 (2002)
- Stark, A.A.: *Annu. Rev. Microbiol.* 34, 235-262 (1980)
- Stratil, P., Kubáň, V.: *Chem. Listy* 98, 379-387 (2004)
- Stratil, P., Kubáň, V.: *Chem. Listy* 99, 3-12 (2005)
- Stiborová, M.: *Chem. Listy* 96, 784-791 (2002)
- Stiborová, M.: Sborník z multioborového semináře „Otevřená věda” (2005)
- Stiborová, M., Frei, E., Bieler, Ch.A., Schmeiser, H.H.: *Chem. Listy* 92, 661-668 (1998)
- Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E. *Chem. Listy* 93, 229-237 (1999)
- Stiborová, M., Hudeček, J., Páca Jr., J., Martínek, V., Páca, J.: *Chem. Listy* 98, 876-890 (2004)
- Sugimura, T.: *Carcinogenesis* 21, 387-395 (2000)
- Sugimura, T., Nagao, M., Wakabayashi, K.: *Environ. Health Perspect.* 104, 429-433 (1996)
- Sutandyo, N.: *Acta Med. Indones.* 42, 36-42 (2010)
- Tomaniová, M., Kocourek, V., Hajšlová, J.: *Chem. Listy* 91, 357-366 (1997)
- Ueng, Y.F., Shimada, T., Yamazaki, H., Gungerich, F.P.: *Chem. Res. Toxicol.* 8, 218-225 (1995)
- Wakabayashi, K., Nagao, M., Esumi, H., Sugimura, T.: *Cancer Res.* 52, 2092-2098 (1992)
- Wang, H., Dick, R., Yin, H., Licad-Coles, E., Kroetz, D.L., Szklarz, G., Harlow, G., Halpert, J.R., Correia, M.A.: *Biochemistry* 37, 12536-12545 (1998)
- Zhou, S.F., Xue, Ch.Ch., Yu, X.Q., Wang, G.: *Curr. Drug Metab.* 8, 526-553 (2007)

Waxman, D.J.: Arch. Biochem. Biophys. 369, 11-23 (1999)

Werck-Reichhart, D., Feyereisen, R.: Genome Biol. 1, 3003.1-3003.9 (2000)

Williams, S.N., Dunham, E., Bradfield, Ch.A.: Induction of Cytochrome P450 Enzymes, v knize Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and Biochemistry (Third Edition) (Ortiz de Montellano, P.R. ed.) Kluwer Academic / Plenum Publishers, str. 323-346, New York (2005)

Williams, G.M.: Toxicology 166, 3-10 (2001)

Internetové zdroje:

<http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf>

(5.3. 2011) - Stiborová, M.: Sborník z multioborového semináře „Otevřená věda” (2005)

<http://drnelson.uthsc.edu/talks/P450lect.2009.pdf> (23.3. 2011)

<http://drnelson.uthsc.edu/P450.statistics.Aug2009.pdf> (23.3. 2011)

<http://metallo.scripps.edu/promise/P450.html> (23.3. 2011)

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsGroupOrder.pdf> (27.4. 2011)

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

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka