

2005

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE



Studium tvorby aduktů karcinogenního *o*-anisidinu s DNA

Diplomová práce

Karel Naiman

školitel: Doc. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2006

Přírodovědecká fakulta UK

KNIHOVNA CHEMIE



3233217258

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením školitelky doc. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze dne 3.5.2006

Michal Štěpánek
.....

Poděkování

V prvé řadě bych rád poděkoval školitelce Doc. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. nejen za odborné vedení, ale i za příjemný lidský přístup při vypracovávání diplomové práce.

Dále děkuji Mgr. Lucii Kejíkové a RNDr. Václavu Martínkovi PhD. za jejich trpělivost a výborné rady.

V neposlední řadě patří moje poděkování také všem členům laboratoře, kteří mi velmi pomáhali po celou dobu vypracovávání diplomové práce.

Obsah

1	ÚVOD	6
2	BIOMONITOROVÁNÍ DNA ADUKTŮ	7
3	VZNIK DNA ADUKTŮ	11
4	METODY DETEKCE DNA ADUKTŮ	14
4.1	IMUNODETEKCE.....	17
4.2	FLUORESCENČNÍ STANOVENÍ.....	17
4.3	HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE (MS)	18
4.3.1	<i>Příprava vzorku k analýze aduktů v DNA pomocí MS</i>	18
4.3.2	<i>Použití MS pro identifikaci DNA aduktů</i>	19
4.3.3	<i>Předpokládané použití MS v identifikaci aduktů</i>	23
4.4	„ ³² P-POSTLABELING“	23
4.4.1	<i>Zhodnocení metody „³²P-postlabeling“</i>	27
4.4.2	<i>Užití metody „³²P-postlabeling“</i>	28
5	O-ANISIDIN	30
6	CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	34
7	MATERIÁL A METODY	35
7.1	MATERIÁL.....	35
7.2	METODY.....	35
7.2.1	<i>Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)</i>	35
7.2.2	<i>Hmotnostní spektrometrie (MS)</i>	37
7.2.3	<i>„³²P-Postlabeling“ aduktů derivovaných od o-anisidinu tvořených in vitro a in vivo</i>	38
8	VÝSLEDKY	39
8.1	METABOLISMUS O-ANISIDINU.....	39
8.1.1	<i>Separace produktů metabolismu o-anisidinu králičími mikrozomy pomocí HPLC</i>	39

8.1.2	<i>Závislost tvorby metabolitů o-anisidinu M1 a M2 na době inkubace reakční směsi obsahující králičí mikrozomy</i>	40
8.1.3	<i>Závislost tvorby metabolitů o-anisidinu M1 a M2 na koncentraci cytochromu P450 v reakční směsi</i>	41
8.1.4	<i>Závislost tvorby metabolitů o-anisidinu M1 a M2 na koncentraci o-anisidinu v reakční směsi s mikrozomálním systémem králíka</i>	42
8.2	PŘEMĚNA N-(2-METHOXYFENYL)HYDROXYLAMINU JATERNÍMI MIKROZOMY KRÁLÍKA	43
8.2.1	<i>Separace produktů metabolismu N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu jaterními králičími mikrozomy pomocí HPLC</i>	43
8.2.2	<i>Závislost tvorby produktů přeměny N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu, M1 a M2, na době inkubace reakční směsi</i>	44
8.2.3	<i>Závislost tvorby metabolitů M1 a M2 na množství cytochromu P450 v reakční směsi obsahující N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin a mikrozomální systém králíka</i>	45
8.2.4	<i>Závislost tvorby metabolitů M1 a M2 na koncentraci N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu v reakční směsi s králičími mikrozomy</i>	46
8.3	INTERKONVERZE METABOLITŮ M1 A M2 V ZÁVISLOSTI NA ČASE A TEPLOTĚ	47
8.4	CHARAKTERIZACE METABOLITŮ O-ANISIDINU POMOCÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE	49
8.5	REAKCE N-(2-METHOXYFENYL)HYDROXYLAMINU S DNA A DEOXYRIBONUKLEOTIDY	50
8.6	CHARAKTERIZACE ADUKTU Z DEOXYGUANOSINU A N-(2-METHOXYFENYL)HYDROXYLAMINU	52
8.6.1	<i>Příprava aduktů deoxyguanosinu a N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu</i>	52
8.6.2	<i>Hmotnostní spektrometrie majoritního aduktu</i>	56
8.6.3	<i>Charakterizace syntetizovaného aduktu</i>	59
9	DISKUSE	60
10	SOUHRN A ZÁVĚR	63
11	SEZNAM ZKRATEK	65
12	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	67

1 Úvod

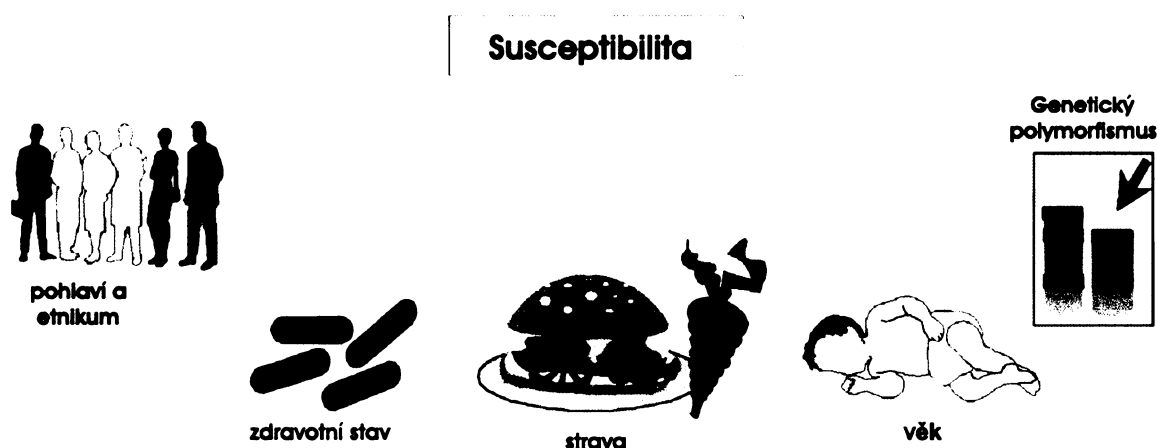
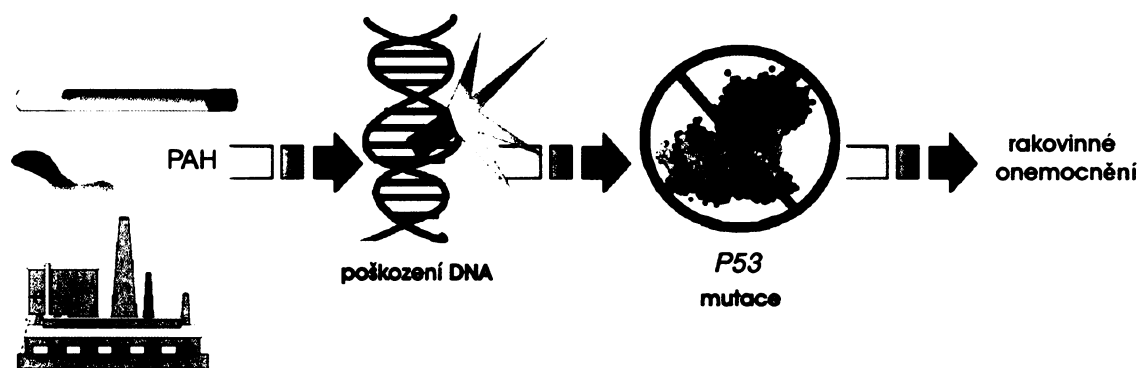
Již sir Francis Colins řekl: „There are no perfect specimens.“, což ve volném překladu znamená, že nikdo a nic není dokonalé. Ve vztahu k této práci bych jen rád uvedl, že vždy existuje riziko vzniku chyby v genetické informaci, která může vést k vývoji nádoru. Rakovinná onemocnění umožňuje právě mimořádně složitý systém regulace růstu a diferenciací buněk. Jeho složitost zabezpečuje naprosto pečlivý systém regulace, ale nabízí mnoho míst, která mohou být ovlivněna, a tím lze umožnit nekontrolované dělení buněk.

Mezi velké množství aspektů, které ovlivňují kancerogenezi, patří především množství vnějších faktorů, kterým jsme vystaveni v každodenním životě, jako např. strava, látky znečišťující životní prostředí, kouření.¹ Organismus je vystaven komplexní směsi známých i doposud zcela neznámých kancerogenů/mutagenů. Uvádí se, že vnější faktory přímo nebo nepřímo podmiňují vznik 70 až 95% všech nádorů.² Každý jedinec však nemá úplně stejnou pravděpodobnost vzniku jistého typu nádorů, ale velmi záleží na jeho susceptibilitě (senzitivitě) k danému onemocnění (Obr. 1), která je charakterizována genetickými predispozicemi, rasou, věkem nebo pohlavím (Tab. 1). Pouze 5% ze všech typů tohoto závažného onemocnění lze přisoudit jenom genetickým faktorům.³ Zbytek případů však vzniká společným působením vlivů vnějšího prostředí a menší, či větší senzitivitě organismu. To je velmi optimistická zpráva pro prevenci. Znamená to, že vzniku rakoviny lze aktivně předcházet. Tato skutečnost vyzývá vědce studovat právě interakce cizorodých látek s DNA a uplatnit získané vědomosti v klinické praxi. Tlak společnosti stále roste. Výskyt nádorových onemocnění se stává stále palčivějším problémem. Jen ve Spojených státech je ročně diagnostikováno 1,4 milionu nových případů a ve světě na toto onemocnění umírá každý rok 6,6 milionu lidí.⁴ Poznáním mechanismu působení kancerogenů na organismus je možné celý proces lépe pochopit a na molekulární úrovni ovlivnit. V předkládané diplomové práci je z tohoto hlediska sledován karcinogenní aromatický amin, *o*-anisidin.

2 Biomonitorování DNA aduktů

Molekulární epidemiologie, relativně nový přístup, který využívá „biomarkery“ ke studiu rizikových faktorů na vývoj nádorového onemocnění v populaci, dokumentuje interakci expozičních faktorů a susceptibility (senzitivity) jedinců ke vzniku rakovinné buňky a na základě těchto studií užívá tři typy "biomarkerů" důležitých pro vývoj nádorových procesů:⁵⁻⁹

1. adukty v DNA (především kovalentní modifikace DNA)
2. mutační změny v regulačních genech („reporter genes“)
3. polymorfismus v genech kodujících metabolické detoxikační, aktivační a také reparační enzymy



Obr. 1 Předpokládaná cesta kancerogeneze, která začíná expozicí polycyklickým aromatickým uhlovodíkům (PAH, "polycyclic aromatic hydrocarbons"), vedoucí k vytvoření aduktů v DNA. Tyto adukty mohou způsobit mutace v genech jako p53. Mutace poškodí normální funkci proteinu. Celý proces kancerogeneze je ovlivněn susceptibilitou (senzitivitou) každého organismu ke vzniku nádorové buňky. (převzato z [3])

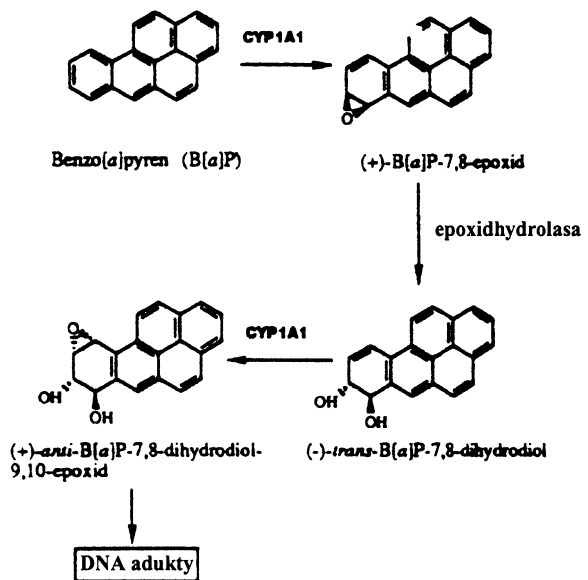
ad 1) Kancerogeny vážící se na DNA, RNA a některé proteiny (hemoglobin, albumin) tvoří adukty, které poskytují informaci o tom, že byl organismus vystaven danému kancerogenu, a jsou také indikátorem vzniku prekancerogenních lézí.

Adukty běžně tvoří například polycyklické aromatické uhlovodíky („polycyclic aromatic hydrocarbons“, PAH), vznikající spalováním fosilních paliv a aromatických aminů v cigaretovém kouři. Obecně se tvoří více aduktů PAH-DNA u osob, které kouří nebo jsou vystavené působení PAH např. na pracovišti. Studie však ukazují značné interindividuální rozdíly v množství vzniklých aduktů za stejných podmínek expozice.^{5,6} Právě adukty PAH-DNA (diolepoxidbenzo(a)pyrenu,) výrazně zvyšují pravděpodobnost vzniku rakoviny plic.^{10,11} Aktivaci benzo(a)pyrenu ilustruje obrázek 2.

V případě kuřáků byla zjištěna zvýšená množství aduktů hemoglobinu a aromatických aminů (4-aminobifenyly). Některé studie spojují hemoglobinové adukty se zvýšeným rizikem vzniku rakoviny močového měchýře.¹²

ad 2) Dalším „biomarkerem“ jsou mutace regulačních genů. Tumor supresorový gen p53 je mutován ve 40 až 50% nádorů plic, prsu a tlustého střeva.³ K určitým mutačním změnám dochází v závislosti na expozici také typu rakoviny. V některých případech byly vzorky aduktů v DNA a indukovaných mutacích shodné s experimentálně získanými daty.^{8,9,12,13} Například při nádorech plic a prsu nejčastěji dochází k mutaci G T, která je experimentálně indukována diolepoxidem a dále se zvyšuje s množstvím cigaret u kuřáků s nádorem plic.^{8,9,12,13}

ad 3) Celkově je však nutné zdůraznit, že vznik uvedených aduktů a mutace p53 je velice významně ovlivněna polymorfismem enzymů metabolizujících cizorodé látky. Uvedené tři typy "biomarkerů" jsou považovány za indikátory možnosti vzniku rakoviny. Variace v expresi nebo formě genů pro enzymy metabolizující cizorodé látky (jako jsou



Obr. 2 Metabolická aktivace benzo(a)pyrenu (B(a)Pa tvorba DNA aduktů (převzato z [13])

cytchromy P450, glutathion S-transferasa a N-acetyl transferasa) silně ovlivňují individuální odpověď vůči kancerogenům.

Zajímavá studie, ve které byly sledovány markery molekulárního a genetického poškození ve vzorcích krve, byla provedena u obyvatel Slezska a lidí žijících na venkově v méně znečištěné části Polska.¹⁴ Výsledky ukazují, že vystavení organismu znečištěnému životnímu prostředí je spojeno s významným zvýšením ve výskytu aduktů v DNA, zvýšenou frekvencí výměny sesterských chromatid a také poškozením chromozomů stejně jako zdvojnásobení exprese onkogenu *ras*. Adukty v DNA korelovaly s chromozomální mutací a ukázaly propojení mezi expozicí vnějšímu prostředí a poškození genů v DNA.

V další studii, provedené opět v Polsku, bylo množství aduktů v DNA měřeno v lymfocytech a granulocytech zdravých mužů, kteří byli vystaveni zvýšené koncentraci PAH v okolním vzduchu, konkrétně v silně industrializovaném regionu Slezska.¹⁵ Vzorky krve byly odebrány v březnu a listopadu stejného roku a to proto, aby bylo možné odhadnout sezónní změny v množství aduktů v DNA jako odpověď na sezónní změny v koncentraci benzo(a)pyrenu v okolním vzduchu. Předpokládané změny byly nalezeny jen u lymfocytů, což naznačuje, že v lymfocytech probíhají efektivní opravy DNA poškozené vlivem PAH. Výsledky studie tedy ukazují, že právě množství aduktů v DNA v lymfocytech je vhodným „biomarkerem“ monitorování při chronické expozici PAH.

Tvorba aduktů v DNA v lidském organismu je velice komplexní problém. Setkáváme se s širokou interindividuální variabilitou (Tab.1). Lidé jsou chronicky vystaveni malým dávkám složité směsi sloučenin obsahující známé a potenciální kancerogeny (kouření, exhalační splodiny, potrava...). Problémem je také nedostupnost vhodných tkání pro analýzu aduktů. V mnoha studiích se využívají bílé krvinky, periferní krevní lymfocyty. Někteří analyzovali také tkáň z autopsií, placentální tkáň nebo také omezené množství tkání z biopsií.^{16,17}

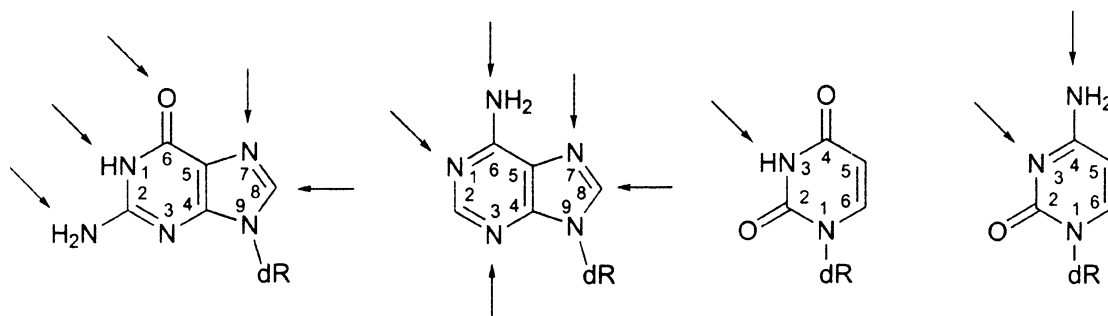
Tab. 1: Známé nebo potenciální biologické faktory susceptibility k vzniku rakovinného onemocnění (převzato z [3])

vysvětlení zkratk: RB, BRCA (geny regulující buněčný cyklus), FAP (familiární adenomatózní polypóza), HNPCC (nepolypózní nádor tlustého střeva) , XP (xeroderma pigmentosum), AT (ataxia telangiectasia), CYP (cytochrom P450), NAT (N-acetyltransferasa), GST (glutathion S-transferasa) VTR (variable tandem repeat)

Typ	faktor	Typ rakoviny	Předpokládaný mechanismus
Genetické faktory-zřídka se vyskytující syndromy	Li-Fraumeni	Prsu i jiné	Ztráta nebo inaktivace antionkogenů
	RB	Retinaoblastom	Ztráta nebo inaktivace antionkogenů
	Wilmsův tumor	Moč. měchýře	Ztráta nebo inaktivace antionkogenů
	BRCA1	Prsu	Ztráta nebo inaktivace antionkogenů
	FAP	Tlust. střeva	Ztráta nebo inaktivace antionkogenů
	HNPCC	Tlust. střeva	Defektní oprava DNA
	XP	Kůže	Defektní oprava DNA
Genetické faktory-běžně se vyskytující genetické variace	AT	Prsu i jiné	Defektní oprava DNA
	CYP1A1	Plic i jiné	Pozměněný metabolismus (PAH
	CYP2D6	Plic	Pozměněný metabolismus
	GST	Plic, moč. měchýře	Snížená detoxikace(substrát PAH)
	NAT2	Moč.měchýře, prsu	Snížená detoxikace
	O ⁶ -alkyldeoxyguanosin	Plic i jiné	Nedostatečná oprava DNA
Etnicita	h-ras-1 VTR	Plic, prs i jiné	Neznámý
	genetické faktory a vliv vnějšího prostředí	Různé	Rozdílná převaha genotypů a reakce na vlivy expozice
Věk	fyziologické	Prsu, plic i jiné	Snížená detoxikace, oprava DNA a imunitní funkce v raném a pozdním věku
Pohlaví	hormonální	Prsu i jiné	Poškození regulace a růstu vázáním na receptory
Předcházející poškození	metabolické, imunologické, chronické, nutriční	Plíce i jiné Játra, plíce, prs i jiné	Změna v metabolismu a detoxikaci Snížená funkce imunit. systému, poškozený metabolismus, detoxikace, snížena oprava, regulace růstu, diferenciac

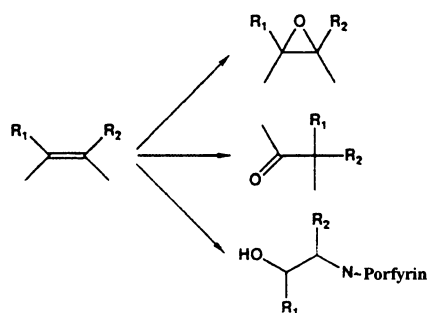
3 Vznik DNA aduktů

Kovalentní poškození DNA způsobují elektrofilní činidla, vázající se na nukleofilní části především DNA na purinové a pyrimidinové báze (Obr. 3). Nejčastěji modifikovaným místem je N7 pozice na guaninu, často modifikovaná methyloací či ethylací, zatímco aromatické aminy a PAH upřednostňují C8 či exocyklický N². Jiné části molekuly guaninu, ale také ostatních bází, jsou výrazně pozměňovány navázáním kancerogenů a mutagenů (Obr. 3).



Obr. 3 Nejčastěji modifikované pozice na jednotlivých bázích nukleových kyselin (převzato z [18])

Uvedená selektivita záleží na reakčním mechanismu, kterým se reaktivní intermediát váže na své cílové místo a tvoří adukt v DNA. Asi v 90-ti procentech. Případů dochází k vytvoření kovalentní vazby.¹⁸ Změní se specifické elektronové a stereochemické faktory, zvláště při navázání velkých aromatických molekul.



Obr. 4: Reakce přeměny dvojně vazby v uhlovodíkovém řetězci katalyzované cytochromy P450. Epoxidace je majoritní reakcí. (převzato z [21])

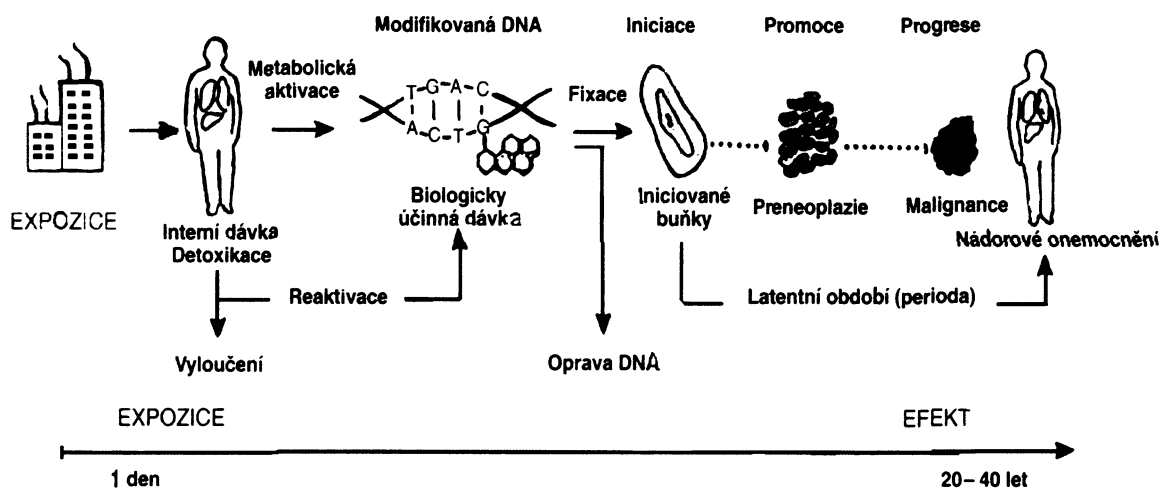
Elektrofilní činidla reagující s DNA jsou jak exogenního, tak endogenního původu (např. estrogény¹⁹). Často se setkáváme s aktivací exogenních sloučenin v organismu při procesech, jako je peroxidace lipidů a oxidační stres.²⁰

Mnohé z kancerogenních sloučenin nejsou primárně elektrofilními činidly, tedy přímo nereagují s DNA, ale stávají se jimi až metabolickou aktivací. Příkladem metabolické

aktivační reakce je přeměna alkenů na elektrofilní epoxidy katalyzovaná cytochromy P450 (Obr.4).

U lidí bylo identifikováno množství různých forem cytochromu P450 s interindividualními rozdíly v množství, substrátové specifitě a tkáňové distribuci.²² Zdá se, že dispozice k rakovině koreluje s genetickým polymorfismem těchto enzymů stejně tak jako ostatních enzymů účastnících se biotransformace (N-acetyltransferasy, sulfotransferasy).²³ Nicméně interindividualní variace byly jen částečně vysvětleny genetickým polymorfismem a vyžadují další výzkum.²⁴

Většina aduktů v DNA je odstraněna opravnými enzymy, ale část z nich zůstává neopravena a tvoří perzistentní poškození DNA, prekancerogenní léze, a může vést v kombinaci s jinými buněčnými událostmi k rakovině (Obr. 5).²⁵



Obr. 5: Schéma víceetapového procesu kancerogeneze

(převzato z [29])

Zdá se, že rozsah poškození DNA na specifických místech je vzhledem ke kancerogenitě důležitější. Bylo zjištěno, že některé adukty jsou vysoce mutagenní a spojené s kancerogenezí a jiné nikoliv¹⁸ (např. N7-methylguanin je více mutagenní než O⁶-methylguanin^{26, 27}). Adukty v DNA tvořené objemnými kancerogeny, jako jsou PAH a aromatické aminy, se objevují méně často než jiné typy poškození, ale jsou opravovány mnohem pomaleji.

Přítomnost DNA aduktů v genomu může způsobit chybu během replikace DNA. Mnohé DNA adukty jsou opraveny již při replikaci tak, aby byla obnovena původní sekvence DNA.

Právě tyto opravné enzymy představují genetickou dispozici pro vznik rakoviny. Snížené množství DNA opravných enzymů bylo sledováno u pacientů trpících chorobou *Xeroderma pigmentosum* (choroba zvyšující pravděpodobnost vzniku rakoviny kůže indukované ultrafialovým zářením).^{23,24} Aktivita enzymu O⁶-alkyl-DNA alkyltransferasy, který opravuje alkylovaný O⁶-deoxyguanosin, také klesá ve fibroblastech u pacientů s rakovinou plic.^{23,24}

Mutace v DNA se objevují poměrně často, ale naštěstí se většina z nich nevyskytuje v kritických částech genomu, mezi něž patří protoonkogeny a antionkogeny (tumor supresorové geny).²⁸ Protoonkogeny kódují protoonkoproteiny podporující buněčné dělení (růstové faktory, receptory, proteinkinasy, transkripční faktory). Vedle protoonkogenů se na regulaci buněčného cyklu podílejí zmíněné antionkogeny, které kódují proteiny, jež potlačují množení normálních somatických buněk a udržují je v klidovém stadiu klidu buněčného cyklu (G₀ fáze). Při poškození těchto genů může vznikat defektní protein, který již není schopen zabezpečit kontrolu dělení buňky. Číselně vyjádřeno: mezi "kritické části genomu", kterým jsou přisuzovány onkogenní vlastnosti, patří asi 100 genů z celkového počtu 60.000 potenciálních genů kódujících proteiny u člověka.²

Modifikace DNA vnějšími faktory, tedy i kancerogeny, v místech, která jsou určující pro regulaci a diferenciaci buněk, jsou považovány za první a nejdůležitější krok vícefázového procesu kancerogeneze (Obr. 5).²⁹

4 Metody detekce DNA aduktů

Rozvíjení metod pro detekci a kvantifikaci DNA aduktů jako „biomarkerů“ je určováno mnoha omezeními vyplývajícími z aplikace na člověka. Metoda by měla splňovat následující předpoklady:¹⁸

1. Dostatečná citlivost k určení velmi nízkého počtu aduktů (nejméně 1 adukt na 10^8 nemodifikovaných bází)
2. Musí být vhodná pouze pro mikrogramová množství tkáně či krve. Například 1 g tkáně obsahuje cca 1 mg DNA, 1 ml krve cca 40 μ g DNA. Za předpokladu 1 modifikace v 10^6 bázích izolujeme při výtěžku 10% z 1 mg DNA 75 pg aduktů v DNA.³⁰
3. Výsledky musí kvantitativně odpovídat rozsahu expozice.
4. Aplikovatelnost na neznámé adukty, které mohou tvořit směs sloučenin.
5. Schopnost rozlišit množství aduktu a co nejlépe jej identifikovat
6. Přijatelná cena celého stanovení
7. Rychlost provedení metody
8. Možnost analyzovat velké soubory vzorků DNA
9. Nízká míra nebezpečnosti pro osobu provádějící stanovení

Do roku 1980 vyžadovala detekce aduktů s DNA použití radioaktivně značených (^3H nebo ^{13}C) kancerogenů připravených synteticky. Proto byly studie pro lidský organismus nemožné. V následujících 20 letech došlo k pokroku ve znalosti interakcí DNA a kancerogenů, což vedlo k vývoji senzitivních a specifických metod pro stanovení DNA aduktů.³¹⁻³⁴ Nejčastěji používanými metodami se staly imunostanovení,³⁵⁻³⁷ imunohistochemie,^{35,38,39} užívající specifické protilátky proti aduktům, fluorescenční a fosforescenční stanovení,^{40,41} „ ^{32}P -postlabeling“,^{33,42,43} elektrochemická detekce^{44,45} a hmotnostní spektrometrie.⁴⁶⁻⁵¹ Jako velice slibné se ukázaly také další metody stanovení aduktů v DNA: kapilární elektroforeza, či laserem indukované fluorescence. Nedávný výzkum kapilární elektroforézy v kombinaci s imunochemickou nebo hmotnostně spektrometrickou detekční technikou může rovněž nabídnout slibný pokrok v selektivitě.⁵² Dále také „comet assay“ („single cell gel electrophoresis assay“) je vhodnou metodou pro detekci aduktů v DNA, ačkoliv byla původně vyvinuta ke stanovení jedno- a dvouřetězových zlomů v DNA. Tato metoda je především používána k detekci určitých typů DNA aduktů,

jako jsou např. DNA cross-linking, které nejsou jednoduše zjistitelné jinými metodami, včetně „³²P-postlabelingu“ (viz. kapitola 4.4: „³²P-postlabeling“).⁵³⁻⁵⁸ Každá metoda má své specifické výhody a nevýhody. Většina z nich již byla aplikována na experimentálních modelech, kde byla použita jedna kancerogenní sloučenina, ale ne komplexní směs. Nicméně, jak již bylo uvedeno, lidský organismus je vystaven působení různorodých sloučenin zároveň. Je velmi obtížné získat jak přesná množství jednotlivých aduktů, tak chemickou charakteristiku specifického aduktu. Proto se velmi často kombinují různé separační techniky a metody detekcí.

K identifikaci struktury aduktů se používá kombinace několika chemicko-fyzikálních metod jako jsou HPLC-ESI-MS/MS („high performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry“), FAB-MS („fast atom bombardement mass spectrometry“), UV-vis spektroskopie, nukleární magnetická rezonance. Limitujícím faktorem je separace a izolace dostatečného množství individuálního aduktu. Pro určení struktury aduktů je často užíváno srovnání různých chemicko-fyzikálních vlastností (např. spektrální a chromatografické vlastnosti) synteticky připravených standardních aduktů s těmi, které byly detekovány v lidských vzorcích některou z výše uvedených metod.^{31,40,59-69} Přehled nejužívanějších detekčních metod pro „biomonitoring“ aduktů v DNA shrnuje *tabulka. 2*.

Tab 2: Detekční metody pro "biomonitoring" aduktů v DNA (převzato z [18])

Metoda	Kvantifikace: počet		Kvantifikace pmol/g DNA	Minimální množství DNA nutné pro stanovení μg	Rychlost	Výhody	nevýhody
	aduktů na počet nemodifikovaných bází	aduktů na počet nemodifikovaných bází					
HPLC s fluorescenční detekcí	1/10 ⁷	300	300	100	Rychlost	Jen pro fluorescenční adukty, množství DNA	
Fluorescenční značení, dělení kapilár. elektrofor.	1/10 ⁷	300	300	10	Rychlost	Jen pro některé typy aduktů	
Imunostanovení (RIA, ELISA)	1/10 ⁷	300	300	100	Citlivost	Příprava protilátek, množství DNA	
Fluorescenční spektroskopie	1/10 ⁸	30	30	100	Vysoká specifita, citlivost	chemická Jen pro fluorescenční adukty, množství DNA	
HPLC-MS, GC/MS s ESI nebo MALDI „ ³² P-poslabeling“	1/10 ⁹	3	3	100	Množství DNA	Derivatizace před analýzou, drahé přístroje, množství DNA	
- standardní postup	1/10 ⁷	300	300	1	Množství DNA, citlivost	Ohrožení osoby provádějící stanovení, časově náročné	
- intensifikační postup	1/10 ⁸⁻⁹	3-30	3-30	1	Množství DNA, vysoká citlivost	Ohrožení osoby provádějící stanovení, časově náročné	
- postup s nukleasou P1	1/10 ¹⁰	0,3	0,3	5-10	Množství DNA, vysoká citlivost	Ohrožení osoby provádějící stanovení, nevhodné pro některé adukty časově náročné	
- postup s 1-butanolem „ ³² P-poslabeling“ / PAGE analýza	1/10 ¹⁰	0,3	0,3	5-10	Množství DNA, vysoká citlivost,	Ohrožení osoby provádějící stanovení, jen pro hydrofobní adukty, časově náročné	
	1/10 ⁸⁻⁹	3-30	3-30	5	Množství DNA, vysoká citlivost, rychlá separace	Ohrožení osoby provádějící stanovení	

4.1 Imunodetekce

Poměrně velkou nevýhodou imunostanovení je požadavek na velké množství DNA nutného ke stanovení ($\approx 100 \mu\text{g}$).³² Tento nedostatek lze překonat imunohistochemickou lokalizací aduktu. V současné době se vyvíjí polyklonální a monoklonální protilátky využívající jako antigen buď karcinogenem modifikovanou DNA nebo monoadukt navázaný na přenašeč protein ("carrier protein").⁷⁰ Takovéto protilátky lze používat např. při imunostanovení ELISA ke kvantifikování DNA aduktů izolovaných ze vzorků tkání či krve. Nicméně některé protilátky omezuje "cross-reaktivita" se strukturálně podobnými adukty, což neumožňuje zjistit přesné množství aduktů. Ve studii, která se zabývala imunodetekcí aduktů, byly připraveny protilátky proti DNA modifikované benzo(a)pyrenem-diol-epoxidem (Obr. 2).⁷¹ Vzhledem k tomu, že protilátka reagovala i s diol-epoxidovými adukty některých jiných polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH), nebylo možné zjistit absolutní množství aduktu. Další protilátky proti DNA, modifikované 4-aminobifenylem nebo aflatoxinem B₁, ukazují větší specifitu a menší "cross-reaktivitu". ELISA, využívající fluorescenční nebo chemiluminiscenční detekci, je schopna zjistit 1 adukt na 10^8 nukleotidů a vyžaduje pouze 10 až 50 μg DNA.⁷¹

Radioimunostanovení kombinované s HPLC bylo úspěšně použito k detekci O⁶-n-butyl-dG, O²-n-butyl-deoxythymidinu, O⁴-n-butyl-dT a O⁶-methyl-dG.^{72,73} Lee a kol.⁷³ nedávno také vyvinuli velice citlivé stanovení aduktů v DNA tím, že spojili imunochemickou detekci s CE-LIF („capillary electrophoresis-laser induced fluorescence detection“). Tato metoda vyžaduje jen nanogramová množství DNA a detekční limit je 1 adukt na 10^9 bazí.

4.2 Fluorescenční stanovení

Detekce aduktů DNA fluorescenčními metodami se používá pro sloučeniny, které tvoří buď silně fluorescenční adukty nebo adukty, na které může být následně navázána fluorescenční značka. Tento postup je vhodný pro adukty PAH a aflatoxinu B₁, ale jinak je jeho použití omezené.⁴⁰ Často ve fluorescenčním spektru vznikají široké píky, které neumožňují přesnou kvantifikaci, což lze částečně řešit chlazením vzorku modifikované DNA na 4,2K.⁷⁵ Citlivost metody je přibližně 1 adukt na 10^8 nepozměněných nukleotidů.

4.3 Hmotnostní spektrometrie (MS)

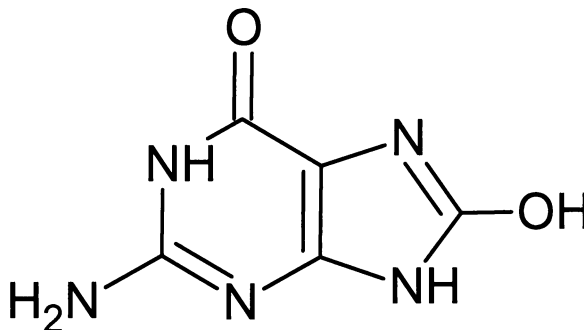
Hmotnostní spektrometrie je vysoce specifická metoda, která podává informace o struktuře aduktu v DNA a jasně jeho množství kvantifikuje. Citlivost hmotnostní spektrometrie je nižší než u metody „³²P-postlabeling“, ale stále jsou vyvíjeny nové přístroje s větší citlivostí a rovněž metody přípravy vzorků. Je pravděpodobné, že se v budoucnosti stane nejkompaktnější metodou pro analýzu DNA. Každé přístrojové zdokonalení může snížit detekční limit pro biomonitorování, ale nevýhodou je, že pokrok kráčí směrem k stále dražším zařízením a pro analýzu je potřeba poměrně velkého množství DNA.

4.3.1 Příprava vzorku k analýze aduktů v DNA pomocí MS

Příprava vzorku DNA k analýze je mnohými vědci považována za nejdůležitější krok při analýze.⁵⁰ Vzorek je nutné zbavit všech nečistot (proteinů, RNA, solí...) a je zapotřebí maximálně zvýšit množství aduktu ve vzorku DNA, který je analyzován. Například anorganické soli a jiné vysoce polární sloučeniny mohou i v malé koncentraci ovlivnit citlivost ESI („electrospray ionization“) tím, že potlačují ionizační proces. Jiné nečistoty mohou jednoduše zvýšit úroveň šumu a vedou ke ztrátě vysoké citlivosti. Je tedy nutné velmi pečlivě zvážit všechny postupy izolace aduktu. Celá izolace musí být navržena tak, aby nedocházelo ke změně a vytváření nových modifikací nukleotidů.

Nukleosidy a nukleotidy se získají enzymovou hydrolýzou. Hydrolyzát obsahuje jak modifikované nukleotidy/nukleosidy, tak nemodifikované. Pro lepší výsledek lze použít slabě kyselou hydrolýzu, vzhledem k tomu, že jsou štěpeny pouze purinové báze a pyrimidinové zůstávají v řetězci DNA intaktní. Po hydrolýze je možno oddělit purinové a pyrimidinové báze filtrací, či precipitací. Dále existuje celá řada metod, které pomáhají získat jen požadované části DNA či přímo žádané adukty: N7 a N3 purinové adukty mohou být například odděleny neutrální termální hydrolýzou od ostatních nemodifikovaných bazí a bazí modifikovaných v jiných pozicích. Existují také informace o užití opravných enzymů k selektivnímu odstranění modifikovaných bazí. Např. Dizdaroglu a kol.⁷⁶ odštěpili selektivně 8-hydroxyguanin pomocí speciálního proteinu z *E. coli*.

Je nutno volit vhodné metody preparace vzhledem k možnosti ztráty vzorku či vzniku arteficiálních výsledků. Některé adukty se za určitých podmínek, užívaných při preparaci a manipulaci se vzorkem, mohou tvořit relativně snadno. Jedním z příkladů je vznik 8-hydroxyguaninu (Obr. 6), dobře prostudovaného „biomarkeru“ oxidativního poškození DNA. Někteří autoři⁷⁷ dokonce předpokládají, že k formování tohoto aduktu dochází téměř ve všech krocích analýzy. Hydroxyradikály, vznikající Fentonovou reakcí, jsou zodpovědné za arteficiální vznik 8-hydroxyguaninu z nemodifikovaného guaninu přítomného ve vzorku. Přidáním „lapačů“ radikálů („scavengerů“) jako je 2,4-Di-tert-butyl-4-methylfenol (BHT) a 2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy (TEMPO) se tvorba 8-hydroxyguaninu minimalizuje.



Obr. 6: 8-hydroxyguanin

K separaci modifikovaných nukleosidů se používají různé druhy chromatografických postupů. Kapalinová chromatografie nabízí jednodušší interpretaci, ale nedosahuje tak dobrého oddělení jednotlivých složek v případě přítomnosti velkého množství sloučenin ve směsi. Běžně se používají chromatografie na iontoměničích, chromatografie s reversní fází, afinitní chromatografie a také jejich kombinace.

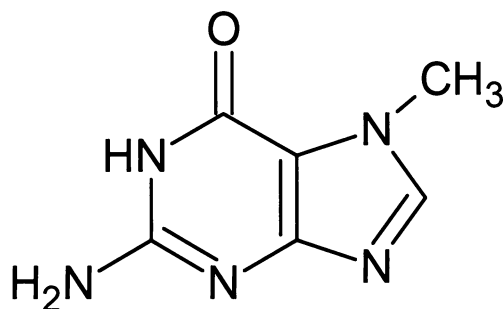
4.3.2 Použití MS pro identifikaci DNA aduktů

Pokud je struktura DNA aduktů neznámá nebo nemáme k dispozici jejich standardy, je hmotnostní spektrometrie velmi vhodný prostředek pro jejich identifikaci. MS a MS-MS analýza modifikovaných oligonukleotidů může dokonce rozlišit pozici modifikace bez dané sekvence DNA.³⁰

Při analýze je však často potřebná přípravná derivatizace sloučeniny před vlastním měřením.^{47,78} Pokud derivatizujeme požadovanou sloučeninu, zjednoduší se ionizace, ale případné derivatizace mění hmotnost sloučeniny a tím i hmotnostní spektra.

Lijinsky a kol.⁷⁸ použil EI-MS („electron ionization-mass spektrometry“) s izotopovým značením k odhalení reakčního mechanismu nitrosodimethylaminu, zodpovědným za vznik 7-methylguaninu (Obr. 7). Indukovaný 7-methylguanin byl izolován z hydrolyzátu DNA jater krys premedikovaných nitrosodimethylaminem a identifikován pomocí EI-MS. Adukty v DNA byly detekovány také v moči, protože opravné systémy DNA některé báze z DNA „vystřihly“, a ty byly vyloučeny právě močí, z níž byly následně extrahovány a

charakterizovány adukty
 7-methylguanin, N²-methylguanin, N²,N²-
 dimethylguanin, 7-(2-hydroxyethyl)-guanin a N²-
 ethylguanin. Aduky byly určeny pomocí CC-EI-
 MS nebo GC-EI-MS/MS po chemické
 derivatizaci anhydridem kyseliny
 heptafluorobutylové.⁸⁰ Efektivnost extraktu byla
 zvýšena použitím imunoafinitní kolony k
 purifikování alkylových aduktů.^{81,82}



Obr. 7: 7-methylguanin

K detekci některých DNA aduktů byla také použita FAB-MS („Fast atom bombardement-mass spectrometry“) a FAB-MS/MS. Jednalo se o adukty odvozené reakcí nukleotidů a nukleosidů s kyanoethylenoxidem („cyanoethylen oxide“)^{83,84} a s některými aminopolyaromatickými uhlovodíky.⁸⁵

Pro identifikaci aduktů vzniklých reakcí nukleotidů s 2-bromoakroleinem („2-bromoacrolein“)⁸⁶ a fenyl glycidyl etherem („phenyl glycidyl ether“, PGE)⁸⁷ byla použita HPLC-TSI-MS (HPLC-thermospray ionization-mass spectrometry). TSI-MS/MS se také používá k potvrzení struktury aduktů.

Jemné techniky ionizace jako je „matrix-assisted laser desorption ionization“ (MALDI)⁸⁸⁻⁹⁰ a „electrospray ionization“ (ESI)^{91,92} umožnily rutinní analýzu netěkavých a málo stabilních molekul pomocí MS. Navíc, spojením separačních technik jako HPLC a kapilární elektroforesy („capillary electrophoresis“, CE) lze dále zvýšit detekční schopnosti MS. Právě užití MALDI-MS bylo sice testováno⁹³, ale v současné době je nejužívanější ESI-MS v kombinaci s kapalinovou chromatografií na reversní fázi, plynovou chromatografií nebo kapilární elektroforesou (Tab. 3).

ESI-MS analýza často užívá tzv. „mód“ pozitivně nabitého „spreje“, který je zvláště vhodný pro aplikace požadující maximální senzitivitu. Naopak přítomnost nabitých fosfátových skupin v modifikovaných nukleotidech a oligonukleotidech určuje tyto sloučeniny k detekci v „módu“ negativního „spreje“.³⁰

První příklad použití LC-ESI-MS analýzy nukleosidového aduktu byl publikován v roce 1995 Chaudharym a kol.⁹⁴ Přehled použití MS pro určení množství DNA aduktů pomocí HPLC-ESI-MS shrnuje *taulka 3*.

Tab. 3: Přehled užití MS ke kvantifikaci DNA aduktů

(užité zkratky: gas chromatografie (GC), high performance liquid chromatography (LC), electrospray ionization (ESI), capillary zone electrophoresis (CE), electron capture (EC), Mass spectrometry (MS), tandem mass spectrometry (MS-MS) Isotope dilution mass spectrometry (IDMS), isotope dilution high resolution mass spectrometry (IDHRMS), guanin (Gua), guanosin (Guo), adenin (Ade), adenosin (Ado), cytosin (Cyt, uridin (Urd)) (převzato z [50])

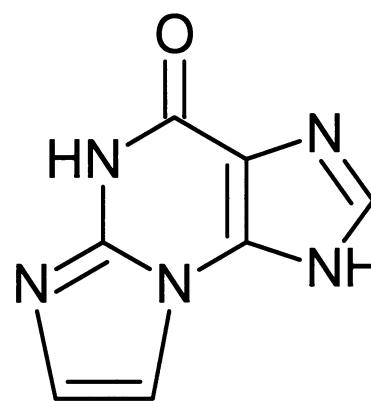
složenina	adukt	metoda
Reaktivní formy kyslíku	8-OH-Gua, 8-OH-Ade, 5-OH-Ura, 5-OH-hydantoin, 2,6diamino-4-OH-5-formamidopyrimidinGua, 2,6diamino-4-OH-5-formamidopyrimidinAde, 5,6-diOH-Ura, 5-OH-5-Methylhydantoin, 5-hydroxymethylUra, 5-OH-Cyt	GC-IDMS
	8-OH-Gua	LC-ESI-IDMS
	8-OH-dGuo	LC-ESI-IDMS-MS
	8-OH-DGuo, 8-OH-dAdo	LC-ESI-MS-MS LC-ESI-IDMS-MS
Produkty lipidové peroxidace	N ² ,3-ethylGua	GC-EC-IDMS
	N ² ,3-ethylGua, 1,N ² -ethylGua	GC-EC-IDHRMS
	1,N ² -ethylGua, hydroxyethylGua, 1,N ⁶ -ethylAdo, 3,N ⁴ -ethylCyt,	LC-ESI-IDMS-MS
	1,N ⁶ -ethylAde, N ² ,3-ethylGua, 1,N ⁶ -ethylAdo, 3,N ⁴ -ethylCyt,	LC-ESI-IDMS
	krotonaldehydem modifikovaný Guo, 2-hexenalem modifikovaný dGuo,	LC-ESI-MS-MS
PAH	7(benzo(a)pyren-6-yl)-N ⁷ -Gua, 7(benzo(a)pyren-6-yl)-N ⁷ -Ade	LC-ESI-MS
	adukt dGMP s Anti-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pyren-7,8diol-9,10-epoxidem	LC-ESI-MS-MS

Pokračování Tab. 3 na další straně

Tab. 3 - pokračování

složenina	adukt	metoda
Olefiny	N ⁷ -Gua adukty butadienu	LC-ESI-IDMS-MS
	N ⁷ -Gua adukty ethylenu, N ⁷ -Gua adukty propylenu	GC-EC-IDMS-MS
	N ⁷ -Gua adukty styrenu	LC-ESI-MS
Alkylační činidla	N ³ -alkyladeniny	GC-IDMS
Vliv záření	5,6-dihydroxy-5,6dihydrothymidin, 5-OH-dUrd, 5-(hydroxymethyl)-2-dUrd, 5-formyl-dUrd, 8-OH-dGuo, 8-OH-dAdo	LC-ESI-IDMS-MS
Heterocyklické aromatické aminy	C ⁸ dGuo s 2-amino-1-methyl-6-fenylimidazo(4,5)pyridinem, N-(dGuo-8-yl)-2-amino-3-methylimidazo(4,5)chinolin, 5-(duo-N ² -yl)-2-amino-3-methylimidazo(4,5)chinolin	LC-ESI-MS-MS
4-aminobifenyl	adukty C8dGua a 4-aminobifenylu	GC-EC-IDMS
	adukty C8dGuo a 4-aminobifenylu	LC-ESI-IDMS
mefalan	adukty dAMP a mefalanu	LC-ESI-MS-MS

Celkově je hmotnostní analýza velmi citlivou metodou pro určení hmotnosti sloučenin, tedy i aduktů v DNA. Ve studii Morinella a kol.⁹⁵ byli laboratorní potkani vystaveni inhalaci vinylchloridu značeného dvěma ¹³C [¹³C₂]. Byl zjišťován zdroj N²,3-ethylguaninu (Obr. 8) v DNA v mozku a hepatocytech. Užitím vysoce specifické a senzitivní imunoafinitní plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením byly analyzovány vzorky DNA z hepatocytů a mozku na oba adukty N²,3-ethylguanin a [¹³C₂]N²,3-ethylguanin. Podáním [¹³C₂]vinylchloridu bylo možné rozlišit endogenně vytvořený N²,3-ethylguanin od [¹³C₂]N²,3-ethylguaninu, protože mají rozdílnou hmotnost. V rámci studie bylo dokázáno, že se množství aduktu [¹³C₂]N²,3-ethylguaninu v hepatocytech zvýšilo oproti kontrolním jedincům až o 60+/-10 aduktů na 10⁸ nemodifikovaných guaninových bazí, zatímco hodnoty endogenně tvořeného aduktu v hepatocytech a mozku se nezměnily. Naopak podání [¹³C₂]vinyl chloridu



Obr. 8: N², 3-ethylguanin

nezpůsobilo zvýšení koncentrace aduktu v mozku, dokonce značený adukt nebyl v mozku vytvářen. Takovéto studie by nebylo možné realizovat, kdyby MS neměla jedinečnou schopnost rozlišovat chemicky stejné sloučeniny, které se jen velmi málo liší hmotností.⁵⁰

4.3.3 Předpokládané použití MS v identifikaci aduktů

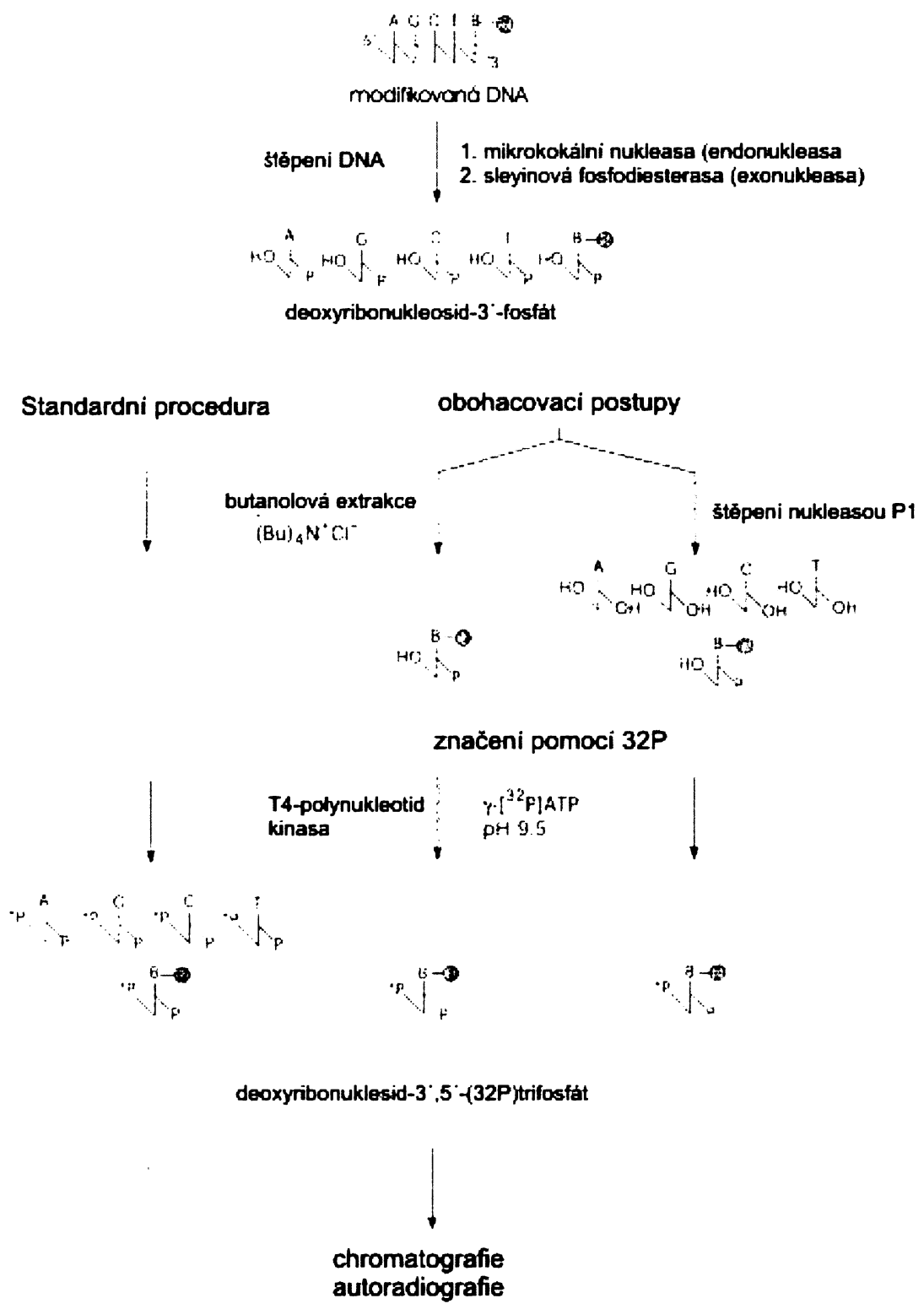
Do budoucna bude snahou přiblížit citlivost MS k metodě „³²P-postlabelingu“. Velmi zajímavé by bylo nalezení preparace a separace založené na čipu, který může vnést revoluci do analýzy DNA aduktů.³⁰ Pokrok na tomto poli by umožnil automatickou analýzu komplexních reakčních směsí a minimalizovalo ztrátu vzorku. Paralelní zlepšení v „nanosprejové ionizaci“ povede k ještě lepším výsledkům při MS a ke zminiaturizování separačního systému, jako je "nanoflow LC" nebo na čípech založené technologie.

MS s iontovou pastí jsou využívány k objasnění struktury aduktů v DNA díky svým výtečným schopnostem při uspořádání MSⁿ. Zavedením hybridních přístrojů jako jsou „quadropole-time-of-flight-mass spectrometry“ (Q-TOF-MS) nabízí vysoké rozlišení hmotnosti a zvýšení citlivosti. Tato technologie také umožňuje velmi rychlý sběr dat. Q-TOF byla použita v kombinaci s HPLC pro analýzu některých aduktů.⁹⁶

Důležité je také zmínit, že „accelerator mass spectrometry“ (AMS) aktuálně dosahuje stejných detekčních limitů jaké jsou dosaženy při stanovení metodou „³²P-postlabeling“, ale stejně jako „³²P-postlabeling“ má vysokou citlivost, ale nízkou specifitu.⁵⁰

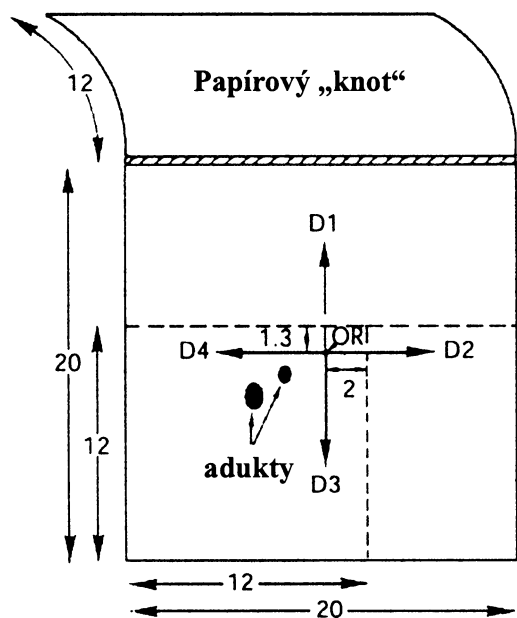
4.4 „³²P-postlabeling“

Tato metoda je založena na enzymové hydrolyze neradioaktivní kancerogenem modifikované DNA na 3'-fosfonuklesidy, následné [³²P]-fosforylaci na volném 5'OH konci a chromatografické separaci aduktů od nemodifikovaných nukleotidů (Obr. 9). Poprvé byla byla metoda „³²P-postlabelingu“ popsána již v 80. letech 20. století.^{43,97,98} V této technice je kancerogenem modifikovaná DNA enzymově štěpena na 3'-monofosfát nukleosidy pomocí endonukleasy (mikrokokální nukleasa) a exonukleasy (slezinová fosfodiesterasa). 3'-monofosfát nukleosidy jsou fosforylovány T4-polynukleotid kinasou (zdrojem fosfátové skupiny je γ [³²P]ATP). K minimalizování 3'-fosfatásové aktivity T4-polynukleotid kinasy se používá alkalické pH.



Obr. 9 Schéma ³²P-poslabelingu, bližší popis v textu (převzato z [18])

Značené adukty jsou separovány od značených nemodifikovaných nukleotidů dvojrozměrnou iontově výměnnou tenkovrstevnou chromatografií na PEI-celulose (polyethylenimin, PEI) (Obr.10).



Obr.10: Schéma separace nukleotidů při „³²P-postlabelingu“: TLC na PEI-celulose (převzato z [18])

Během prvních vyvíjení vodným elektrolytem (D1, D2 směr) se značené nemodifikované nukleotidy a [³²P]fosfát eluují do papírového „knotu“, zatímco aromatické hydrofobní adukty zůstávají na startu pro další rozlišení užívající rozdílné systémy rozpouštědel (D3, D4 směry vyvíjení) Lokalizace aduktů je zobrazována autoradiografií, kde jsou adukty viditelné jako skvrny na filmu citlivém na rentgenové záření. Adukty jsou kvantifikovány kapalinovou scintilací nebo čerenkovovým stanovením.¹⁸

V poslední době byla kvantifikace

aduktů efektivně upravena. Užívá se metoda "Phosphor imaging", vhodná pro rychlejší zjištění pozic i kvantifikace aduktů v DNA na chromatogramech z metody „³²P-postlabelingu“. ⁹⁹ Tato technika má více než 10krát větší senzitivitu v porovnání s autoradiografickou detekcí ³²P. ¹⁰⁰

Množství aduktu se vyjadřuje hodnotou RAL („relative adduct labelling“), tedy poměrem počtu aduktů v DNA k celkovému počtu nukleotidů.^{97,101} Nicméně tento výpočet vyžaduje shodnou efektivitu značení aduktů a normálních nukleotidů.^{66,102} Výše uvedený standardní postup „³²P-postlabelingu“ je vhodný pro většinu aduktů v DNA, ale jeho citlivost není dostatečná pro detekci aduktů přítomných v DNA v nižších koncentracích. (Může být stanoven maximálně 1 adukt v 10⁷ nukletidech.)

Pro zvýšení citlivosti tohoto stanovení bylo vyvinuto několik modifikací standardního stanovení (viz také Tab. 2):

(I) Značení aduktů pomocí [³²P] s limitovaným množstvím γ -[³²P]ATP zvyšuje citlivost metody 10 až 100krát (intensifikační postup).

(II) Obohacení užívající ke zvýšení koncentrace aduktu ve výsledném vzorku inkubaci hydrolýzátu DNA s nukleasou P1 (z *Penicillium citritum*¹⁰¹) (Obr. 9). Nukleasa P1 přednostně defosforyluje nemodifikované deoxyribonukleosid-3-monofosfáty na deoxyribonukleotidy a v mnoha případech nepozměňuje modifikované nukleotidy. Deoxyribonukleotidy nejsou vhodným substrátem pro T4-polynukleotid kinasu a nedochází tedy k jejich fosforylaci značeným [³²P] z γ [³²P]ATP. Některé modifikované nukleotidy jsou však defosforylovány nukleasou P1 podobně jako nemodifikované nukleotidy (např. arylaminové adukty substituované na C8 deoxyguanosinu), zatímco jiné defosforylovány nejsou (zvláště adukty substituované na pozici N² deoxyguanosinu). Tato úprava původní metody zvýší znatelně její citlivost (Tab. 2).

Další postup obohacení (III) zavedl i Gupta a kol.¹⁰³ Využívá vlastností hydrofobních DNA aduktů k extrakci do 1-butanolu za přítomnosti fázového přenašeče tetrabutylammonium chloridu (Obr. 9). Hydrofobní modifikované nukleotidy jsou přednostně extrahovány do organického rozpouštědla, zatímco normální nemodifikované nukleotidy se do organického rozpouštědla extrahují jen částečně. Teprve potom jsou adukty značeny pomocí γ [³²P]ATP. Polárnější adukty obsahující nearomatické velké zbytky nebo alkylové zbytky se však do 1-butanolu neextrahují a nemohou být analyzovány touto verzí „³²P-postlabelingu“.

Obohacením pomocí nukleasy P1 nebo extrakcí do 1-butanolu zvýšíme citlivost detekce až na jeden adukt na 10⁹-10¹¹ normálních nukleotidů (0,3-3 amol/ μ g DNA) v závislosti na struktuře aduktu, což umožňuje detekování 1-10 aduktů v celém genomu.

Dalšího zvýšení citlivosti lze dosáhnout (i) užitím nukleasy P1 a prostatické fosfatázy („prostatic phosphatase“) pro hydrolýzu DNA před značením pomocí γ [³²P]ATP následovaným štěpením fosfodiesterásou hadího jedu^{104,105} a (ii) také verzí obohacení nukleasou P1 následované štěpením fosfodiesterásou hadího jedu a druhým štěpením pomocí nukleasy P1.¹⁰⁵ Tyto verze postupu jsou vhodné hlavně pro detekci aduktů utvářených heterocyklickými aromatickými aminy, které způsobují komplexní modifikace DNA (nejen formování jednoduchých kovalentních aduktů).^{104,105} Posledně uvedené modifikace standardní metody jsou vhodné jen pro některé adukty a užívají se méně často. „³²P-postlabeling“ se stále častěji používá v kombinaci s různými dalšími metodami. Např. HPLC umožňuje rychlejší rozlišení a kvantifikaci aduktů než TLC, ale často má menší citlivost než běžně užívané TLC a autoradiografie.¹⁰⁶

4.4.1 Zhodnocení metody „³²P-postlabeling“

Výše uvedené metody obohacení a separací umožňují zvýšit relativní koncentraci aduktů v DNA a tím zvyšují i citlivost celého stanovení. Nicméně žádná ze zmíněných modifikací standardního postupu nemůže být použita pro všechny druhy aduktů. Polárnější adukty (např. alkylový zbytek, nearomatické objemné zbytky nebo zbytky s jedním aromatickým kruhem^{34,117,116}) mají chromatografické vlastnosti velmi podobné nemodifikovaným nukleotidům, proto je také velmi obtížné je oddělit. Dalším problémem je podhodnocení výsledků „³²P-postlabelingu“, které může nastat v následujících případech:

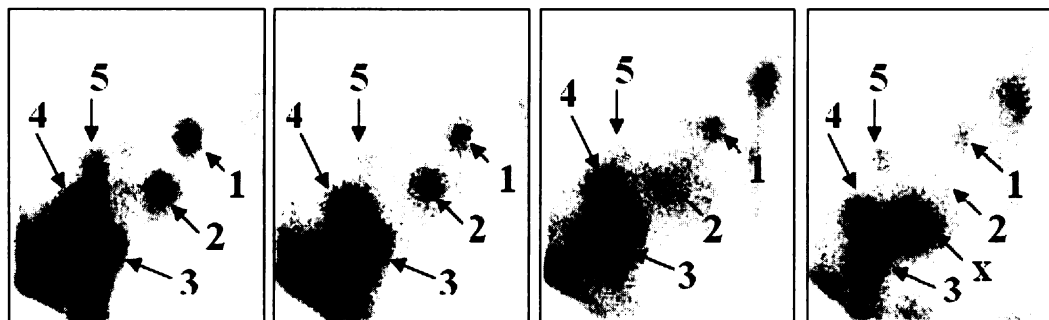
1. nekompletní rozštěpení DNA a oddělení modifikovaných aduktů,
2. možnost defosforylace modifikovaných nukleotidů nukleasou P1 (např. nízká odolnost arylaminových aduktů substituovaných na C8 deoxyguanosinu),
3. nekompletní extrakce do 1-butanolu (polárnější adukty nebo adukty obsahující ve své molekule jen jeden benzenový kruh se do 1-butanolu neextrahují),
4. označení méně než 100 % modifikovaných nukleotidů pomocí γ [³²P]ATP (např. N(deoxyguanosin-8yl)arylamin-3'-fosfátové adukty potřebují větší koncentraci γ [³²P]ATP než se běžně užívá pro „³²P-postlabeling“),
5. ztráta části vzorku během postupu,
6. ulpění některých aduktů v DNA na „startu“ při TLC na PEI-celulose.^{23,34,42,117-119}

Limitujícím faktorem pro použití „³²P-postlabelingu“ pro „biomonitoring“ lidské populace je zejména relativně nízká efektivita enzymového štěpení DNA s mnoha adukty a DNA modifikované „cross-linkem“ DNA-DNA nebo DNA-protein.^{34,59,60,105,118-121} Přítomnost velkého množství různých aduktů v DNA (např. v důsledku vystavení polutantům životního prostředí, kouření...) tedy velmi komplikuje zhodnocení výsledků.

Existuje také další nevýhoda této techniky pro „biomonitorování“. Pomocí metody „³²P-postlabeling“ zjišťujeme celkové množství aduktů v DNA, ale jen zřídka můžeme identifikovat jednotlivé adukty přesně. Nedostatek standardních aduktů umožňuje v mnoha případech pouze limitovanou interpretaci dat při demonstraci vyšší hladiny aduktů v srovnání expozici vystavené a nevystavené skupině.^{42,122} Výjimky však existují, například u specifických aduktů tvořených benzo(a)pyrenem,^{122,123} heterocyklickými aminy⁶⁹, protinádorovými léčivy^{67,68,125,126} nebo aristolochovými kyselinami¹²⁷⁻¹³⁰. Příprava dalších standardů DNA aduktů a vyhodnocení jejich struktury může tuto nevýhodu překonat.

Metodou „³²P-postlabeling“ lze prokázat totožnost aduktů vzniklých za různých podmínek (např. působení různých enzymů, viz Obr. 11).

Dalším problémem s rozšířením ^{32}P -postlabelingu pro biomonitorování je nedostatečná detekce velkého množství aduktů, které jsou z DNA uvolněny depurinací.¹⁸



Obr. 11 Ukázka autoradiografických snímků výsledků „ ^{32}P -postlabelingu“: Srovnání metabolické aktivace 3-nitrobenzanthronu peroxidasami. Na snímcích jsou patrné skvrny ve stejných pozicích (pro názornost označených stejným číslem), což dokazuje jejich totožnost. (Zleva dopra: křenová peroxidasa, hovězí laktoperoxidasa, lidská myeloperoxidasa, ovčí prostaglandin H synthasa PHS; nepublikované výsledky M.Stiborové a kol.)

4.4.2 Užití metody „ ^{32}P -postlabeling“

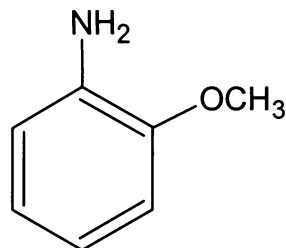
Přes různá omezení se „ ^{32}P -postlabeling“ stává velmi oblíbenou metodou. Umožňuje určení a charakterizování lézí v DNA jako jsou adukty v DNA utvářené objemnými molekulami i malými molekulami (DNA léze vzniklé z radikálových forem kyslíku či zářením indukované poškození). Nejčastěji je však užívána k detekci a charakterizaci kovalentních aduktů tvořených mutageny a kancerogeny. To je vhodné nejen pro „screening“ genotoxicity, ale také k potvrzení karcinogenních mechanismů. Z tohoto důvodu jsou analýzy prováděné „ ^{32}P -postlabelingem“ používané k posouzení nebezpečnosti některých sloučenin obsažených např. v tepelně upraveném mase, vařeném jídle (heterocyklické sloučeniny a aminy)^{49,105,131-134}, rostlinných produktů jako safrol nebo alkenylbenzenové deriváty^{104,135}, aristolochových kyselin^{64,97,128-130,136}, alkaloidů sanguinarinu a chelerytrinu¹³⁷, pyrrolizidinových alkaloidů¹³⁸ a sloučenin zodpovědných za tvorbu DNA aduktů z Coca-Coly,^{131,139} potravinářských aditiv a různých mykotoxinů v potravinách (aflatoxiny,¹³⁰ ochratoxin A^{130,136,140}).

Metoda „ ^{32}P -postlabeling“ byla také použita ke studiu vlivu některých protektivních látek schopných snížit tvorbu aduktů v DNA indukovaných kancerogeny. Touto cestou mohou být nalezeny látky vhodné k prevenci (flavonoidy vyskytující se např. v černém či zeleném

čaji^{117,141,142}) „³²P-postlabeling“ je také stále více používán k analýze aduktů v DNA utvářených z farmaceutických léčiv a různých sloučenin používaných k terapeutickým účelům v humánní medicíně (např. mytomycin, cis-platina, cyklofosfamid, cyproteronát („cyproterone acetate“), daunorubicin, tamoxifen, ellipticin^{23,63,67,68,117,141,143-146}). Studie *in vivo* umožňují ohodnotit míru nebezpečnosti určitých látek pro člověka a mohou přispět k identifikaci enzymových systémů zodpovědných za aktivaci těchto sloučenin.^{112,141,142,147,148}

5 *o*-ANISIDIN

o-Anisidin (1-amino-2-methoxybenzen, *o*-methoxyanilin, 2-methoxyanilin, *o*-methoxyfenylamin)¹⁴⁹ je kancerogen způsobující rakovinu u obou pohlaví potkanů (F344) a myši (B6C3F1).^{150,151} Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny („International Agency for Research on Cancer“, IARC) zařadila *o*-anisidin do skupiny kancerogenů 2B¹⁵¹, která zahrnuje možné kancerogeny pro člověka. Kromě kancerogenity má *o*-anisidin také toxické účinky (hematologické změny, anémie, nefrotoxicita)^{150,151}



Obr. 12: *o*-anisidin

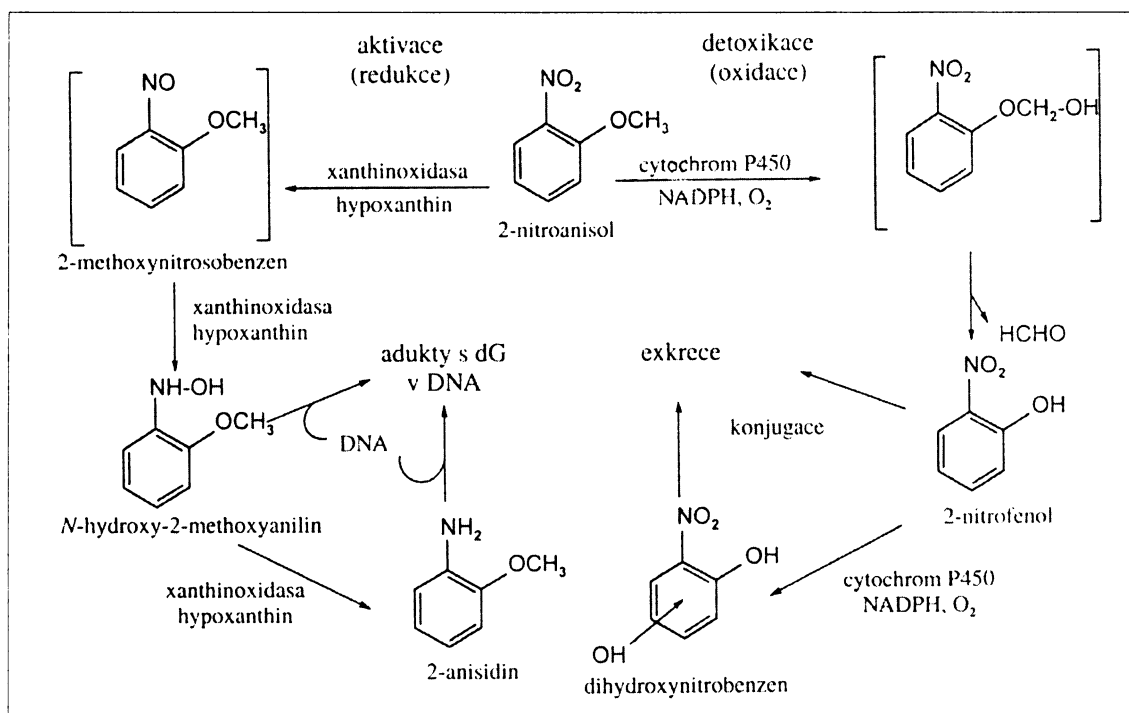
Z hlediska akutní toxicity je LD₅₀ (smrtná dávka pro polovinu zvířat v sledovaném souboru) pro potkana při podání *per os* 2000 mg/kg.¹⁵² Pro myš B6C3F1 je maximální tolerovaná dávka *o*-anisidinu při *p.o.* podání 750 mg/kg.¹⁵³

Studie chronické expozice dělníků, kteří byli po dobu 6 měsíců po 3,5 h denně vystaveni *o*-anisidinu v koncentraci 0,4 ppm, ukázaly, že u nich nedošlo k rozvoji anémie, ale trpěli methemoglobinémií a v jejich krvi byl zjištěn výskyt Heinzových tělísek¹⁵⁴ (viz poznámka pod čarou¹).

Sám *o*-anisidin je využíván jako intermediát při výrobě mnohých pigmentů a barviv, které při uvolnění z papíru či textilií mohou vést k expozici lidské populace. Dále se používá pro syntézu léčiva guajakolu (*o*-methoxyfenol), který působí jako expektorans (usnadňuje vykašlávání) a myorelaxans (uvolňuje křeče kosterních svalů).¹⁵⁶ *o*-Anisidin je dále složkou cigaretového kouře.^{151,157} V únoru roku 1993 došlo v továrně Griseim firmy Hoechst AG (Frankfurt, SRN) k lokálnímu úniku 11 tun chemické směsi obsahující značné množství *o*-nitroanisolu (výrobní prekurzor *o*-anisidinu) a dalších látek obsahujících dusík.^{159,162,165} *o*-Anisidin není tedy sloučeninou, u které hrozí jen lokální výskyt (expozice ve výrobních), ale patří také mezi látky znečišťující životní prostředí. Byl nalezen v moči lidské populace v koncentracích 0,22 µg/l (median).¹⁵⁸ Regionálně byly detekovány hemoglobinové adukty

¹ Heinzova tělíska (Schmauchova) nebo také erytrocytární refraktilní tělíska jsou precipitáty denaturovaného hemoglobinu jako výsledek oxidativního poškození erytrocytů. Vznik tělísek je dán nerovnováhou mezi oxidačním stresem a vnitřními erytrocytárními antioxidačními mechanismy.¹⁵⁵

o-ansidinu u obyvatel Německa žijících jak v průmyslových zónách, tak i na venkově.¹⁵⁹⁻¹⁶¹ Uvedené adukty stejně jako sám *o*-ansidin mohou pocházet jak již ze zmíněných zdrojů, tak také z možného metabolického i výrobního prekursoru *o*-ansidinu, *o*-nitroanisolu (2-methoxynitrobenzen). Jeho metabolická aktivace a detoxikace je znázorněna na obrázku 13.

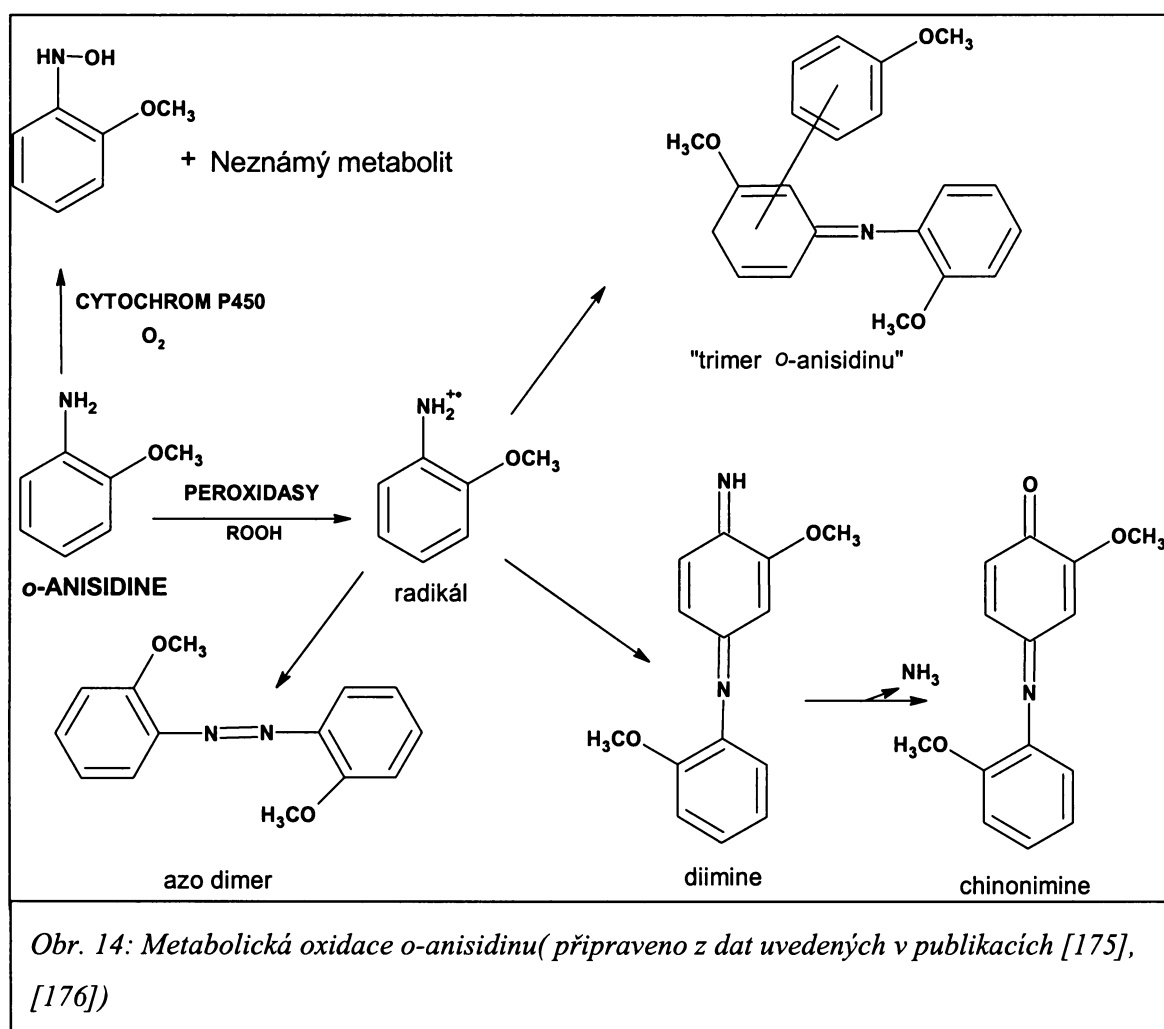


Obr. 13: Metabolická aktivace a detoxikace 2-nitroanisolu v organismu potkana (převzato z [179])

o-Anisidin je slabě mutagenní sloučeninou. Mutagenita byla prokázána na *Salmonella thyphimurium*¹⁶⁴ a je spojována jednak s aktivací *o*-ansidinu peroxidasami, jednak ji ovlivňují N-acetyltransferasy.^{153,165-167} Ve výsledcích některých testů *in vivo* (stanovení mikrojaderního zlomu DNA v potkaních játrech, slezině a močovém měchýři) je však *o*-ansidin negativní,^{165,168,169} v kulturách ovariálních buněk křečka však již indukuje chromozomální aberace¹⁷⁰ a způsobuje genové mutace v kulturách myších lymfatických buněk.¹⁷¹ Způsobuje také intrachromozomální rekombinace v *Saccharomyces cerevisiae*,¹⁷² statisticky významné poškození DNA bylo zjištěno v močovém měchýři CD-1 myši (pomocí „Comet assay“).¹⁷³ Tímto kancerogenem byl také indukován slabý ale významný nárůst frekvence mutací v močovém měchýři transgenních *lacI* (Big BlueTM) myši.¹⁵³ Rozdíl

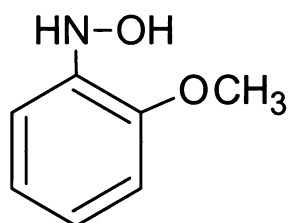
mutageny v různých systémech je dán zřejmě různou účinností enzymové přeměny *o*-anisidinu v jednotlivých testech na mutagenitu.¹⁷⁴

o-Anisidin je v experimentech *in vitro* oxidativně aktivován peroxidasami (Obr. 17) na sloučeniny, které se vážou na DNA. Tato skutečnost by signalizovala genotoxický mechanismus karcenogenity *o*-anisidinu. Pomocí experimentů s křenovou peroxidázou (HRP, Horse Raddish Peroxidase) a laktoperoxidázou (LPO) byla zjištěna tvorba volných radikálů, které mohou tvořit azo-dimer *o*-anisidinu nebo diimin (obr. 14). Diimin je ve vodném prostředí nestálý a přeměňuje se na chinonimin. Tyto reakce probíhají radikálovým mechanismem. Tři výše zmíněné produkty byly stanoveny jednak nepřímo Thompsonem a Elingem,¹⁶⁶ jednak přímo pomocí hmotnostní spektrometrie v laboratořích katedry biochemie PřF UK.^{177,121} Diimin *o*-anisidinu byl určen jako produkt oxidace *o*-anisidinu tvořený peroxidázami, který se kovalentně váže na DNA.¹⁷⁶



Oxidací *o*-anisidinu cytochromy P450 vzniká N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu (Obr. 14 a 15). Tvorba tohoto metabolitu byla zjištěna inkubací *o*-anisidinu s lidskými mikrosomy obsahujícími cytochrom P450. Korelačními analýzami a sledování vlivu inhibitorů na přeměnu *o*-anisidinu při použití lidských mikrozomálních systémů bylo možné určit cytochromy P450 katalyzující tvorbu metabolitů *o*-anisidinu. Výsledky ukazují, že majoritním cytochrom P450 metabolizujícím *o*-anisidin je CYP2E1. V Supersomech (cytochromy obsahující lidské rekombinantní cytochromy P450) byl však CYP1A2 účinnější v oxidaci *o*-anisidinu než CYP2E1. Dále se na metabolismu podílely CYP2B6, 1A1, 2A6, 2D6 a 3A4.

Nicméně studie vytváření aduktů *in vivo* jsou nezbytné pro potvrzení jeho genotoxického mechanismu. Ashby a spol.¹⁵³ uvádějí, že podání *o*-anisidinu (750 mg/kg) orálně myši B6F3C1 nevede k vytvoření aduktů detekovatelných „³²P-postlabelingem“ v DNA močového měchýře a jater. Stejní autoři předpokládají, že *o*-anisidin je mutagenní, protože generuje radikály. Obdobný pokus byl proveden také v laboratořích katedry biochemie PřF UK.¹⁷⁵ Zjišťována byla schopnost *o*-anisidinu tvořit adukty v DNA *in vivo*. Laboratorní potkani byli premedikováni *o*-anisidinem (0,15 mg/kg denně po dobu 5 dní) a DNA z vybraných orgánů potkanů byla analyzována „³²P postlabelingem“. Výsledky těchto experimentů jsou uvedeny v předkládané diplomové práci.



Obr. 15: N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin

6 Cíl diplomové práce

Cílem předkládané diplomové práce bylo bližší poznání metabolismu kancerogenního *o*-anisidinu cytochromy P450 a jeho interakce s DNA *in vitro* a *in vivo*.

Pro úspěšné dosažení daného cíle bylo nutné:

- Studovat přeměny *o*-anisidinu a jeho oxidací vzniklého N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu
- Charakterizovat vznikající metabolity
- Studovat reakce proximálního metabolitu *o*-anisidinu, N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu s DNA a deoxyguanosinem

Přípravit a charakterizovat adukty vzniklé z deoxyguanosinu a N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu

7 Materiál a metody

7.1 Materiál

Materiál použitý pro studie provedené v předložené diplomové práci pocházel z následujících zdrojů:

- **Lachema (Brno, Česká Republika):** $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, KH_2PO_4 , methanol, ethanol, kyselina mravenčí, kyselina octová, HCl
- **Fluka (Švýcarsko):** methanol, *o*-anisidin, Tris, 2'-deoxyguanosin monohydrát
- **Sigma-aldrich (Německo):** NH_3 , 2'-deoxyguanosin-3'-monofosfát, NADP^+ , glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfátdehydrogenasa
- **Připraveny v laboratoři katedry biochemie PŘF UK:** jaterní mikrosomy králíka a potkana indukované fenobarbitalem
- **Dar z Oddělení molekulární toxikologie Německého centra výzkumu rakoviny v Heidelbergu:** N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin

7.2 Metody

7.2.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

HPLC byla použita k separaci produktů oxidace *o*-anisidinu [resp. N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu] cytochromy P450. K separaci látek byla použita kolona C-18 s reverzní fází (250 x 4,6 mm, 5 μm , Nukleosil 100-5, Macherey – Nagel, Postfach,

SRN) temperovaná na 35 °C. Složení mobilní fáze odpovídalo 20 % methanolu a 80 % 0,1 M hydrogenuhličitanovému pufru (pH 8). Chromatografie byla prováděna při rychlosti průtoku mobilní fáze 0,7 ml/min a k spektrofotometrické detekci jednotlivých složek reakční směsi bylo použito vlnové délky 254 nm. Množství vzorku aplikovaného na kolonu bylo 20 µl.

HPLC byla dále použita k separaci produktů reakce 2'-deoxyguanosinu s N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminem. K separaci látek byla použita stejná kolona temperovaná na 35°C. Mobilní fází byl nejdříve 50 mM roztok KH₂PO₄ turovaný HCl (pH=3,5). Již z prvních měření bylo zjištěno, že se v inkubační směsi nachází velmi hydrofobní sloučeniny. Z tohoto důvodu byly podmínky separace změněny, konkrétně byla použita vyšší konečná koncentrace methanolu (z původních 75% zvýšena na 100% MeOH a čas analýzy byl prodloužen z 60 na 75 min). Použitý gradient uvádí *tabulka 4*.

Tab.4: Průběh gradientu při separaci inkubační směsi N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu a 2'-deoxyguanosinu na HPLC

čas	0	1	5	15	45	60	65	68	70	75
50mM KH ₂ PO ₄ (%)	100	99	99	90	40	0	0	100	100	100
Methanol (%)	0	1	1	10	60	100	100	0	0	0
Průtok (ml/min)	0,7	0,7	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,7	0,7

Uvedeným postupem se podařilo oddělit všechny složky inkubační směsi. Pro potřeby plánované charakterizace vzniklé látky pomocí hmotnostní spektrometrie však bylo nutné změnit složení mobilní fáze tak, aby nebylo ovlivněno následné stanovení pomocí MS. Již malé koncentrace solí znesnadňují ionizaci při měření MS. Bylo tedy testováno nahrazení KH₂PO₄ kyselinou octovou a mravenčí. Pro další práci jsem zvolil kyselinu mravenčí a pH vodné fáze upravoval vždy jejím přídatkem na hodnotu pH 3,5. Eluce byla prováděna gradientem methanolu z 0 na 100% při rychlosti průtoku mobilní fáze 0,7 až 0,5 ml/min. Takto optimalizovaná metoda byla pak použita jednak při HPLC s hmotnostní detekcí (*viz kapitola 7.2.2*), jednak při separaci inkubační směsi N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu a 2'-deoxyguanosinu pomocí HPLC se spektrofotometrickou detekcí. K spektrofotometrické detekci jednotlivých složek reakční směsi bylo použito vlnové délky 254 nm. Množství vzorku aplikovaného na kolonu bylo 10 µl.

Příprava vzorků pro analýzu metabolitů *o*-anisidinu a aduktů tvořených

z N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu a 2'-deoxyguanosinu pomocí HPLC:

Inkubační směs pro sledování metabolismu *o*-anisidinu a N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu obsahovala takové množství mikrosomů, aby koncentrace cytochromu P450 (při indukci fenobarbitalem především izoforma CYP 2B4) ve vzorku byla 10 μ M. Dále obsahovala 0,5 mM *o*-anisidin [resp. N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin] (rozpuštěné_v dimethylsulfoxidu), 1 mM NADPH a do objemu 100 μ l byla doplněna 0,1M fosfátovým pufrům (pH 7,4). Inkubace probíhala za stálého třepání (třepačka T22, VD Lověna Praha) v otevřených mikrozkuřavkách 30 minut při teplotě 37 °C. Po uplynutí této doby byla reakce zastavena přidáním 100 μ l methanolu do inkubační směsi a vzniklá směs byla následně centrifugována při 13 000 RPM (MSE MicroCentaur, Sanyo, UK; úhlový rotor). Kontrolní vzorky byly připraveny stejným postupem, ale neobsahovaly NADPH. Při sledování vlivu různých reakčních podmínek na metabolismus *o*-anisidinu a N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu byla tato reakční směs dále modifikována (*viz kapitola 8: Výsledky*).

Směs pro inkubaci N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu a 2'-deoxyguanosinu obsahovala 3,35 mM 2'-deoxyguanosin a 35 mM N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin ve 100 mM Tris-acetátovém pufru o různém pH (pH = 4; 5; 6; 7,4; 8; 9; 13,5). Standardně užívaná doba inkubace byla 1 hodina při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby byla směs centrifugována při 13 000 RPM (MSE MicroCentaur, Sanyo, UK; úhlový rotor). Takto připravené vzorky byly již aplikovány na kolonu.

7.2.2 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektra metabolitů M1, M2 a také aduktu vznikajícího inkubací 2'-deoxyguanosinu s N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminem byla měřena na přístroji Bruker Esquire 300 (Německo). Při měření byly použity 2 techniky ionizace: ESI („electrospray ionization“) a APCI („atmospheric pressure chemical ionization“). Pro „on-line“ stanovení spekter jsme použili ještě HPLC HP1100 (USA). Hmotnostní spektra byla měřena RNDr. Martinem Štíchou (katedra organické chemie PŘF UK).

Příprava vzorků pro MS:

1) Metabolity *o*-anisidinu

Produkty reakce *o*-anisidinu s mikrosomálním systémem, separované pomocí HPLC, byly „sbírány“ do skleněných zkumavek, zahuštěny na minimální objem ve vakuové odparce Speedvac (USA) a před hmotnostní analýzou uchovány při teplotě -20 °C.

Při další analýze bylo použito uspořádání HPLC s hmotnostním detektorem.

2) Deoxyguanosinový adukt tvořený z N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu a 2'-deoxyguanosinu

Produkty inkubace N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu a 2'-deoxyguanosinu byly jednak analyzovány v uspořádání HPLC s hmotnostním detektorem, jednak byl žádáný produkt „sbírán“ po separaci pomocí HPLC se spektrofotometrickou detekcí (*viz kapitola 7.2.1*) do skleněných zkumavek a potom analyzován.

7.2.3 „³²P-Postlabeling“ aduktů derivovaných od *o*-anisidinu tvořených *in vitro* a *in vivo*

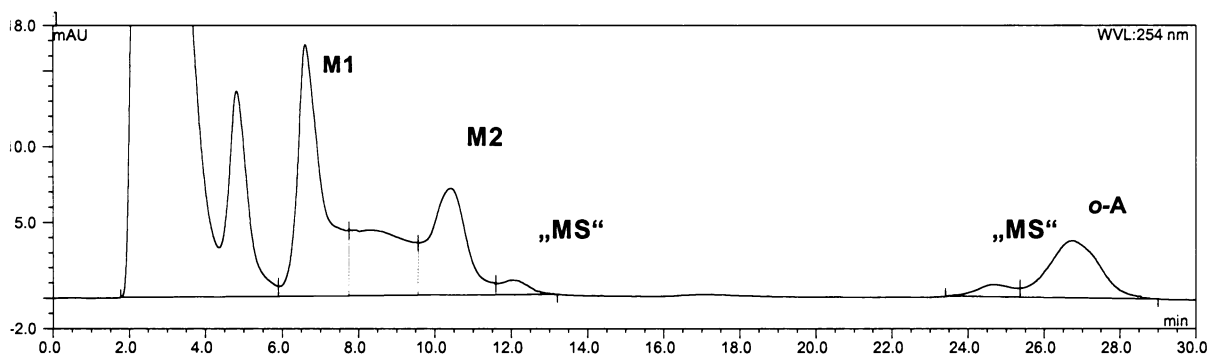
Metoda „³²P-postlabeling“ (detailní popis v teoretické části práce) byla užita k detekci aduktů *o*-anisidinu a jeho metabolitu N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu tvořených v DNA a jejich složkách *in vitro* a *in vivo*. Měření byla prováděna na spolupracujícím pracovišti německého Centra pro výzkum rakoviny (Heidelberg) školitelkou Doc. RNDr. Marii Stiborovou, DrSc. Experimenty s laboratorními zvířaty byly prováděny v komerčním zařízení (firma RSD, Dobřichovice). DNA z experimentů *in vitro* i *in vivo* byla izolována fenol/chloroformovou extrakcí a kvantifikována spektrofotometrií.

8 Výsledky

8.1 Metabolismus *o*-anisidinu

8.1.1 Separace produktů metabolismu *o*-anisidinu králičími mikrozomy pomocí HPLC

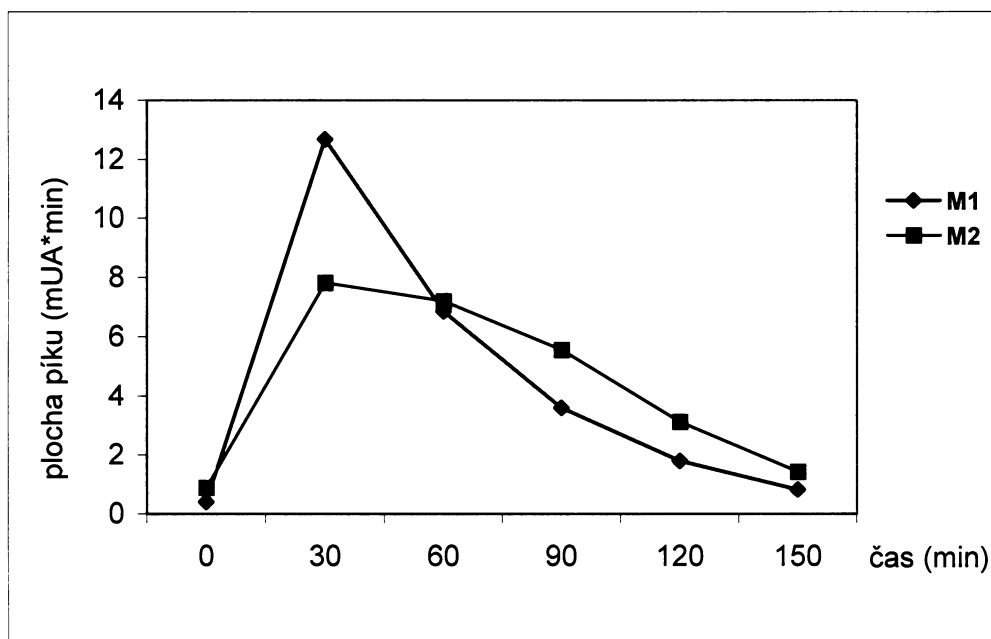
Při analýze inkubační směsi (*o*-anisidinu, NADPH generujícího systému a králičích mikrosomů) pomocí HPLC jsme spolu s kolegyní Lucií Kejíkovou detekovali 2 produkty eluované s retenčními časy 6,6 a 10,4 min, označené jako metabolity M1 a M2 (Obr. 16). Pík eluovaný v 26,7 min odpovídal výchozí látce reakce, tj. *o*-anisidinu. „Kochromatografie” výše uvedené inkubační směsi s N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminem ukázala, že se chromatografické vlastnosti ani jednoho z výše uvedených metabolitů neshodují s vlastnostmi syntetického standardu této sloučeniny.¹⁵⁶ N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin, majoritní produkt oxidace *o*-anisidinu, určený pomocí TLC¹⁵⁶ a hmotnostní spektrometrie,¹⁵⁶ nebyl na chromatogramu zaznamenán. Tato skutečnost může být dána jednak jeho nestabilitou za podmínek použitých při inkubaci a metodě HPLC, jednak tím, že mohl být následně oxidován mikrozomálními enzymy. „Pík“ detekovaný v elučním čase 4,7 min odpovídá NADPH.



Obr. 16 Produkty metabolismu *o*-anisidinu detekované při separaci reakční směsi obsahující *o*-anisidin a mikrosomální systém pomocí HPLC; M1, M2 – metabolity 1 a 2, o-A – *o*-anisidin, „MS“ – píky, které jsou detekovány i v kontrolním vzorku (mikrosomální frakce bez *o*-anisidinu)

8.1.2 Závislost tvorby metabolitů *o*-anisidinu M1 a M2 na době inkubace reakční směsi obsahující králičí mikrozomy

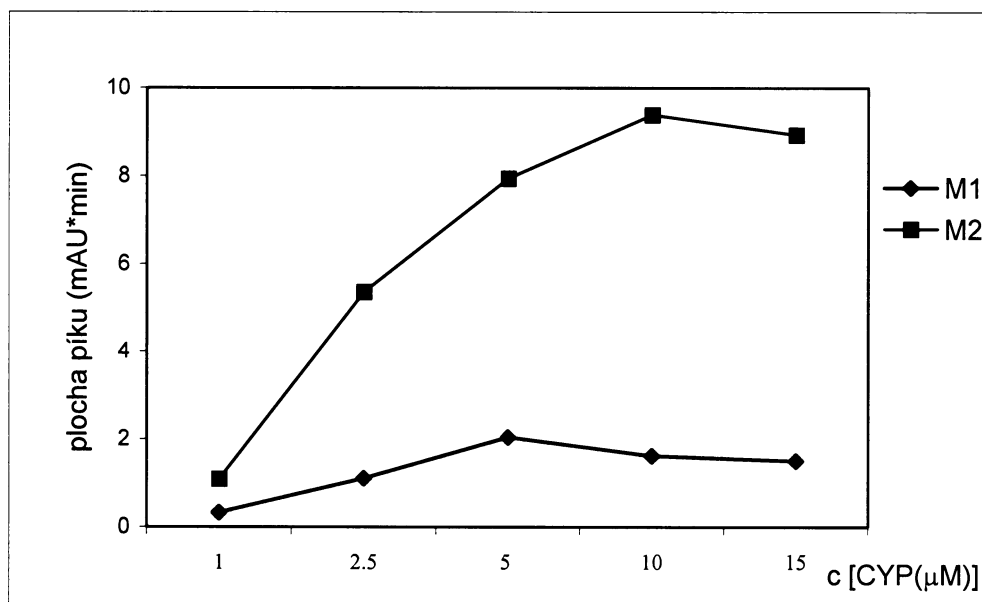
Pro objasnění metabolismu *o*-anisidinu bylo sledováno množství metabolitů vzniklých enzymovou přeměnou v závislosti na době inkubace. Reakční směsi byly inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 0, 30, 60, 90 120 a 150 min. Z chromatogramů jednotlivých reakčních směsí bylo zřejmé, že doba inkubace významně ovlivňuje množství metabolitů. Z Obr. 19 je patrné, že k tvorbě největšího množství metabolitu M1 a M2 dochází při době inkubace 30 minut, proto byla zvolena jako optimální pro další studium metabolismu *o*-anisidinu. Reakční směsi inkubované 15 minut poskytovaly zanedbatelná množství obou produktů. Na obr. 17 můžeme dále sledovat úbytek obou metabolitů v čase inkubace 60 minut a změnu poměru jejich množství po 90 minutách inkubace. Při inkubaci trvající déle než 120 minut došlo k výraznějšímu, ale kontinuálnímu, úbytku obou metabolitů. Množství výchozí látky reakce, *o*-anisidinu, se prakticky od doby inkubace 30 minut nezměnilo.



Obr. 17 Závislost tvorby metabolitů M1 a M2 na době inkubace reakční směsi obsahující *o*-anisidin a jaterní mikrosomální systém králíka

8.1.3 Závislost tvorby metabolitů *o*-anisidinu M1 a M2 na koncentraci cytochromu P450 v reakční směsi

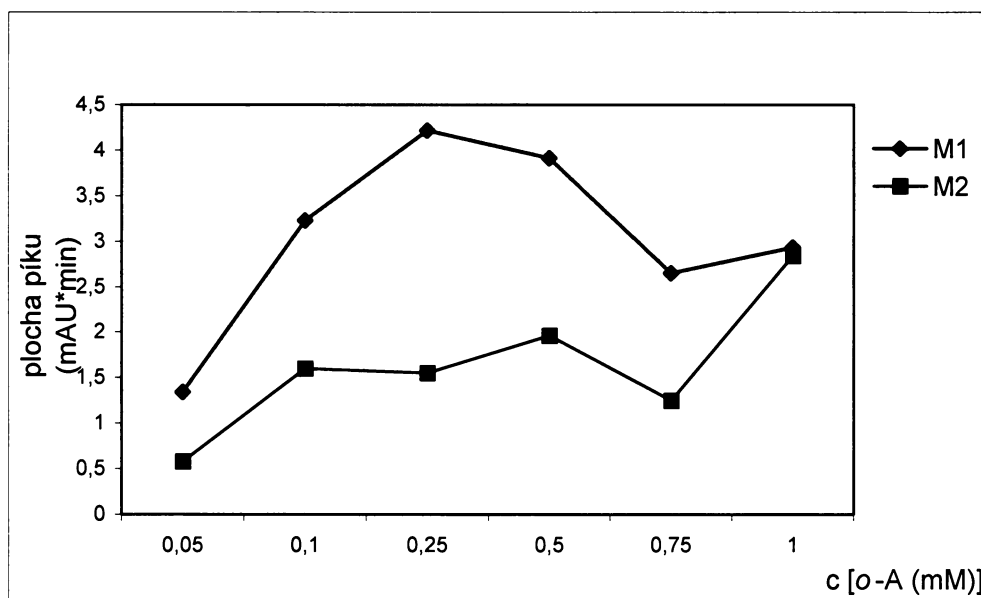
Za účelem zjištění optimálního množství cytochromu P450 pro metabolismus *o*-anisidinu byla studována závislost tvorby metabolitů M1 a M2 na následujících koncentracích tohoto enzymu v jaterním mikrosomálním systému: 1; 2,5; 5; 10 a 15 $\mu\text{mol/l}$. Reakční směsi s uvedenými koncentracemi enzymu byly inkubovány 30 min při teplotě 37 °C. Na *Obr. 20* jsou uvedena množství metabolitů vzniklých při separacích jednotlivých inkubačních směsí. Z obrázku je patrné, že nejvhodnější koncentrace cytochromu P450 v reakční směsi je 5 μM , vzhledem k tomu, že produkuje vysoká množství metabolitu M1 a nejvíce metabolitu M2. Tato koncentrace byla použita v dalších studiích oxidace *o*-anisidinu. Koncentrace enzymu v reakční směsi nižší než 5 μM neposkytovala dostatečná množství sledovaných metabolitů. Cytochrom P450 v koncentraci 10 μM sice vyvolal nárůst tvorby metabolitu M1, ale tvorba metabolitu M2 byla mírně snížena. Z *Obr. 18* je zřejmé, že ani 15 μM koncentrace se nejeví jako optimální z hlediska tvorby obou metabolitů.



Obr. 18 Závislost tvorby metabolitu M1 a M2 na koncentraci cytochromu P450 v reakční směsi oxidace *o*-anisidinu separované pomocí HPLC

8.1.4 Závislost tvorby metabolitů *o*-anisidinu M1 a M2 na koncentraci *o*-anisidinu v reakční směsi s mikrozomálním systémem králíka

V těchto experimentech byla studována závislost tvorby metabolitu M1 a M2 na koncentraci substrátu. Pro charakterizaci metabolitů M1 a M2 bylo důležité zjistit, při jaké koncentraci substrátu vzniká jejich maximální množství. V experimentech jsme zvolili následující koncentrace *o*-anisidinu: 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 a 1 mM. Reakční směsi obsahující různá množství substrátu byly inkubovány v přítomnosti mikrosomálního systému a NADPH při 37°C po dobu 30 min. *Z obr. 19* je zřetelné, že tvorba metabolitů není přímo úměrná množství substrátu v inkubační směsi. Optimální koncentrace substrátu, při které dochází k tvorbě nejvyššího množství metabolitu M1 a dostatečného množství M2, je 0,25 mM. Také při separaci reakční směsi s výchozí koncentrací *o*-anisidinu 0,5 mM bylo detekováno dostatečné množství metabolitu M1 a v porovnání s ostatními chromatogramy nejvyšší množství M2. Proto byla tato koncentrace *o*-anisidinu použita pro další studie jeho metabolismu. Nižší koncentrace substrátu neposkytovaly dostatečná množství metabolitů, ale ani koncentrace *o*-anisidinu vyšší, tj. 0,75 a 1 mM., nebyly vhodné pro další experimenty.



Obr. 19 Závislost tvorby metabolitu M1 a M2 na různé koncentraci *o*-anisidinu v reakční směsi s králíčími jaterními mikrozomy, separované pomocí HPLC

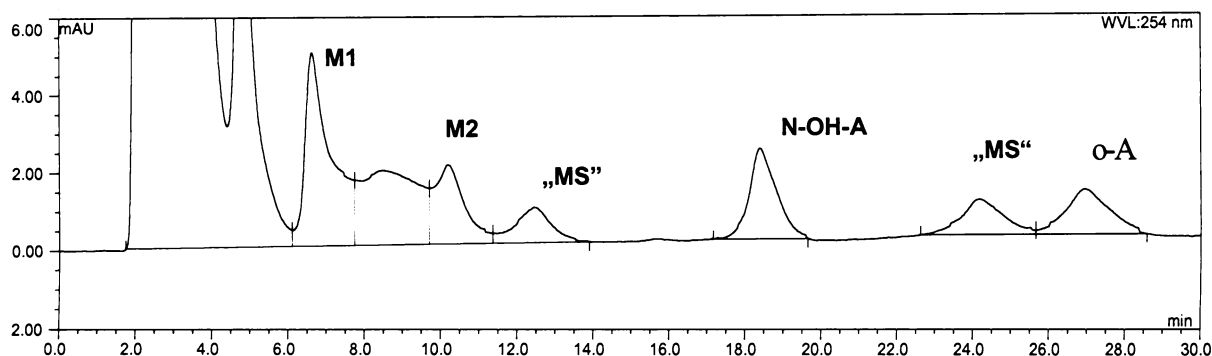
Žádná reakční směs, analyzovaná pomocí HPLC, s různými koncentracemi reakčních složek, neposkytla na chromatogramu pík N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu. Ze studií TLC¹⁵⁶ ale víme, že oxidací *o*-anisidinu tato látka vzniká. Můžeme tedy předpokládat, že příslušný N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin může být při reakci ihned spotřebován, tj. oxidován mikrosomálním systémem za tvorby metabolitů M1 a M2. V dalších experimentech byl použit jako výchozí látka reakce synteticky připravený N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin, abychom potvrdili náš předpoklad a detailněji objasnili mechanismus vzniku metabolitů M1 a M2.

8.2 Přeměna N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu jaterními mikrozomy králíka

8.2.1 Separace produktů metabolismu

N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu jaterními králičími mikrozomy pomocí HPLC

Pro sledování přeměny N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu bylo použito stejné složení reakční směsi i stejné reakční podmínky jako při studiích oxidace *o*-anisidinu. Při separaci produktů metabolismu N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu mikrosomálním systémem pomocí HPLC byly detekovány 2 metabolity, jejichž retenční časy (6,6 a 10,2 min) odpovídaly retenčním časům metabolitů M1 a M2 vzniklých oxidací *o*-anisidinu (*Obr. 20*). Na chromatogramu byl dále zaznamenán pík v 18,4 min, u kterého bylo „kochromatografií“ se syntetickým standardem zjištěno, že se jedná o výchozí látku reakce, N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin. Ve 26,9 minutě eluoval pík, který na základě svých chromatografických vlastností odpovídal *o*-anisidinu. Píky eluované v retenčních časech 12,4 a 24,1 min pochází pravděpodobně z mikrosomální frakce, neboť byly detekovány i v kontrolním vzorku (inkubace bez N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu). Pík detekovaný v elučním čase 4,7 min odpovídá NADPH.

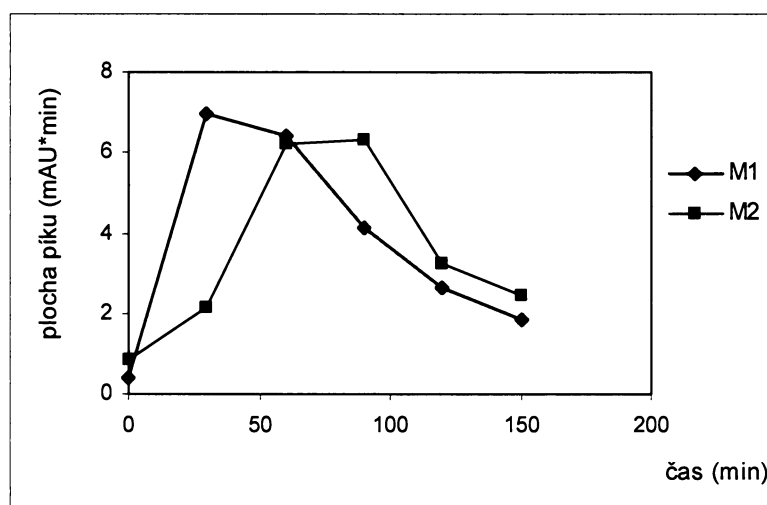


Obr. 20 Produkty metabolismu *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu detekované při separaci reakční směsi obsahující *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu a mikrozomální systém králíka pomocí HPLC; M1, M2 – metabolity 1 a 2, *o*-A – *o*-anisidin, „MS“ - píky, které jsou detekovány i v kontrolním vzorku (mikrozomální frakce bez *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu)

8.2.2 Závislost tvorby produktů přeměny

N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu, M1 a M2, na době inkubace reakční směsi

Množství vznikajících metabolitů M1 a M2 bylo sledováno v závislosti na době inkubace reakční směsi *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu s jaterními králíčími mikrosomy. Doba a reakční podmínky inkubace byly zvoleny stejné jako v experimentech s *o*-anisidinem. Reakční směs byla inkubována 0,30; 60; 120 a 150 min při teplotě 37°C.

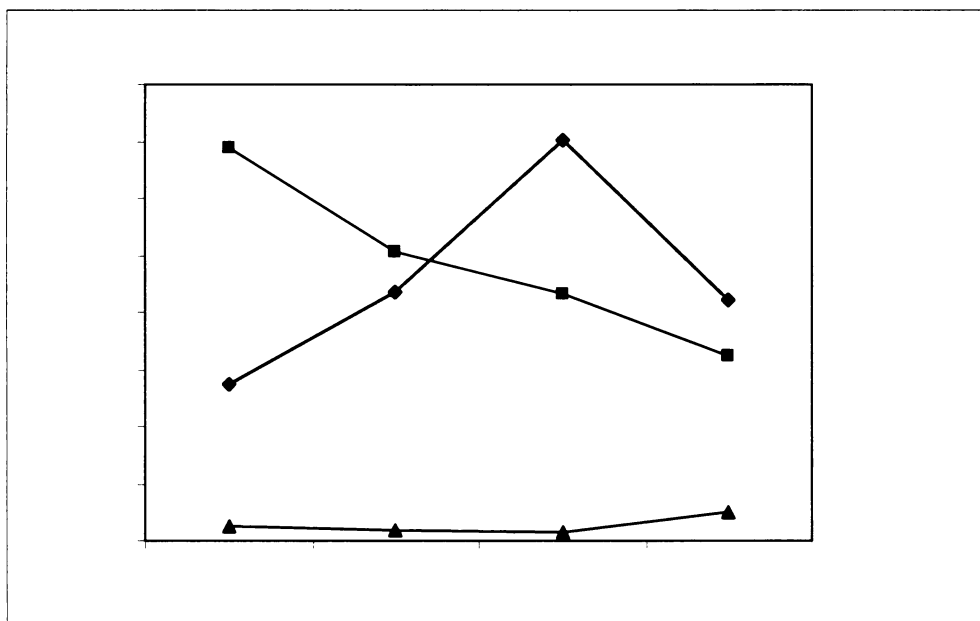


Obr. 21 Závislost tvorby metabolitů M1 a M2 na době inkubace reakční směsi obsahující *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu a mikrozomální systém králíka

Porovnáním jednotlivých chromatogramů se zjistilo, že nejvíce metabolitu M1 vzniká při době inkubace 30 min (Obr. 21). Optimální množství obou metabolitů však bylo detekováno při separaci reakční směsi inkubované 60 min. Inkubační doba kratší než 30 minut vyvolala tvorbu velmi malého množství sledovaných metabolitů. Z Obr.21 je navíc patrné, že po 120 minutách inkubace dochází k výraznému úbytku obou metabolitů.

8.2.3 Závislost tvorby metabolitů M1 a M2 na množství cytochromu P450 v reakční směsi obsahující N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin a mikrozomální systém králíka

Podobně jako u oxidace *o*-anisidinu byl podroben experimentům také N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin za použití různé koncentrace cytochromu P450 v reakční směsi a bylo sledováno množství vznikajících metabolitů. Pro jednotlivé inkubace byla použita následující množství cytochromu P450: 1; 2,5; 5 a 10 $\mu\text{mol/l}$.

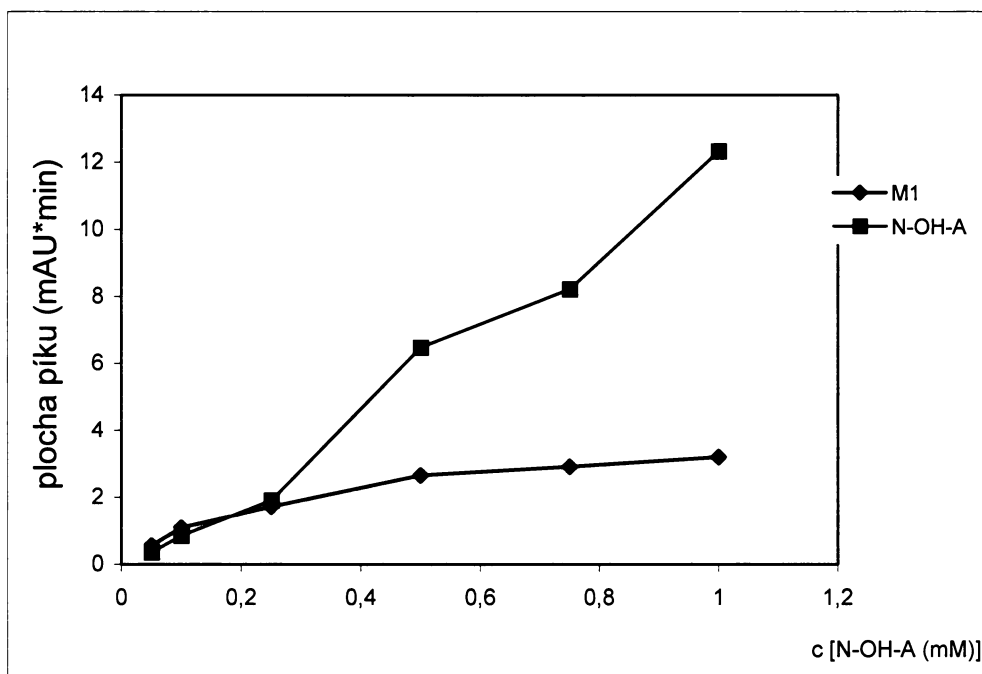


Obr. 22 Závislost tvorby metabolitu M1 na koncentraci cytochromu P450 v reakční směsi obsahující N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin a mikrozomální systém králíka; M1 – metabolit 1, N-OH-A - N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin, o-A – o-anisidin

Z obr. 24 je zřejmé, že při 5 μM koncentraci enzymu dochází k přeměně výchozí látky reakce za tvorby maximálního množství metabolitu M1 a tato koncentrace je tedy vhodná pro použití v dalších studiích přeměny N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu. Metabolitu M2 vznikalo malé, ale konstantní množství. Závislost tvorby metabolitu M2 na koncentraci cytochromu P450 není proto na Obr.22 uvedena. V dalších experimentech jsme se zaměřili pouze na tvorbu metabolitu M1. 1 a 2,5 μM koncentrace enzymu vyvolaly tvorbu malého množství metabolitu M1. Avšak ani 10 μM koncentrace enzymu neposkytla dostatečná množství námi sledovaného produktu reakce (M1).

8.2.4 Závislost tvorby metabolitů M1 a M2 na koncentraci N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu v reakční směsi s králičími mikrozomy

Pro porovnání metabolismu *o*-anisidinu a N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu bylo dále sledováno množství vznikajících metabolitů M1 a M2 v závislosti na koncentraci N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu v reakční směsi.

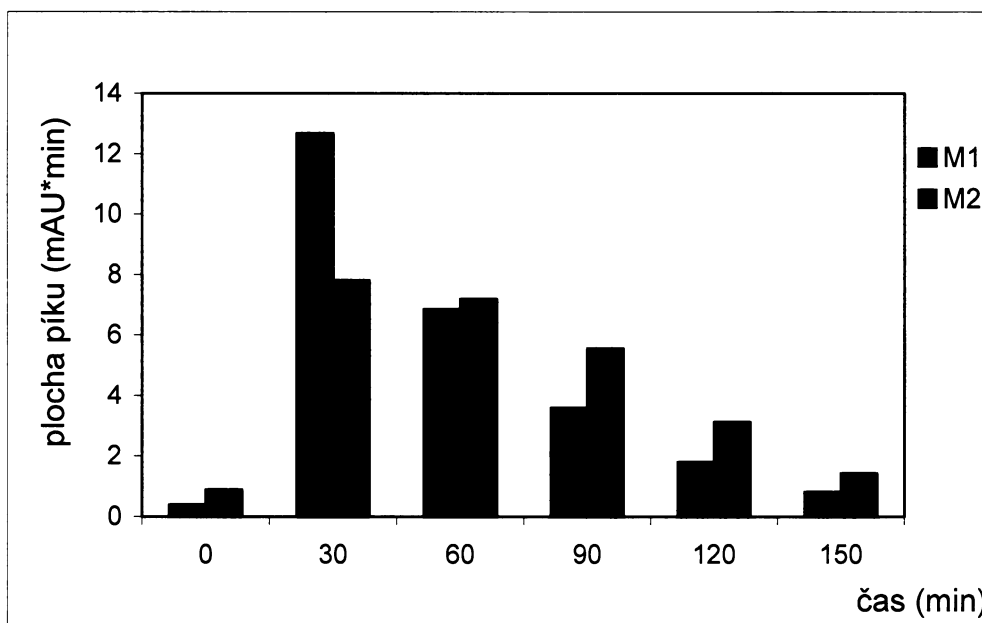


Obr. 23 Závislost tvorby metabolitu M1 na koncentraci výchozí látky, N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu, v reakční směsi s králičími mikrozomy; M1 - metabolit 1, N-OH-A - N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin

Byly zvoleny následující koncentrace výchozí látky: 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 a 1 mmol/l. Z Obr.23 je zřejmé, že se zvyšující se koncentrací substrátu v reakční směsi vzrůstá množství metabolitu M1. Nejefektivněji je N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin přeměňován mikrosomálním systémem při koncentraci substrátu 0,25 mM. Relativně nízká koncentrace výchozí látky zde poskytuje maximální množství metabolitu. Vyšší koncentrace substrátu již vyvolávají velmi pozvolný nárůst tvorby metabolitu M1.

8.3 Interkonverze metabolitů M1 a M2 v závislosti na čase a teplotě

Na základě výsledků uvedených v předchozích kapitolách a dalších experimentů bylo zjištěno, že v závislosti na době inkubace se mění nejen množství vznikajících metabolitů oxidace *o*-anisidinu, ale také jejich vzájemný poměr. Na Obr. 24 je patrná změna poměru metabolitu M1 vůči metabolitu M2 již v čase inkubace 60 minut. Vzhledem k tomu, že nárůst metabolitu M2 je sledován poklesem M1, můžeme předpokládat, že metabolit M1 je tedy spotřebováván pravděpodobně na tvorbu metabolitu M2.



Obr. 24 Interkonverze metabolitu M1 a M2 oxidace *o*-anisidinu v závislosti na době inkubace reakční směsi

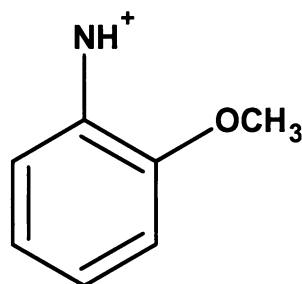
K této interkonverzi metabolitů dochází nejen při různé době inkubace reakční směsi za laboratorní teploty, ale také po ukončení reakce. Vzorky reakčních směsí, které byly připraveny pro separaci produktů pomocí HPLC, a které byly ponechány při laboratorní teplotě, vykazovaly v určitých časových intervalech různé poměry obsahu metabolitů M1 a M2. Reakční směsi, ve kterých byla reakce ukončena, jsme tedy před aplikací na kolonu HPLC ponechaly při laboratorní teplotě 0 až 150 min (data neuvedena). Vzhledem k tomu, že k interkonverzi došlo i po ukončení reakce, můžeme tímto potvrdit náš předpoklad, že ke vzniku metabolitů M1 a M2 dochází nejen enzymově, ale také spontánní přeměnou N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu.

Reakční směsi, ve kterých byla reakce ukončena, a které jsme před aplikací na kolonu ponechaly inkubovat při 0° C (na ledu), však nevykazovaly žádné změny poměrů metabolitů. Reakční směsi inkubované po dobu 30 min při 37 °C byly před aplikací na kolonu HPLC ponechány při 0° C (led) 0 až 120 min. Množství metabolitů ani jejich vzájemné poměry se v průběhu takové inkubace nezměnily (data neuvedena).

Z uvedených studií vyplývá, že na interkonverzi metabolitů má kromě doby inkubace výrazný vliv také teplota. Proto je pro získání validních výsledků nutné reakční směsi pro HPLC připravovat vždy čerstvé. Ze studií interkonverze metabolitů rovněž vyplývá skutečnost o částečně spontánním charakteru vzniku metabolitům M1 a M2 z N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu, který je velmi reaktivní a rozpadá se velmi ochotně v kyselém prostředí za vzniku několika produktů, z nichž dva odpovídají právě metabolity M1 a M2.¹⁵⁶ Při inkubaci *o*-anisidinu či N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu s mikrosomálním systémem králíka v přítomnosti NADPH dochází zřejmě tedy nejen k enzymové přeměně, ale zčásti také ke spontánnímu rozpadu N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu vzniklého oxidací *o*-anisidinu na metabolity M1 a M2.¹⁵⁶

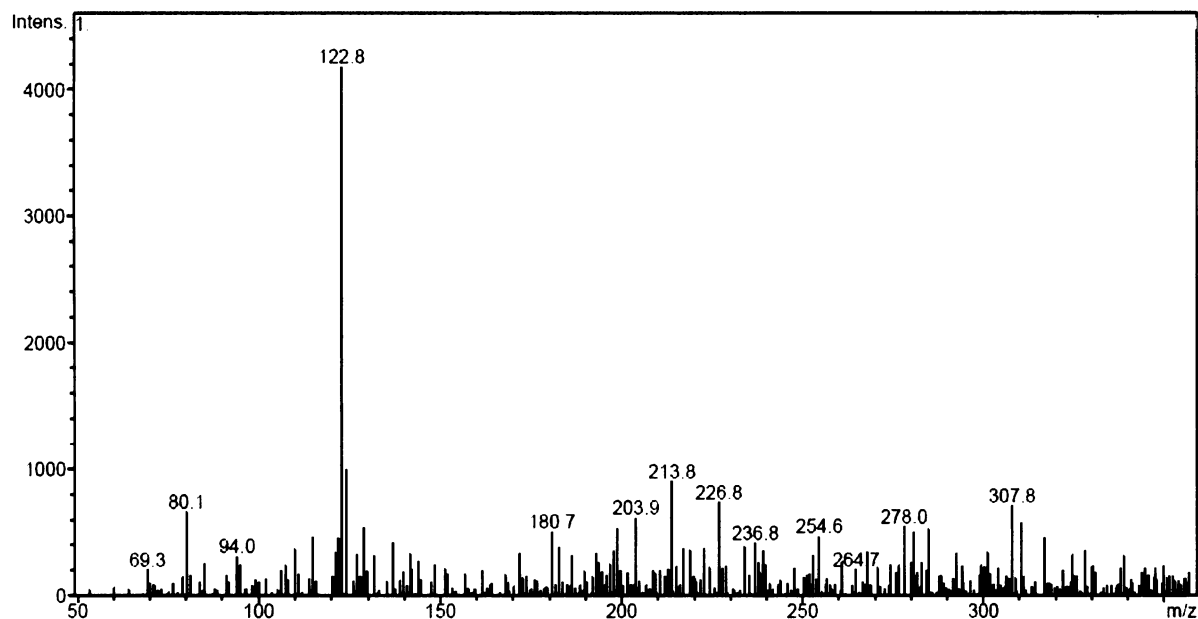
8.4 Charakterizace metabolitů *o*-anisidinu pomocí hmotnostní spektrometrie

V další fázi studia metabolismu *o*-anisidinu byla inkubace reakční směsi optimalizována tak, aby vznikalo maximální množství obou metabolitů. Nejdříve byly metabolity M1 a M2 „sbírány“ z několika chromatografických dělení na HPLC, ale vzhledem k jejich nestabilitě se je nedařilo charakterizovat hmotnostní spektrometrií. Po změně mobilní fáze (na 82% MetOH a 18%



Obr. 25: nitreniový iont

vodného roztoku NH₄OH (pH=8)) jsme analyzovali dané metabolity pomocí „on-line“ hmotnostní spektrometrie. Při užití ionizace APCI („atmospheric pressure chemical ionization“) byl v hmotnostním spektru M1 určen fragment 122,8 (Obr. 26), odpovídající relativní molekulové hmotnosti nitreniového (Obr. 25) či karbeniového iontu vzniklého z N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu. Metabolit M2 se vzhledem k jeho nestabilitě při MS analýze dosud touto metodou nepodařilo charakterizovat.

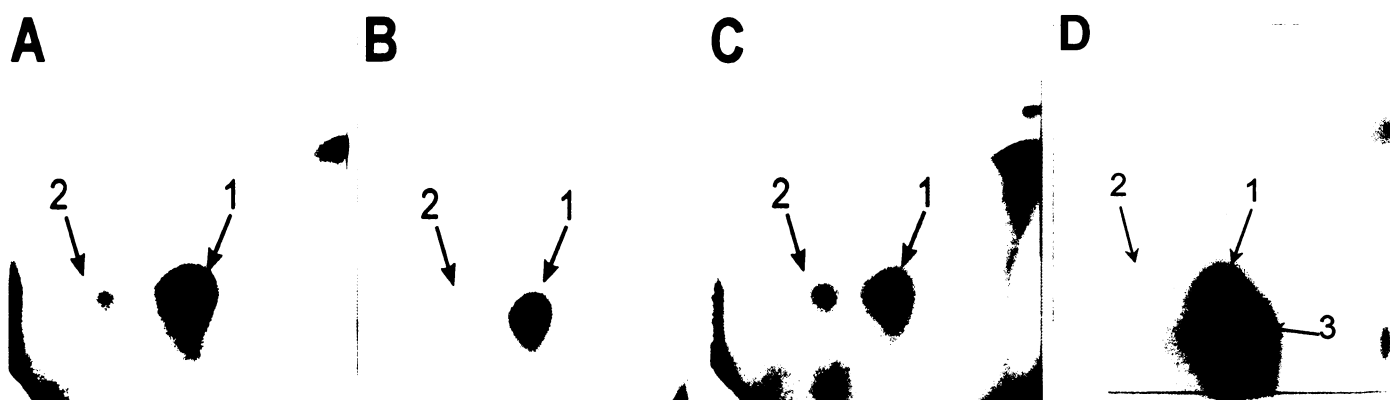


Obr. 26: Hmotnostní APCI spektrum metabolitu M1

8.5 Reakce N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu s DNA a deoxyribonukleotidy

Pro přiblížení reakce N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu s DNA a deoxyribonukleotidy byla zvolena metoda „³²P postlabeling“, která je schopna detekovat velmi malé množství aduktů vznikajících v DNA (viz kapitola „³²P-postlabeling“ v Teoretickém úvodu). Následující pokusy provedla školitelka této diplomové práce v laboratořích Cancer Research Institut v Heidelbergu.

K analýze aduktů v DNA vznikajících reakcí *o*-anisidinu, popř. N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu a DNA byla použita standardní metoda a také dva modifikované postupy „³²P-postlabelingu“ (verze s nukleasou P1 a extrakce modifikovaných nukleotidů 1-butanolovou extrakcí).



Obr. 27 Autoradiografické snímky [³²P]-značených aduktů v DNA:

- A lidské jaterní mikrozomy + *o*-anisidin + DNA (nukleasa P1)
- B N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin + 2'-deoxyguanosin-3-monofosfát, pH 7,4 (nukleasa P1)
- C DNA močového měchýře potkanů premedikovaných *o*-anisidinem (nukleasa P1)
- D N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin + 2'-deoxyguanosin-3-monofosfát, pH 5,0 (standardní procedura)

Adukty tvořící se z *o*-anisidinu a DNA vznikají až po aktivaci *o*-anisidinu jaterními mikrozomy. Jako vhodnou pro stanovení aduktů *o*-anisidinu s DNA se ukázala verze „³²P-postlabelingu“ s nukleasou P1 (Obr. 27A), zatímco při použití 1-butanolové extrakce nebo jen standardní procedury „³²P-postlabelingu“ nebyly detekovány žádné adukty. Během enzymové oxidace *o*-anisidinu s lidskými jaterními mikrozomy

vzniká N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin, který se rozkládá na nitréniový (Obr. 25) či karbeniový iont a působí jako proximální kancerogen. Bylo proto sledováno, zda dochází k tvorbě aduktů z N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu a deoxyguanosinu. Nejdříve byl synteticky připravený N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin použit v reakci s 2'-deoxyguanosin-3'-monofosfátem za fyziologického pH 7,4; výsledky z „³²P-postlabelingu“ při použití metody s nukleasou P1 můžeme vidět na Obr. 27B. Byly detekovány dvě skvrny, z nichž každá odpovídá jednomu vzniklému aduktu. Oba adukty se nachází ve stejných pozicích jako adukty vzniklé inkubací DNA a *o*-anisidinu aktivovaného lidskými jaterními mikrozomy (Obr.27A). Oba adukty byly extrahovány a dále děleny chromatografií na PEI-celulose ve směru D3 a D4, užívající dvě rozdílné rozpouštědlové soustavy. Tyto experimenty potvrdily, že adukty jsou chromatograficky totožné a že oba jsou stabilní při extrakci v alkalickém prostředí.

Majoritním aduktem v DNA vznikajícím z N-hydroxylarylaminů jsou adukty na C8 deoxyguanosinu¹⁷⁸. Právě tyto adukty jsou ale často defosforylovány při „³²P-postalbelingu“ užívajícím nukleasu P1. Vzorky aduktů byly proto analyzovány pomocí standardní metody „³²P-postalbelingu“. Při této analýze bylo detekováno velké množství nového aduktu v DNA (adukt 3 v Obr. 27D).

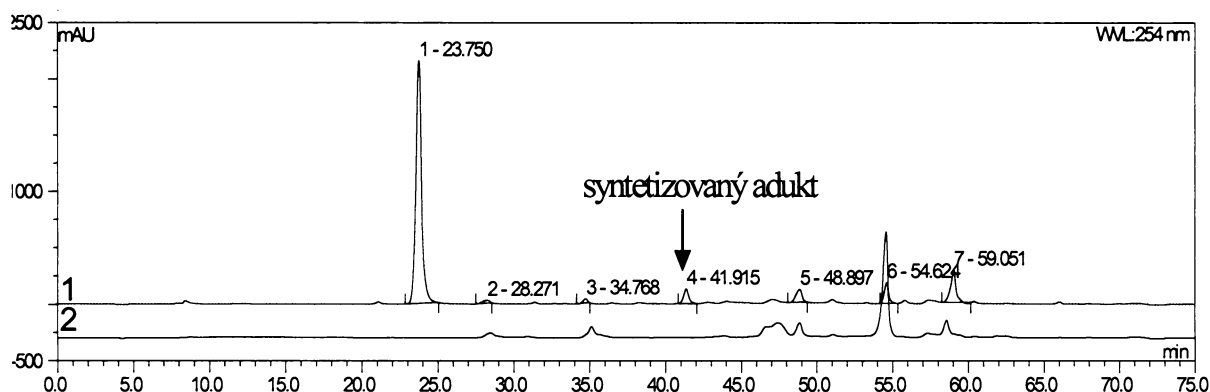
Je známo, že reakce N-hydroxylaminů s DNA probíhají rychleji v kyselém prostředí³¹, proto byly také paralelně provedeny a násleně porovnány inkubace N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu s 2'-deoxyguanosin-3'-fosfátem při pH=5 a pH=7. Inkubací při pH 5 a pH 7 se tvořilo výrazně větší množství všech aduktů při pH=5 (data neuvedena).

Abychom objasnili, jestli *o*-anisidin tvoří adukty v DNA také *in vivo*, byla DNA izolovaná z několika orgánů potkanů kmene Wistar analyzována pomocí metody „³²P-postlabeling“. Potkani byli premedikováni jednorázově dávkou 0,75 mg *o*-anisidinu/kg tělesné váhy. V cílových orgánech jako je močový měchýř byly detekovány adukty (Obr. 28C) totožné s těmi, které vznikají inkubací DNA a *o*-anisidinu aktivovaného lidskými mikrozomálními enzymy. Aduky byly dále detekovány v játrech, ledvině, slezině, zatímco nebyly zjištěny v plicích, srdci a mozku. Nejvíce aduktů s DNA a *o*-anisidinu bylo přítomno v močovém měchýři, následovaném játry, ledvinami a slezinou.

8.6 Charakterizace aduktu z deoxyguanosinu a N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu

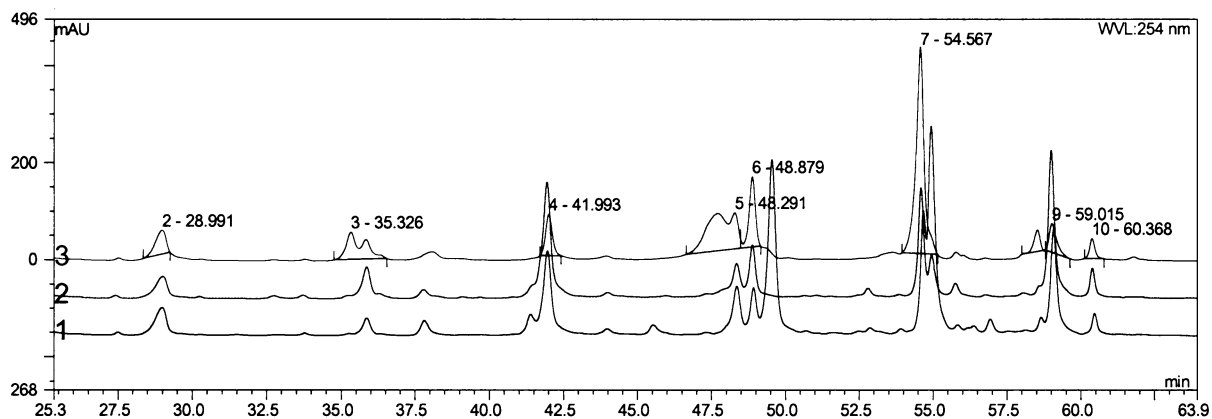
8.6.1 Příprava aduktů deoxyguanosinu a N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu

Adukty byly synteticky připravovány inkubací deoxyguanosinu a N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu bez přítomnosti enzymových systémů v 10 mM Tris-HCl (pH=5). Uvedená reakční směs byla po hodinové inkubaci dělena na HPLC. Porovnáním chromatogramů po dělení produktů inkubace a kontrolních vzorků, obsahujících N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin v 100 mM Tris, byl nalezen jeden rozdílný chromatografický „pík“ s retenčním časem 41,9 min, který byl dále studován (Obr. 28). Retenčnímu času 23,75 min odpovídá pozice deoxyguanosinu.



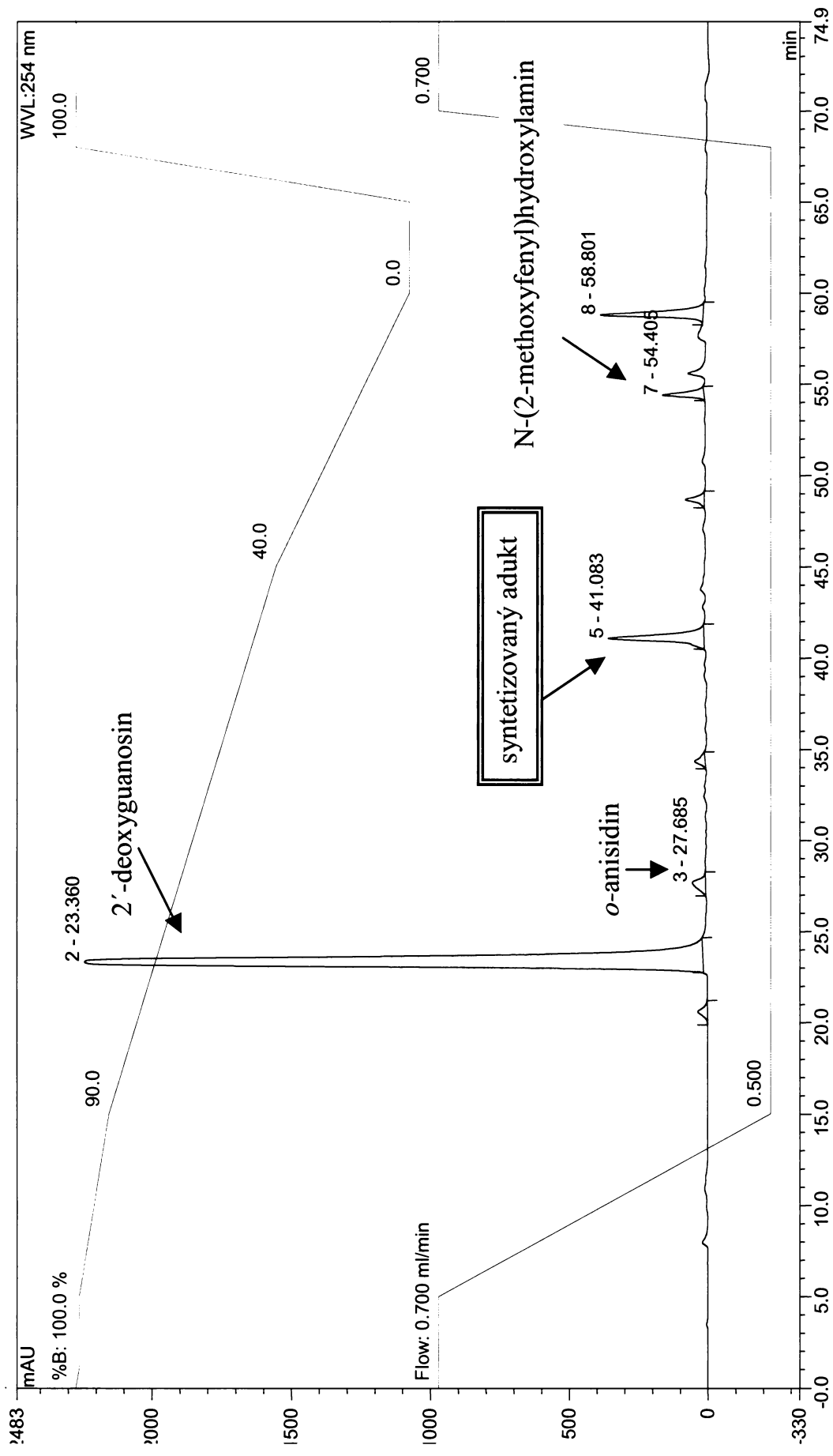
Obr. 28 Porovnání chromatogramů dělení směsi po inkubaci (1) a kontrolního vzorku (2) obsahující N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin v 100 mM Tris (pH=5). Po inkubaci vzniká „pík“ s retenčním časem 41,9 min, který se v kontrolním vzorku nenachází.

Pro další pokusy byla zvolena inkubační směs o složení: 3,35 mM deoxyguanosin a 35 mM N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin ve 100 mM Tris, nejdříve titrovaném HCl. Tento pufr špatně „udržoval“ pH v kyselé oblasti, proto byl nahrazen Tris-acetátovým pufrem. Účinnost inkubace byla testována při pH = 4, 5, 6. Největší množství požadovaného aduktu („pík“ s retenčním časem 41,9 min) vznikalo při pH=5 (Obr. 29).



Obr. 29: Porovnání chromatogramů jednotlivých inkubací deoxyguanosinu a *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu při různém pH: 1) pH=4, 2) pH=5 3) pH=6

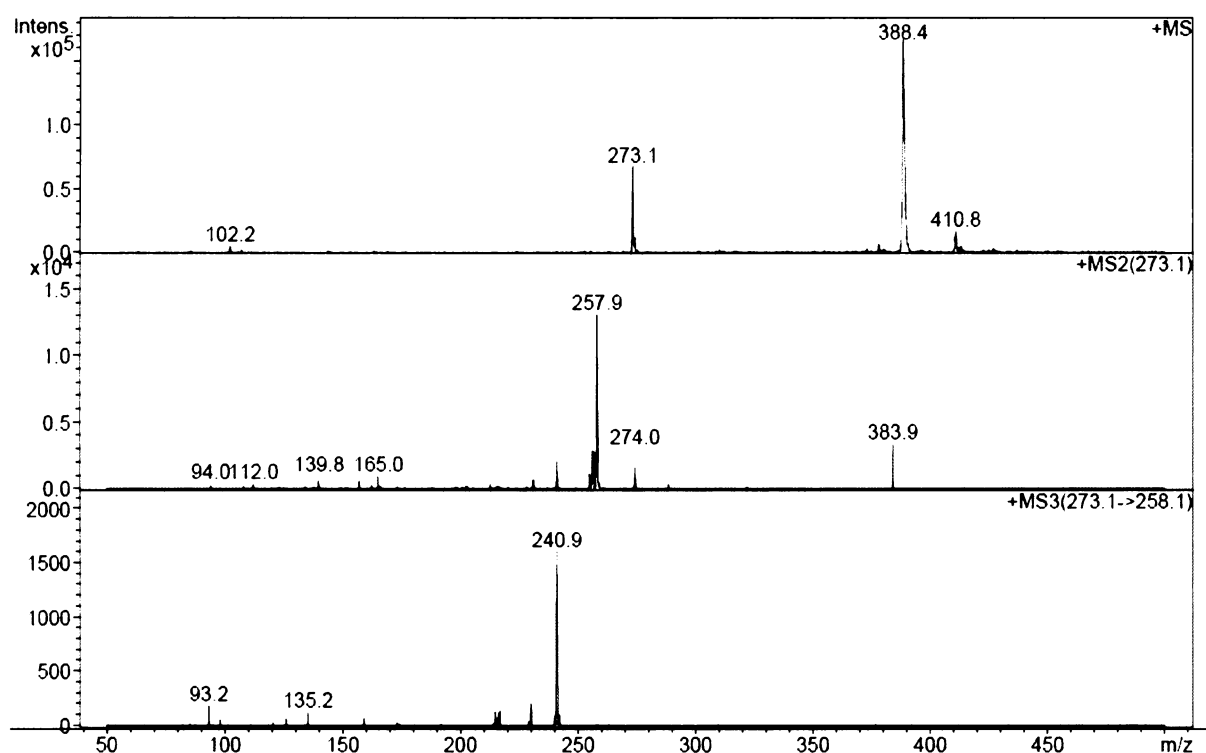
Uvedená směs byla nejdříve inkubována 1 hodinu při 37°C, ale pozdější měření prokázala, že pokud necháme reakční směs při laboratorní teplotě přes noc, získáme přibližně trojnásobné množství žádaného produktu. Delší stání již nevedlo ke zvýšení koncentrace aduktu, naopak k mírnému poklesu jeho tvorby. Dále byl sledován vliv mobilní fáze na dělení inkubační směsi (viz kapitola 7.2.1.vysokoúčinná kapalinová chromatografie). Takto optimalizovaná metoda již byla použita pro konečné dělení celé inkubační směsi (Obr. 30), tedy jednak při HPLC s hmotnostní detekcí, jednak při separaci inkubační směsi pomocí HPLC se spektrofotometrickou detekcí využitím pro „sbírání“ aduktu.



Obr. 30: HPLC reakční směsi N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu s 2'-deoxyguanosinem (Pozice jednotlivých sloučenin byly ověřeny měřením jejich hmotnostních spekter)

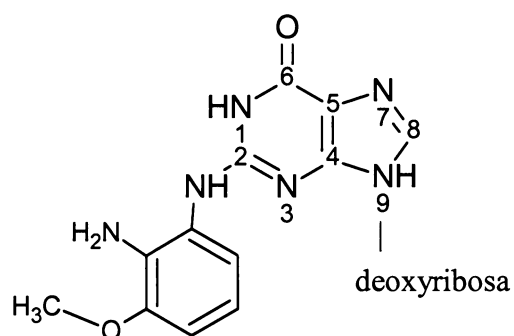
8.6.2 Hmotnostní spektrometrie majoritního aduktu

Pomocí hmotnostní spektrometrie byla určena relativní molekulová hmotnost majoritního aduktu získaného pomocí HPLC (Obr.30), která má hodnotu 388,3 (Obr. 31). Dále vznikl fragment m/z 273,0, což odpovídá ztrátě ribosy původní analyzované sloučeniny. Při dalším štěpení fragmentu 273,0, byl detekován iont o hmotnosti 257,9, který odpovídá relativní molekulové hmotnosti aduktu po ztrátě deoxyribosy a aminové skupiny. Následnou fragmentací (MS3) iontu 257,9 byl detekován další fragment s relativní molekulovou hmotností 240,9, který odpovídá ztrátě methoxyskupiny.

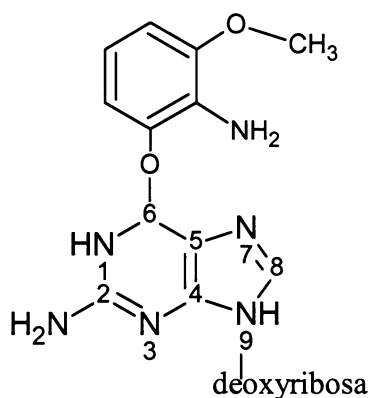


Obr. 31: Kompletní hmotnostní spektrum aduktu synteticky připraveného z deoxyguanosinu a *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu i s následnými fragmentacemi některých iontů. Užitá ionizace ESI, měření probíhala v pozitivním modu.

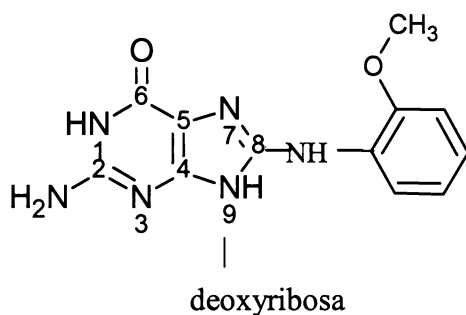
Měřením byla potvrzena přítomnost aduktu, který byl tvořen z deoxyguanosinu a N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu. Výsledky však nabízí nejméně 5 možných struktur, z nichž 3 uvedené v *obrázku 32* jsou nejvíce pravděpodobné.¹⁸



A) možné navázání karbeniového iontu, vzniklého z N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu, na N² deoxyguanosinu



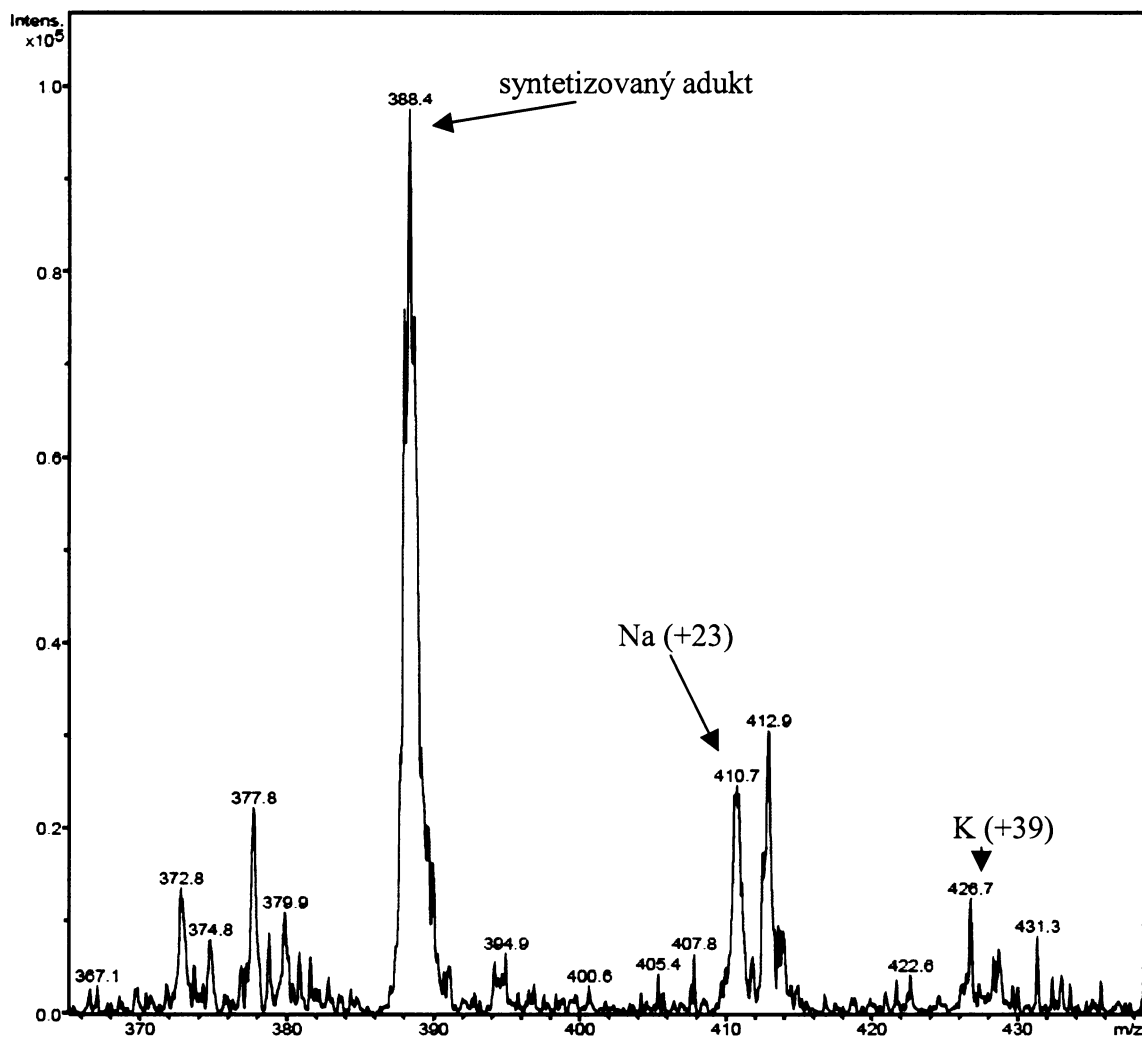
B) možné navázání karbeniového iontu, vzniklého z N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu, na O⁶ deoxyguanosinu



C) možné navázání nitréniového iontu, vzniklého z N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu, na C⁸ deoxyguanosinu

Obr. 32: Hypotetické struktury aduktů tvořených z N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu a 2'-deoxyguanosinu

Měření na hmotnostním spektrometru také potvrdila, že jde o sloučeninu s kovalentními vazbami (kovalentní adukt) a ne jen o pouhý konjugát molekul. Ve změřených spektrech vidíme i „píky“ posunuté o hodnotu 23 (sodík) a o 39 jednotek (draslík) oproti pozici „píku“ připraveného aduktu (obr.33). K tomuto posunutí dochází jen v případě vazby iontů Na^+ a K^+ na kovalentní sloučeniny.



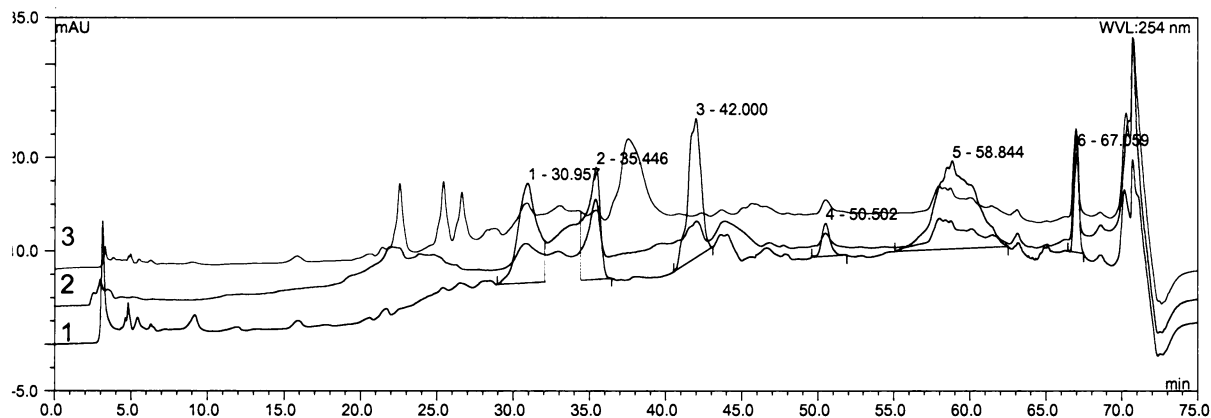
Obr. 33: Hmotnostní spektrum aduktu připraveného z deoxyguanosinu a *N*-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu při měření v pozitivním modu použitím ionizace ESI.

8.6.3 Charakterizace syntetizovaného aduktu

Z uvedených možností struktury připraveného aduktu (Obr. 32) jsme se snažili dalšími experimenty prokázat nejpravděpodobnější z nich.

Adukt vznikající navázáním reaktivní formy kancerogenních aromatických aminů na guanin přes C8 uhlík je totiž nestabilní v silně alkalickém prostředí, zatímco navázáním přes N² guaninu vzniká produkt, který je v prostředí vysokého pH stabilní.¹⁸⁰

Byla sledována také stability aduktu v prostředí o různém pH: při pH=7,4 se rychle ustavila rovnováha (do 80 min) a potom již nedocházelo k výraznějším změnám. Naopak při pH=5 a 9,5 byl rozklad připraveného deoxyguanosinového aduktu sledovatelný až po 5 hodinách a při pH 8,4 k němu nedošlo vůbec. Naopak v prostředí 3 M NaOH se připravený adukt téměř zcela rozpadl již po 80ti minutové inkubaci (eluovaný při HPLC retenčním časem 42 min) (Obr. 34). Zjištěné výsledky prokazují nestabilitu syntetizovaného aduktu, napovídají, že se nejpravděpodobněji jedná o 8-(N-2-methoxyfenylamin)-deoxyguanosin (Obr 32C)



Obr. 34: Stabilita připraveného aduktu v prostředí 3M NaOH v čase: 0 min(1), 80 min (2) a 3h50min (3)

Nicméně pro konečné potvrzení uvedené struktury bude nutné syntetizovaný adukt dále charakterizovat např. pomocí NMR.

Z důvodu přiblížení struktury a vlastností získaného aduktu byla také sledována stabilita připraveného aduktu za zvýšené teploty. Docházelo k jeho částečnému rozkladu až na guanin již při 30°C.

9 Diskuse

V rámci předkládané diplomové práce jsme se zabývali detailnějším poznáním metabolismu *o*-anisidinu, který se za účasti cytochromů P450 přeměňuje na N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin.¹⁵⁶ Enzymovým, ale zřejmě i spontánním rozpadem N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu vznikají dva metabolity označené jako M1 a M2. *o*-Anisidin i N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin se přeměňují na totožné metabolity M1 a M2, které byly izolovány v maximálním množství pro potřeby hmotnostní analýzy. Dále byly optimalizovány podmínky co se týče doby inkubace a koncentrace jednotlivých složek v inkubované směsi.

Při dalších studiích metabolismu *o*-anisidinu bylo zjištěno, že na vznik různého množství metabolitu M1 a M2 má zásadní vliv nejen doba inkubace reakční směsi, ale také teplota. Při sledování tvorby metabolitů M1 a M2 v závislosti na době inkubace jsme zaznamenali změnu poměru vznikajících metabolitů. Doba inkubace 30 minut poskytla větší množství metabolitu M1 a méně metabolitu M2, ale s časem se tento poměr obrátil ve prospěch M2. Vysvětlení tohoto zjištění by mohla být přeměna metabolitu M1 na metabolit M2. K uvedené interkonverzi metabolitů dochází i při laboratorní teplotě po ukončení reakce. To může vypovídat o spontánním charakteru přeměny M1 na metabolit M2. Naproti tomu při teplotě 0 °C po zastavení reakce ke změně poměrů námi sledovaných metabolitů nedošlo.

Pokud shrneme získané poznatky o metabolismu *o*-anisidinu, můžeme říci, že *o*-anisidin je tedy enzymově oxidován na majoritní metabolit N-(2-methoxyfenyl)hydroxylamin, který se buď enzymově nebo částečně spontánně přeměňuje za vzniku metabolitů M1 a M2. Metabolit M1 se může poté spontánně přeměňovat na metabolit M2.

Pomocí hmotnostní spektrometrie se podařilo identifikovat molekulovou hmotnost metabolitu M1, a to 122,8. Tato hmotnost odpovídá pravděpodobně karbeniovému či nitréniovému iontu (Obr. 25) vznikajícímu z N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu.

Dále byla studována skutečnost, zda námi sledovaný kancerogen, *o*-anisidin, tvoří s DNA adukty. Pomocí metody „³²P-postlabeling“ s použitím obohacující metody s nukleasou P1 bylo potvrzeno, že podání *o*-anisidinu vyvolalo u laboratorního potkana kmene Wistar tvorbu aduktů v DNA. Následně bylo zjištěno, že oba tyto adukty jsou totožné s těmi, které vznikají

inkubací N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu s 2'-deoxyguanosin-3'-monofosfátem při pH=7,4.

Vzhledem ke skutečnosti, že reakce N-hydroxylaminů jsou kyselě katalyzované³¹ byla provedena také inkubace N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu s deoxyguanosin-3'-monofosfátem při pH=5. K analýze byla použita standardní metoda „³²P-postlabeling“ a výsledkem bylo objevení dalšího aduktu. Z N-hydroxyarylamínů, včetně N-hydroxyanilinů¹⁷⁸ vznikají majoritně C8 adukty s deoxyguanosinem, které jsou často defosforylovány nukleasou P1. Použitím standardní metody „³²P-postlabeling“ došlo k detekci velkého množství majoritního aduktu v DNA, který je snadno defosforylován nukleasou P1 a znemožňuje detekci při použití tohoto obohacovacího postupu. Podařilo se detekovat 3 adukty v DNA (možné struktury aduktů jsou znázorněny na Obr. 34) Zároveň bylo dokázáno, že *in vitro* vznikají stejné adukty jako *in vivo*.

Další postup se na základě výše uvedených skutečností existence t.j. aduktů v DNA vyvolaných působením *o*-anisidinu a vzniku nitréniového (Obr. 25), či karbeniového iontu z N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu soustředil na přípravu aduktu(ů) tvořených z N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu s deoxyguanosinem.

Nejdříve jsme optimalizovali HPLC metodu pro separaci složek inkubační směsi po reakci deoxyguanosinu s N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminem. Následnými experimenty bylo dokázáno, že vzniká sloučenina, která se nevyskytovala v žádném z kontrolních vzorků. Po optimalizaci inkubace a separace složek reakce pomocí HPLC mohlo být přistoupeno k charakterizaci vzniklého aduktu. Užito bylo měření hmotnostních spekter připraveného aduktu. Relativní molekulová hmotnost získaného aduktu je 388,3. Tato skutečnost sice potvrzuje přítomnost aduktu, ale neurčuje jednoznačně jeho strukturu. Pokud již nyní vyloučíme nejméně pravděpodobnou vazbu N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu na N7 a N1 pozice deoxyguanosinu¹⁸ nabízí se několik dalších možností vazby. Nejpravděpodobněji se jeví možnost vazby nitréniového iontu, vznikajícího z N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu, na C8 deoxyguanosinu (Obr. 32C), k čemuž dochází u této báze v DNA nejčastěji. Tuto skutečnost naznačují i výsledky některých dalších pokusů. Konkrétně výsledky z experimentů sledujících stabilitu izolovaného aduktu v zásaditém prostředí (3 M NaOH). Adukt byl v takovém prostředí nestabilní. Nestabilita aduktů nitréniových iontů vázaných na uhlík C8 guaninu při alkalickém pH je totiž právě pro takové adukty typická.¹⁸⁰ Adukty tvořené z karbeniového iontu z N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu vázaného na N² nebo O⁶

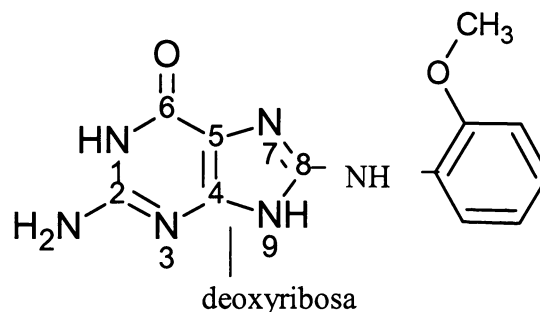
deoxyguanosinu (Obr. 32A,B) jsou naopak v alkalickém prostředí stabilní. Z vlastností aduktů detekovaných pomocí metody „³²P-postlabeling“ jako dva minoritní adukty (adukty 1 a 2, Obr. 27), které byly vůči nuklease P1 rezistentní, vyplývá, že se pravděpodobně jedná právě o takové adukty (Obr. 32 A, B). Nicméně k potvrzení struktury všech těchto aduktů bude nutná ještě další analýza, např. NMR.

10 Souhrn a závěr

Výsledky, kterých bylo dosaženo v předkládané diplomové práci, lze shrnout následovně:

- Pomocí HPLC byly detekovány dva metabolity oxidace *o*-anisidinumikrosomálními cytochromy P450. K bližšímu poznání metabolismu *o*-anisidinu byla sledována i přeměna intermediátu oxidace *o*-anisidinu, N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu. Stabilita obou metabolitů byla sledována v závislosti na čase a teplotě.
- Metabolit M1 byl charakterizován pomocí hmotnostní spektrometrie. Jeho relativní molekulová hmotnost je 129,8, což odpovídá nitréniovému či karbeniovému iontu vzniklému z N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu. Molekulovou hmotnost metabolitu M2 se v rámci diplomové práce nepodařilo charakterizovat.
- Pomocí metody „³²P-postlabeling“ se podařilo ověřit, že inkubací *in vitro* a *in vivo* vznikají stejné adukty.
- Bylo potvrzeno, že dochází k tvorbě třech aduktů v DNA a vznik jednoho z nich výrazně převyšuje nad ostatními.

- Inkubací deoxyguanosinu a N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu byl připraven jeden adukt, který byl charakterizován hmotnostní spektrometrií ($M_r = 388,3$). Stejnou molekulovou hmotnost může mít teoreticky 5 struktur aduktů. Detailnější studie zabývající se vlastnostmi námi připraveného aduktu naznačují, že jde zřejmě o adukt, kde je nitréniový iont, vzniklý z N-(2-methoxyfenyl)hydroxylaminu, navázaný na deoxyguanosin přes C8 uhlík. (Obr. 35)



Obr. 35: 8-(N-2-methoxyfenylamin)deoxyguanosin

Výsledky diplomové práce splnily zadané cíle.

11 Seznam zkratek

Ade	adenin
Ado	adenosin
AMS	accelator mass spectrometry
APCI	atmospheric pressure chemical ionization
AT	<i>ataxia telangiectasia</i> (hematologické malignity, karcinom prsu)
BHT	2,4-Di-tert-butyl-4-methylfenol
BRCA	gen regulující buněčný cyklus
CE	capillary electrophoresis
CE-LIF	capillary electrophoresis-laser induced
CYP	cytochrom P450
Cyt	cytidin
EI	electro ionization
EI-MS	electron ionization-mass spectrometry
ELISA	imunochemické stanovení
ESI	electrospray ionization
FAB	fast atom bombardement
FAP	familiární adenomatózní polypóza (familial adenomatous polyposis)
GC	plynová chromatografie
GST	glutathion S-transferasa
Gua	guanin
Guo	guanosin
HNPCC	nepolypózní nádor tlustého střeva (hereditary polyposis colon cancer)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IARC	International Agency for Research on Cancer
IDHRMS	isotope dilution high resolution mass spectrometry
IDMS	isotope dilution mass spectrometry
LC	kapalinová chromatografie
LD₅₀	smrtebná dávka právě pro polovinu jedinců v souboru
MALDI	matrix-assited laser desorption
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfát redukováný
NAT	N-acetyltransferasa
PAGE	polyacrylamid gel electrophoresis
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PEI	polyethylenimin
PGE	phenyl glycidyl ether

Q-TOF-MS	quadrupole-time-of-flight mass spectrometry
Rb	gen regulující buněčný cyklus (antionkogen)
RIA	radio imuno assay (imunochemické stanovení)
TEMPO	2,2,6,6-tetramethyl-1-piperidinyloxy
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TSI	thermospray ionization
Urd	uridin
UV spektroskopie	spektroskopie v ultrafialové oblasti záření
VTR	variable tandem repeat
XP	<i>Xeroderma pigmentosum</i>

12 Seznam použité literatury

1. Doll R.: *Carcinogenesis* 17,177 (1996)
2. Dale C.M., Garner R.C.: *Food and Chemical Toxicology* 34, 905 (1996)
3. Perera F.P.: *Science* 278,1068 (1997)
4. *Cancer Facts and Figures* :American Cancer Society, Atlanta, GA, (1997)
5. Perera F.P., *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 496 (1996)
6. Einstein I.B.: *J. Chron. Dis.*35,581 (1982)
7. Bartech H. ,Hietanen E.: *Environ. Health Perspect.* 104(suppl. 3), 569 (1996)
8. Greenblatt M. S., Bennett, W. P., Hollstein M., Hartus C.C.: *Cancer Res.* 54, 4855 (1994)
9. Harris C.C.: *Environ. Health Perspect.* 104(suppl. 3), 435 (1996)
10. Tang D.: *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 4, 341 (1995)
11. Li D.: *Cancer Res.* 56, 3638 (1996)
12. Vineis P.: *Nature* 369,154 (1994)
13. Coeptar A.R., Scheerens H., Vermulen N.P.E.: *Crit.Rev.Toxicol* 25, 25 (1995)
14. Perera F.P., Hemminki K., Gryzbowska E., Motykiewicz G., Michalska J., Santella R.M., Young T.L., Dickey C., Brandt-Rauf P., De Vivo I., Blanek W., Tesu W.Y., Chorazy M.: *Nature* 360, 256 (1992)
15. Grzybowska E., Heiminki K., Szeliga J., Chorazy M.: *Carcinogenesis* 12, 2323 (1993)
16. Santella R. M.: *Mutat. Res.* 205, 271 (1988)
17. Van Oelft J.H.M., Baan R.A., Roza L.: *Crit. Rev. Toxicol.* 28,477 (1998)
18. Stiborová M., Rupertová M., Hodek P., Frei E., Schmeiser H.H.: *Collect. Czech.Chem. Commun.* 69, 476 (2004)
19. Liehr J.G.: *Reg. Toxicol. and Pharmacol.* 32, 276 (2000)
20. Farmer P.B., Shuker D.E.G.: *Mutat. Res.* 424, 275 (1999)
21. Ioanides C.: *Cytochromes P450 Metabolic and Toxicological Aspects* (1996) CRC Pres
22. Nebert O. W., Negishi M.: *Biochem. Pharmacol.* 31, 2311 (1982)
23. Beach A.C, Gupta R.C.: *Carcinogenesis* 13, 1053 (1992)
24. Harris C. C.: *Carcinogenesis* 10, 1563 (1989)
25. Voet D. , Voet G.J.:*Biochemie*, Victoria Publishing (1995)
26. Lawley P.D.: *Mutation Research* 23, 283 (1974)
27. Loveless A., *Nature* 223, 206 (1969)
28. Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J, Raff M., Roberts K. Walter P.: *Základy buněčné biologie*, Espero Publishing (1998)
29. Stiborová M., Mikšanová M.: *Živa* 4/1999,146
30. Andrews CH.L., Vouros P., Harsch A.: *Journal of Chromatography A* 856, 515 (1999)
31. Hemminki K, Dipple A., Shuker D. E. G., Kadlubar F. F., Segerback D., Bartsch H.: *DNA Adducts: Identification and Biological Significance*. IARC Scientific Publications No. 125,IARC, Lyon (1994)
32. Poirier M. C., Santella R. M., Weston A.: *Carcinogenesis* 21, 353 (2000)
33. Stiborová M., Frei E., Bieler C. A., Schmeiser H. H.: *Chem. Listy* 92, 661 (1998)
34. Phillips O. H., Castegnaro M.: *Mutagenesis* 14, 301 (1999)
35. Poirier M. C.: *J. Natl. Cancer Inst.* 67, 515 (1981)
36. Muller R., Rajewsky M. F.: *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 102, 99 (1981)
37. Strickland P. T., Boyle J. M.: *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 31, 1 (1984)
38. Poirier M. C.: *Mutat. Res.* 288, 31 (1993)

39. Santella R. M.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 216, 166 (1997)
40. Weston A.: Mutat. Res. 288, 19 (1993)
41. Li M., Hurtubise R. J., Weston A.: Anal. Chem. 71, 4679 (1999)
42. Phillips O. H.: Mutat. Res. 378, 1 (1997)
43. Randerath K, Reddy M. V., Gupta R. C.: Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 6128 (1981)
44. Yamamoto Y., Ames B. N.: Free Radical Biol. Med. 3, 359 (1987)
45. Vasquez H., Seifert W., Strobel H.: J. Chromatogr. B: Biomed. Appl. 759, 185 (2001)
46. Marnett L. J., Burcham P. C.: Chem. Res. Toxicol. 6, 771 (1993)
47. Hecht S. S., Carmella S. G., Foiles P. G., Murphy S. E.: Cancer Res. 54, 1912 (1994)
48. Vogel J. S., Turteltaub K.W., Finkel R., Nelson O. E.: Anal. Chem. A 67, 353 (1995)
49. Oingley K.H., Curtis K.O., Nowell S., Felton J.S., Lang N.P., Tureltaub K.W.: Cancer Epidemiol Biomarkers Prevent. 8, 507 (1999)
50. Koc H., Swenberg J.A.: J. Chromatogr., B: Biomed. Appl. 778, 323 (2002)
51. Tretyakova N., Matter B., Jones R., Shallop A.: Biochemistry 41, 9535 (2002)
52. De Kok T. M. C. M., Moonen H. J. J., Van Oelft J., Van Schooten F.: J. Chromatogr., B: Biomed. Appl. 778, 345 (2002)
53. Hellman B., Vaghef H., Bostram B.: Mutat. Res. 336, 123 (1995)
54. Hellman B., Vaghef H., Friis L., Edling C.: Int. Arch. Occup. Environ. Health 69, 185 (1997)
55. Vaghef H., Wisén A. C., Hellman B.: Pharmacol. Toxicol. 78, 37 (1996)
56. Vaghef H., Nygren P., Edling c., Bergh J., Hellman B.: Mutat. Res. 395, 127 (1997)
57. Vaghef H., Hellman B.: Pharmacol. Toxicol. 83, 69 (1998)
58. Abt G., Vaghef H., Gebhart E., Oahlgren C.V., Hellman B.: Mutat. Res. 384, 55 (1997)
59. Yamazoe Y., Miller O.W., Weis CC, Ooley K.L., Zemer T.V., Beland F. A., Kadlubar F.F.: J Carcinogenesis 6, 1379 (1985)
60. Yamazoe Y., Zenser T. V., Miller O. W., Kadlubar F. F.: Carcinogenesis 9, 1635 (1988)
61. Pfau W., Schmeiser H.H., Wiessler M.: Carcinogenesis 11, 313 (1990)
62. Pfau W., Schmeiser H.H., Wiessler M.: Chem. Res. Toxicol. 4, 581 (1991)
63. Phillips O.H., Hewer A., White J.N.H., Farmer P.B.: Carcinogenesis 15, 793 (1994)
64. Stiborová M., Fernando R.C., Schmeiser H.H., Frei E., Pfau W., Wiessler M.: Carcinogenesis 15, 1187 (1994)
65. Zeisig M., Maller L.: Carcinogenesis 16, 1 (1995)
66. Mourato L.L.G., Beland F.A., Marques M.M.: Chem. Res. Toxicol. 12, 661 (1999)
67. Shibutani S., Suzuki N., Terashima 1., Sugarman S.M., Grollman A.P., Pearl M.L.: Chem. Res. Toxicol. 12, 646 (1999)
68. Shibutani S., Ravindernath A., Suzuki N., Terashima 1., Sugarman S. M., Grollman A.P., Pearl M.L.: Carcinogenesis 21, 1461 (2000)
69. Turesky R.J.: Drug Metab. Rev. 34, 625 (2002)
70. Santella R.M.: Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev. 8, 733-739 (1999)
71. Santella R.M., Gammon M., Terry M.B., Senie R., Shen J., Kennedy D., Agrawal M., Faraglia B., Zhang F.F.: Mutation Research (2005) in press
72. Saffhill R., Strickland P.T., Boyle J.M., Carcinogenesis 3, 547 (1982)
73. Wild C.P., Smart G., Saffhill R., Boyle J.M.: Carcinogenesis 4, 1605 (1983)
74. Lee X.C., Xing J.Z, Lee J., Leadon S.A., Weinfeld M.: Science 280, 1066 (1998)
75. Jankowiak R, Cooper R.S., Zamzow D., Small G.J., Doskocil G., Jeffry A.M.: Internationla Agency for Research on Cancer, Lyon 372-377 (1988)
76. Dizdaroglu M., Jaruga P., Rodriguez H.: Nucleic Acids Res. 29, E12 (2001)
77. Ravant J.L., Duret B., Guiller A., Douki T., Cadet J.: J.Chromatography B 715, 349 (1998)
78. Norwood O.: Anal. Biochem. 272, 100 (1999)

79. Lijinsky W., Loo J., Ross A.E.: *Nature* 218, 1174 (1968)
80. Schuker D.E.G., Bailey E., Gorf S.M., Lamb J., Farmer P.B.: *Anal Biochem* 140, 270 (1984)
81. Farmer P.B., Schuker D.E.G., Bird I.: *Carcinogenesis* 7, 49 (1986)
82. Bonfanti M., Magagnotti C., Galli A., Bagnati R., Moret M., Gariboldi P., Fanelli R., Airoidi L.: *Cancer Res.* 50, 6870 (1990)
83. Yates J.M., Summer S.C.J., Turner M.J., Recio L., Fennell T.R.: *Carcinogenesis* 14, 1363 (1993)
84. Yates J.M., Fennell T.R., Turner M.J., Recio L., Summer S.C.J.: *Carcinogenesis* 15, 277 (1994)
85. Anam R.S, Giese R.W., Vouros P.: *Anal.Biochem.* 191, 86 (1990)
86. Meersman J.H.N., Smith T.R., Pearson P.G., Meier G.P., Nelson S.D.: *Cancer Res.* 49, 6174 (1989)
87. Lemier F, Esmans E.L., Van Dongen W., Van Den Eeckhout E., Van Onckelen H.: *J.Chromatography* 647, 211 (1993)
88. Karas M., Buchman D., Hillenkamp F.: *Anal. Chem.* 57, 2935 (1985)
89. Karas M., Buchman D., Bahr U., Hillenkamp F.: *Int. J. Mass Spectrom., Ion. Proc.* 78, 53 (1987)
90. Karas M, Hillenkamp F.: *Anal. Chem.* 60, 2299 (1988)
91. Yamashita M, Fenn J.B.: *J.Chem.Phys.* 80 (1984)
92. Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F., Whitehouse C.M.: *Science* 246, 64 (1989)
93. J.Preisler J., F.Foret F, B.L.Karger B.L.: *Anal.Chem.* 70 (1998) 5278-5287
94. Chaudhary A.K., Nokubo M., Oglesby T.D., Marnett L.J., Blair I.A.: *J.mass Spectrom.* 30, 1157 (1995)
95. Morinello E., Ranasinghe A., Koc H., Swenberg J.A.: *Cancer Res.* (2002)
96. Doerge D.R., Yi P., Churchwell M.I., Preece S.W., Langridge J., Fu P.P.: *Rapid Commun.Mass Spectrom.* 12, 1665 (1998)
97. Gupta R. C., Reddy M. V., Randerath K: *Carcinogenesis* 3, 1081 (1982)
98. Reddy M. V., Gupta R.C., Randerath K: *Anal. Biochem.* 117, 271 (1981)
99. Reichert W. L., Stein J. E., French B., Goodwin P., Vanarasi D.: *Carcinogenesis* 13, 1475 (1992)
100. Chang I. W., Hsia S. M. T., Chan P. C, Hsieh L. L.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 34, 41 (1994)
101. Reddy M. V., Randerath K: *Carcinogenesis* 7, 1543 (1986)
102. Goncalves L. L., Beland F. A., Marques M. M.: *Chem. Res. Toxicol.* 14, 165 (2001)
103. Gupta R. C.: *Cancer Res.* 45, 5656 (1985)
104. Randerath K, Gupta R.C., Van Colen K.L.: *Carcinogenesis* 14, 1523 (1993)
105. Pfau W., Brocksteadt U., Sahren K.O., Marquardt H.: *Carcinogenesis* 15, 877 (1994)
106. Dietrich M.W., Hopkins W.E., Asbury K.J., Ridley W.P.: *Chromatographia* 24, 545 (1987)
107. Stach O., Schmitz O.J., Stilgenbauer S., Benner A., Dohner H., Wiessler M., Lyko F.: *Nucleic Acids Res.* 31, E2-2 (2003)
108. Reddy M.V., Bleicher T., Blackburn G.R., Mackerer E.R.: *Carcinogenesis* 11, 1349 (1990)
109. Stiborová M., Asfaw B., Frei E., Schmeiser H.H., Wiessler M.: *Chem. Res. Toxicol.* 8, 489 (1995)
110. Nair J., Barbin A., Guichard Y., Bartsch H.: *Carcinogenesis* 16, 613 (1995)
111. Vodička P., Hemminki K: *Chem.-Biol. Interact.* 77, 39 (1991)

112. Stiborová M., Martínek V., Rýdlová H., Hodek P., Frei E.: *Cancer Res.* 62, 5678 (2002)
113. Vodička P., Vodičková L., Hemminki K: *Carcinogenesis* 14, 2059 (1993)
114. Fang J. L., Vaca C. E.: *Carcinogenesis* 18, 627 (1997)
115. Koivisto P., Sorsa M., Pacchierotti F., Peltonen K: *Carcinogenesis* 18, 439 (1997)
116. Kumar R., Vodička P., Peltonen K, Hemminki K: *Carcinogenesis* 18, 407 (1997)
117. Keith G., Oirheimer G.: *Curr. Opin. Biotechnol.* 6, 3 (1995)
118. Stiborová M., Frei E., Schmeiser H. H., Wiessler M.: *Carcinogenesis* 13, 1221 (1992)
119. Stiborová M., Frei E., Schmeiser H.H., Wiessler M., Hradec J.: *Carcinogenesis* 13, 1657 (1992)
120. Stiborová M., Mikšanová M., Havlíček V., Schmeiser H.H., Frei E.: *Mutat. Res.* 500, 49 (2002)
121. Fukutome K, Ochiai M., Wakabayashi K, Watanabe S., Sugimura T., Nagao M.: *Jpn. J. Cancer Res.* 85, 113 (1994)
122. Reddy M.V.: *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 32, 256 (2000)
123. Peluso M., Ceppi M., Munnia A., Puntoni R., Parodi S.: *Am. J. Epidemiol.* 153, 546 (2001)
124. Besaratinia A., Maas L. M., Brouwer E.M.C., Moonen E.J.C., De Kok T. M. C. M., Wesseling G. J., Loft S., Kleinjans J. C. S., Van Schooten F. J.: *Carcinogenesis* 23, 1171 (2002)
125. Hemminki K., Rajaniemi H., Lindahl B., Moberger B.: *Cancer Res.* 56, 4375 (1996)
126. Phillips D.H.: *Carcinogenesis* 22, 839 (2001)
127. Perera F. P., Vineis P.: *Int. J. Cancer* 92, 926 (2001)
128. Schmeiser H.H., Bieler C.A., Wiessler M., De Strihou C.V., Cosyns J.P.: *Cancer Res.* 56, 2025 (1996)
129. Bieler C.A., Stiborová M., Wiessler M., Cosyns J. P., De Strihou C.V., Schmeiser H.H.: *Carcinogenesis* 18, 1063 (1997)
130. Arlt V.M., Ferluga O., Stiborová M., Pfohl-Leskowicz A., Vukelic M., Ceovic S., Schmeiser H.H., Cosyns J.P.: *Int. J. Cancer* 101, 500 (2000)
131. Randerath K, Randerath E.: *Drug Metab. Rev.* 26, 67 (1994)
132. Terashima L., Suzuki N., Shibutani S.: *Chem. Res. Toxicol.* 15, 305 (2002)
133. Pfau W., Brockstedt U., Schulze C., Neurath G., Marquardt H.: *Carcinogenesis* 17, 2727 (1996)
134. Gamer R.C.: *Mutat. Res.* 402, 67. (1998)
135. Gupta R. C., Van Colen K.L., Putman K.L., Randerath K.: *Carcinogenesis* 14, 1517 (1993)
136. Arit V.M., Pfohl-Leszkowicz A., Cosyns J.P., Schmeiser H.H.: *Mutat. Res.* 494, 143 (2001)
137. Stiborová M., Šimánek V., Frei E., Hobza P., Ulrichová J.: *Chem.-Biol. Interact.* 140, 231 (2002)
138. Yang Y.C, Van J., Churchwell M., Beger R., Chan P.C, Doerge D.R., Fu P.P., Chou M. W.: *Chem. Res. Toxicol.* 14, 91 (2001)
139. Randerath K, Puttman K.L., Randerath E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 61 (1993)
140. Munnia A., Puntoni R., Merlo F., Parodi S., Peluso M.: *Environ. Mol. Mutagen.* 34, 52 (1999)
141. Stiborová M., Bieler C.A., Wiessler M., Frei E.: *Biochem. Pharmacol.* 62, 1675 (2001)
142. Stiborová M., Frei E., Wiessler M., Schmeiser H.H.: *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1128 (2001)

143. Farsti A., Staffas J., Hemminki K: *Carcinogenesis* 15, 2829 (1994)
144. Purewal M., Liehr J. G.: *Cancer Chemother. Pharmacol.* 33, 239 (1993)
145. Topinka J., Andrae L.L., Schwarz L.R., Wolff T.: *Carcinogenesis* 14, 423 (1993)
146. Stiborová M., Stiborová-Rupertová M., Bořek-Dohalská L., Wiessler M., Frei E.: *Chem. Res. Toxicol.* 16, 37 (2003)
147. Lévy G., Ross U., Bodell W. J.: *Carcinogenesis* 14, 2329 (1993)
148. Pathak D.N., Roy D.: *Mutat. Res.* 286, 309 (1993)
149. <http://www.chemicaland21.com/arokorhi/specialtychem/o-ANISIDINE.htm>
150. NTP technical report. Bioassay of o-anisidine hydrochloride for possible carcinogenicity. Bethesda, MD: National Cancer Institute (1978)
151. IARC, Ortho- and para-anisidine and their hydrochlorides, Lyon: IARC (1982)
152. IARC Monograph, Suppl. 7, 57 (1987)
153. Ashby L., Short J.M., Jones N.J., Leferve P.A., Provost G.S., Rogers B.J., Martin E.A., Parry J.M., Burnette K., Glickmann B.W., Tinwell H.: *Carcinogenesis* 15, 2291 (1994)
154. http://hazmap.nlm.nih.gov/cgi-bin/hazmap_generic?tbl=TblAgents&id=297
155. <http://www.aavet.cz/main.php?page=clanek&id=163>
156. Kejková L.: diplomová práce PřF UK (2005)
157. Stabbert R., Schäfer K.H., Biefel C., Rustemeier K.: *Rapid Commun Mass Spectrom.* 17, 2125 (2003)
158. Weiss T., Agerer J.: *J.Chromatogr. B* 778, 179 (2003)
159. Faltner B., Kutzer C., Richter E.: *Clin Invest* 72, 364 (1994)
160. Branner B., Kutzer C., Zwickenpflug W., Scherer G., Heller W.D., Richter E.: *Biomarkers* 3, 35 (1998)
161. Richter E, Rosler S, Scherer G., Gostomzyk J.G., Grubl A., Kramer U., Behrendt H.: *Int.Arch.Occup.Environ.Health* 74, 421 (2001)
162. Hauthal H.G.: *Nachr.Chem.Tech.Lab.* 41, 440 (1993)
163. Traupe H., Menge G., Kandt J., Karmaus W.: *Dermatology* 195, 112 (1997)
164. Dunkel V.C., Zeiger E., Brusick D., McCoy D., McGregor D., Mortelmans K., Rosenkantz H.S., Simmon V.F.: *Environ.Mutagen.* 7(suppl 5), 24 (1985)
165. Ashby J, Tennant K.W.: *Mutat.Res.* 204, 17 (1988)
166. Thompson D.C., Eling T.E.: *Chem. Res.Toxicol.* 4, 474 (1991)
167. Thompson D.C., Josephy P.D., Chu J.W.K., Eling T.E.: *Mutat.Res.* 279, 83 (1992)
168. Ashby L., Leferve P.A., Tinwell H., Brunborg G., Schmezer P., Pool-Zobel B., Shanu-Wilson R., Holme J.A., Soderlund E.J., Gulati D., Wojciechowski J.P.: *Mutat. Res.* 250, 115 (1991)
169. Morita T., Asano N., Awogi T., Sasaki Y.F., Sato S.I., Shimada H., Sutou S., Suzuki T., Wakata A., Sofuni T., Hayashi M.: *Mutat. Res.* 389, 3 (1997)
170. Galloway S.M., Armstrong M.J., Reuben C., Colman S., Brown B., Cannon C., Blom A:D., Nakamura F., Ahmed M., Duk S., Rimpo J., Margolin B.H.: *Environ. Mol. Mutagen.* 10, (Suppl. 10), 1 (1987)
171. Wangenheim J., Bolcsfold G.: *Mutagenesis* 3, 193 (1998)
172. Brennan, R.J., Shiestl, R.H.: *Mutat. Res.* 430, 37 (1999)
173. Sasaki Y.F., Nishidate E., Su Y.Q., Matsusaka N., Tsuda S., Susa N., Furukawa Y., Ueno S.: *Mutat. Res.* 412, 155 (1998)
174. Moulisová V.: Diplomová práce, PřF UK (2001).
175. Stiborová M, Mikšanová M., Šulc M., Rýdlová H., Schmeiser H.H., Frei E.: *Int.J.Cancer* 116, 667 (2005)
176. Stiborová M., Mikšanová M., Havlíček V., Schmeiser H.H., Frei E.: *Mutat Res.* 500(1-2) 49 (2002)

177. Mikšanová M.: Diplomová práce, PřF UK, Praha (1999)
178. Marques M.M., Mourato L.L.G., Amorim M.T., Santos M.A., Melchior W.B., Beland F.A.: Chem. Res. Toxicol. 10, 1266 (1997)
179. Stiborová M.: Chem.listy 96 784 (2002)
180. Kadlubar F.F.: IARC Sci Publ. 125 199 (1994)

