

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE



**Studium metabolismu
karcinogenních nitroaromátů
(3-nitrobenzanthronu a 2-nitroanisolu)**

Diplomová práce

Martina Svobodová

Školitelka: Doc. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2006

Přírodovědecká fakulta UK

KNIHOVNA CHEMIE



3233217252

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod odborným vedením školitelky Doc. RNDr. Marie Stiborové, DrSc. a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 7.dubna 2006

Martina Svobodová
.....

Martina Svobodová

Ráda bych poděkovala své školitelce Doc. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání zajímavého tématu, odborné vedení, všestrannou pomoc a laskavý přístup, které mi při vypracování práce poskytla.

Doc. Ing. Stanislavu Smrčkovi, CSc. děkuji za pomoc při syntéze 2,5-dihydroxynitrobenzenu a RNDr. Heleně Dračínské, Ph.D. za odborné rady a trpělivost.

Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu laboratoře za potřebné rady, pomoc a příjemné pracovní prostředí.

OBSAH

OBSAH.....	4
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	7
1 ÚVOD.....	10
1.1 Kancerogenese	10
1.1.1 <i>Nádorová onemocnění</i>	11
1.1.2 <i>Mechanismus kancerogenese</i>	11
1.1.3 <i>Faktory kancerogenese</i>	13
1.2 Biotransformace xenobiotik	13
1.2.1 <i>První fáze biotransformace</i>	14
1.2.2 <i>Druhá fáze biotransformace</i>	15
1.3 Mikrosomální monooxygenasový systém (MFO)	17
1.3.1 <i>NADPH:Cytochrom P450 reduktasa</i>	18
1.3.2 <i>Cytochrom P450</i>	21
1.3.2.1 <i>Cytochrom P450 a jeho spinové formy</i>	22
1.3.2.2 <i>Enzymové funkce cytochromu P450</i>	23
1.3.2.3 <i>Reakční mechanismus monooxygenasové reakce</i>	24
1.3.2.4 <i>Názvosloví cytochromu P450</i>	26
1.3.2.5 <i>Substrátová specifita cytochromu P450</i>	27
1.4 Cytoplasmatické enzymy katalyzující redukční reakce xenobiotik.....	28
1.4.1 <i>DT-diaforasa</i>	28
1.4.1.1 <i>Indukce DT-diaforasy</i>	30
1.4.1.2 <i>Lidská isoforma DT-diaforasy</i>	30
1.4.1.3 <i>Potkaní isoforma DT-diaforasy</i>	31
1.4.2 <i>Xanthinoxidasa</i>	31
1.5 Aromatické nitrosloučeniny	32
1.5.1 <i>Nitroaromáty a jejich vliv na lidské zdraví</i>	33
1.5.1.1 <i>3-nitrobenzanthron</i>	34
1.5.1.2 <i>2-nitroanisol</i>	36
2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE.....	39
3 MATERIÁL A METODY	40
3.1 Materiál	40

3.2	Přístroje	41
3.3	Metody	43
3.3.1	<i>Isolace mikrosomální frakce jater králíka a potkana</i>	43
3.3.2	<i>Stanovení koncentrace cytochromu P450.....</i>	44
3.3.3	<i>Stanovení koncentrace proteinu ^[61]</i>	44
3.3.4	<i>Studium metabolismu 3-NBA lidskou rekombinantní DT-diaforasou.....</i>	45
3.3.4.1	Příprava standardních roztoků 3-NBA a 3-ABA pro HPLC.....	46
3.3.4.2	Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	46
3.3.5	<i>Studium vlivu lidského sérového albuminu na metabolismus 3-NBA lidskou rekombinantní DT-diaforasou.....</i>	47
3.3.6	<i>Studium metabolismu 3-NBA mikrosomy jater potkanů premedikovaných fenobarbitalem, β-naftoflavonem a nepremedikovaných zvířat</i>	48
3.3.7	<i>Studium vazby 3-NBA aktivovaného lidskou DT-diaforasou na proteiny....</i>	48
3.3.8	<i>Příprava 2,5-dihydroxynitrobenzenu.....</i>	49
3.3.9	<i>Určení metabolitu 2-nitroanisolu tvořeného jaterními mikrosomy králíka .</i>	50
4	VÝSLEDKY	52
4.1	Metabolismus 3-NBA lidskou rekombinantní DT-diaforasou.....	52
4.1.1	<i>HPLC 3-NBA a 3-ABA.....</i>	52
4.1.2	<i>Redukce 3-NBA lidskou rekombinantní DT-diaforasou.....</i>	53
4.1.3	<i>Závislost přeměny 3-NBA na koncentraci DT-diaforasy.....</i>	54
4.1.4	<i>Závislost přeměny 3-NBA na době inkubace s DT-diaforasou</i>	56
4.1.5	<i>Závislost přeměny 3-NBA DT-diaforasou na koncentraci 3-NBA</i>	57
4.1.6	<i>Závislost přeměny 3-NBA DT-diaforasou na pH.....</i>	59
4.2	Studium vlivu doby inkubace (60 - 180 minut) na redukci 3-NBA lidskou rekombinantní DT-diaforasou.....	60
4.2.1	<i>Studium vazby 3-NBA aktivovaného lidskou DT-diaforasou na proteiny....</i>	63
4.3	Metabolismus 3-NBA jaterními mikrosomy potkana.....	64
4.3.1	<i>Závislost přeměny 3-NBA na době inkubace s mikrosomy jater potkanů premedikovaných fenobarbitalem, β-naftoflavonem a potkanů nepremedikovaných.....</i>	65
4.3.1.1	Studium vazby 3-NBA aktivovaného jaterním enzymovým systémem potkana.....	67
4.4	Určení metabolitu karcinogenního 2-nitroanisolu tvořeného jaterními mikrosomy králíka	69
4.4.1	<i>Příprava 2,5-dihydroxynitrobenzenu.....</i>	69
4.4.2	<i>Analýza 2-nitroanisolu, 2-nitrofenolu, 2,5-dihydroxynitrobenzenu a 2,6-dihydroxynitrobenzenu pomocí HPLC.....</i>	70
5	DISKUSE	74

6	ZÁVĚR.....	79
7	SEZNAM LITERATURY	81

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AA	aristolochové kyseliny
A₄₅₀ (490, 550)	absorbance při vlnové délce 450 (490, 550) nm
3-ABA	3-aminobenzanthron
ACTH	adrenokortikotropní hormon
Ah receptor	receptor pro aromatické uhlovodíky („Aromatic hydrocarbon“)
β-NF	β-naftoflavon
BHA	butylovaný hydroxyanisol
BHT	butylovaný hydroxytoluen
BSA	hovězí sérový albumin
c_b (P450)	koncentrace bílkoviny (cytochromu P450)
c_{BSA}	koncentrace hovězího sérového albuminu (BSA)
CDP	cytidindifosfát
CYP	cytochrom P450
CYP2	rodina cytochromu P450
CYP2B	podrodina cytochromu P450
CYP2B4	konkrétní isoforma cytochromu P450
Da	dalton
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EC	číselný kód enzymu
ε	molární absorpční koeficient
ER	estrogenový receptor
FAD	flavinadeninukleotid (chinoidní forma)
FADH	flavinadeninukleotid (semichinoidní radikál)
FADH₂	flavinadeninukleotid (hydrochinon)
FAFNT	A-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamid

FMN	flavinadeninmononukleotid (chinoidní forma)
FMNH	flavinadeninmononukleotid (semichinoidní radikál)
FMNH₂	flavinadeninmononukleotid (hydrochinon)
GIT	gastrointestinální trakt
HSA	lidský sérový albumin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IARC	Mezinárodní institut pro výzkum rakoviny (International Institute for Research on Cancer)
kDa	kilodalton
K_m	Michaelisova konstanta
KO	kontrolní mikrosomy (mikrosomy izolované z jater nepremedikovaných zvířat)
λ	vlnová délka
M (mM)	mol.dm ⁻³ (mmol.dm ⁻³)
MFO	systém monooxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxygenases)
mRNA	informační ribonukleová kyselina (messenger ribonucleic acid)
MS	mikrosomy
3-NBA	3-nitrobenzanthron
NADH	nikotinamidadenindinukleotid, redukováná forma
NADP⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát, oxidovaná forma
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát, redukováná forma
NADPH g.s.	NADPH – generující systém
NAT	N-acetyltransferasa
nm	nanometr
N-OH-ABA	N-hydroxy-3-aminobenzanthron
NQO1	NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa
<i>NQO1</i>	označení genu NAD(P)H:chinonoxidoreduktasy
P 1 (2, 3)	pufr číslo 1 (2, 3)
PAPS	3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát
PAU	polycyklické aromatické uhlovodíky
PB	fenobarbital

P450	pigment s maximem absorpance při 450 nm (cytochrom P450)
RNA	ribonukleová kyselina
RPM	počet otáček za minutu
SULT	sulfotransferasa
T₃	trijodtyronin
TRE	element pro thyroidální hormony
TRIS	tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	standardní jednotka enzymové aktivity (1U = 1 mol substrátu přeměněný enzymem za 1 minutu)
UDP	uridindifosfát
UV záření	ultrafialové záření
v/v	objemový zlomek
w/v	hmotnost/objem

1 ÚVOD

Rakovina je jedním z nejrozšířenějších onemocnění. V současné době je tato civilizační choroba třetí nejčastější příčinou úmrtí hned po kardiovaskulárních chorobách a úmrtích způsobených úrazu při automobilových nehodách. Její výskyt neustále stoupá a postihuje stále mladší věkové skupiny. Je to dáno zejména odlišným životním stylem, výživou (přidává se stále více aditiv pro prodloužení trvanlivosti potravin), stresem, toxickými a karcinogenními kontaminanty životního prostředí. To vše má za následek tvorbu vyššího počtu iniciovaných nádorových buněk. Imunitní systém oslabený polutanty a stresem pak nemůže na vzniklou situaci dostatečným způsobem reagovat^[94].

Léčba nádorových onemocnění je komplikována zejména skutečností, že léčbou potřebujeme zcela zničit buňky nikoli cizorodé, jak je tomu například u bakteriálních infekcí, ale tělu vlastní. Nádorové buňky se sice více či méně liší od normálních buněk, ze kterých vznikly, a proto by teoreticky měly být rozpoznány imunitními mechanismy a eliminovány, ale odlišnosti od normálních buněk jsou buď příliš malé, takže jsou imunitním systémem ignorovány, nebo nádorové buňky využívají mechanismy, které jim umožňují paralyzovat některé „zbraně“ imunitního systému^[42].

1.1 KANCEROGENESE

Kancerogene (někdy také karcinogene) je proces transformace nenádorové buňky v buňku nádorovou, následné dělení buněčného klonu, včetně další dediferenciace a zvyšování maligního potenciálu dělících se buněk^[115]. V nádorové buňce je oproti normální somatické buňce geneticky podmíněnou změnou narušen regulační mechanismus jejího dělení a diferenciaci. Vzniká v důsledku změny v protoonkogenech a nádory tlumících supresorových genech^[111]. Jako **nádor** (tumor, novotvar, neoplasma) je obecně označován patologický útvar tvořený tkání, jejíž růst se vymkl kontrole organismu a roste na něm nezávisle^[115].

1.1.1 NÁDOROVÁ ONEMOCNĚNÍ

Nádory dělíme dle schopnosti nádoru proniknout do jiné tkáně a proliferovat v ní za tvorby nového nádoru na **benigní** a **maligní** (Tabulka 1). Benigní (nezhoubný) nádor vykazuje poměrně ohraničený růst expanzivního charakteru. Je snadno odstranitelný chirurgicky a neproniká do jiných tkání. Maligní (zhoubný) nádor proniká do tkání, rozrušuje je (infiltrativní a destruktivní růst) a zakládá metastasy (lymfatickou nebo krevní cestou)^[104].

Tabulka 1 Klasifikace nádorů^[15, 118]

<i>Normální tkáň</i>		<i>Benigní nádor</i>	<i>Maligní nádor</i>
<i>Epitel</i>	Povrchový	Papilom	Karcinom
	Žlázový	Adenom	Adenokarcinom
<i>Pojivo</i>	Kolagenní	Fibrom	Fibrosarkom
	Tukové	Lipom	Liposarkom
	Chrupavka	Chondrom	Chondrosarkom
	Kost	Osteom	Osteosarkom
	Sval	Myom	Myosarkom
	Cévy	Angiom	Angiosarkom
<i>Jaterní tkáň</i>		Hepatom	Hepatoceleulární karcinom
<i>Nervstvo</i>	Centrální	Gliom	Glioblastom
	Periferní	Ganglioneurom	Neuroblastom

1.1.2 MECHANISMUS KANCEROGENESE

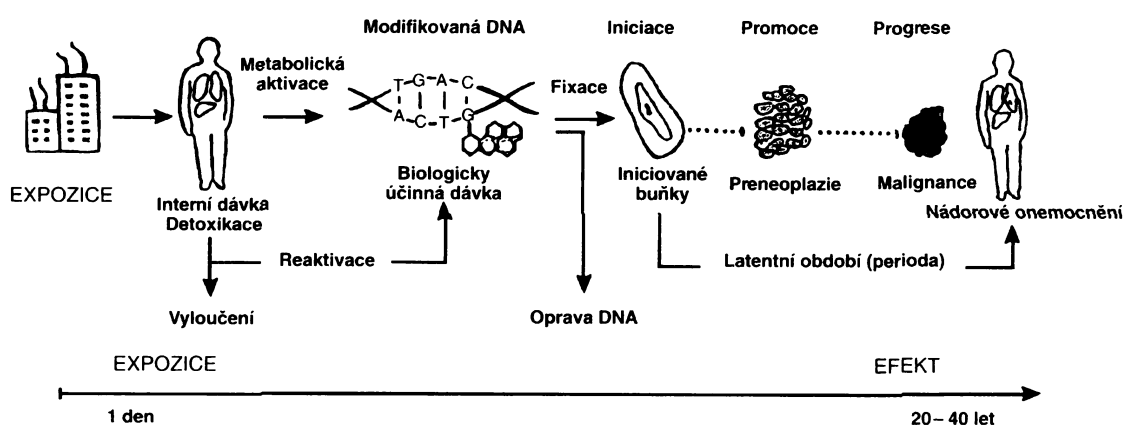
Proces kancerogeneze můžeme rozdělit do tří fází: iniciační, promoční a progresní (Obr. 1).

V **iniciační fázi** dochází ke změně genetické informace zdravé buňky, což vede

k tvorbě prekarcinogenní léze. Ta je způsobena především modifikací DNA (tvorbou kovalentních aduktů, hydroxyderivátů bází DNA, cyklických aduktů, interkalátů či pyrimidinových dimerů, apurinací a apyrimidinací DNA)^[93]. Tato modifikace může přetrvávat řadu let bez funkčních důsledků nebo může být odstraněna reparačními mechanismy. Nejzávažnější je však tvorba kovalentních aduktů, protože u více než 90 % sloučenin prokázaných jako karcinogeny jsou nádorové procesy iniciovány právě kovalentními vazbami na DNA^[94].

Druhé stadium kancerogeneze je **promoce**, která může trvat léta až desetiletí. Dochází ke zvýšené proliferaci primárně pozměněných buněk pod vlivem látek - promotorů. Většina z nich projevuje pouze epigenetické vlastnosti, jejich účinek se tak může projevit až po působení genotoxických iniciátorů^[104]. Důležitými faktory tohoto stádia jsou aktivity proteinkinasy a fosfatasy a jejich regulace^[53]. Dalšími faktory ovlivňujícími tuto fázi jsou oxidativní změny molekuly DNA způsobené aktivními formami kyslíku, které mohou aktivovat protoonkogen^[94].

Třetí fází kancerogeneze je **fáze progresní**. V tomto stupni rakovinného procesu se dosud částečně kontrolovatelný růst benigního nádoru mění na růst nekontrolovatelný. Vzniká tak maligní nádor, který zasahuje i sousední tkáň a ničí je. Po průniku do cévního a lymfatického systému jsou nádorové buňky zanášeny do vzdálených orgánů a vznikají tak metastázy^[104]. Pro vznik maligního nádoru je potřeba vícenásobné genotoxické působení progresoru na cílovou tkáň^[111].

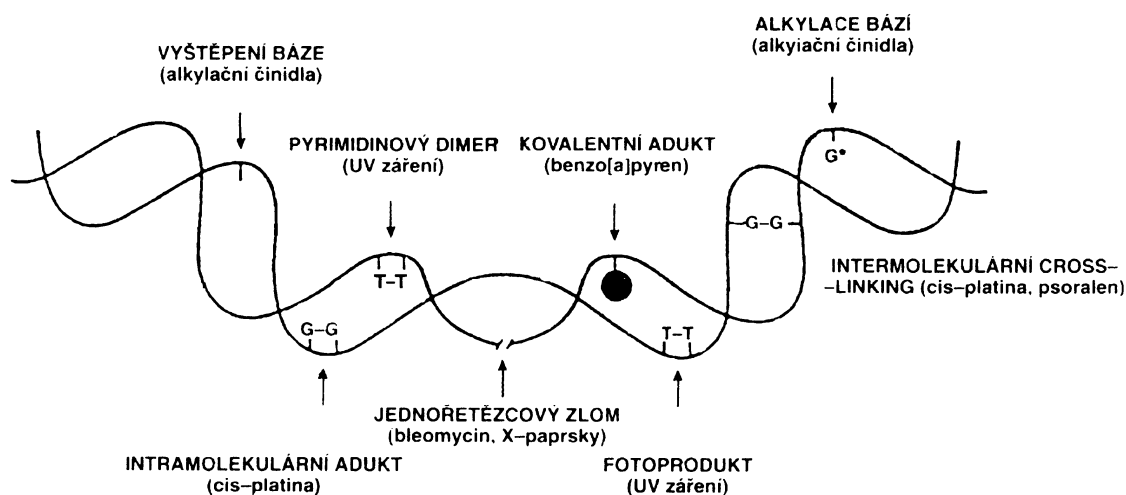


Obr. 1 Schéma víceetapového procesu kancerogeneze^[104]

1.1.3 FAKTORY KANCEROGENESE

Vznik nádorového onemocnění je složitý děj, na kterém se podílí faktory vnějšího prostředí (**Obr. 2**). Můžeme je rozdělit na faktory chemické (karcinogeny), fyzikální (např. UV, radioaktivní, Rentgenovo a ionizační záření, jemné částice azbestu či berylia) a biologické (genetické předpoklady, onkoviry). Podle mechanismu působení řadíme chemické karcinogeny do tří skupin:

- genotoxické - tvoří s DNA kovalentní adukty (benzo-[a]-pyren)
- epigenetické – vytvářejí nekovalentní interakce s DNA (mají schopnost vmezeřit se do dvoušroubovice DNA – např. ellipticin)
- způsobující změny ve struktuře DNA – jednořetězové zlomy (single-strand breaks), dvouřetězové zlomy (double-strand breaks), cross-linking (propojení molekul)^[94, 104].



Obr. 2 Mechanismy poškození DNA různými vnějšími faktory^[104]

1.2 BIOTRANSFORMACE XENOBIOTIK

Způsob přeměny a odstraňování nízkomolekulárních i vysokomolekulárních

cizorodých látek (xenobiotik) je uskutečňováno mechanismy označovanými jako **biotransformace**^[74]. Látky lipofilního charakteru procházející membránami se mohou v organismu hromadit. Nemohou být z těla vyloučeny přímo, ale musí být nejdříve přeměněny na metabolity s vyšší polaritou^[62]. Tyto hydrofilnější metabolity nemusí být jen netoxické, biologicky inertní látky. V závislosti na chemické struktuře daného xenobiotika a na enzymovém systému přeměňujícím danou látku v organismu se naopak může jednat o látky značného biologického významu. Místo **detoxifikace** dané látky může tedy docházet k její **aktivaci**. Takovou metabolickou aktivaci vyžaduje řada léčiv, ale aktivováno je též 98 % genotoxických kancerogenů (tzv. „proximální“ kancerogeny). Pouze málo z nich je karcinogenních okamžitě (tzv. „ultimální“ kancerogeny)^[62].

Procesy detoxikační a aktivační (v pozitivním i negativním smyslu) nelze od sebe vzájemně oddělit. Tentýž enzym může být zapojen např. v detoxikaci jedné chemické látky a přitom zvyšovat toxicitu látky jiné. Mezi oběma směry metabolismu existují velice složité vztahy rovnováhy, které mohou být v důsledku působení zevních i vnitřních faktorů snadno vychýleny na tu či onu stranu^[112].

V živočišných organismech je proces biotransformace xenobiotik rozdělen do dvou fází^[110]. V první fázi (tzv. derivatizační) dochází ke zvýšení polaritě hlavně reakcemi oxidačními, ale i redukčními, které jsou důležité především pro nitro-, azo- a chinoidní sloučeniny. U některých sloučenin (například esterů a amidů) se pro zvýšení polaritě uplatňují také hydrolytické reakce^[107]. Ve druhé fázi dochází ke konjugaci těchto polarizovaných molekul s endogenními látkami (kyselina glukuronová, glycin, taurin, aktivní sulfát, glutathion, cystein, aktivní acetát atd.)^[107].

1.2.1 PRVNÍ FÁZE BIOTRANSFORMACE

V průběhu derivatizační fáze dochází k zabudování funkčních skupin do molekuly xenobiotika nebo k demaskování funkčních skupin, které jsou v molekule již přítomny. Tím se zvyšuje polarita xenobiotika^[50]. Rozeznáváme tři typy derivatizačních reakcí:

- **oxidace** (C-hydroxylace, N-hydroxylace, N-oxidace, S-oxidace, dealkylace, deaminace, epoxidace, oxidace alkoholů, oxidace aldehydů apod.),
- **hydrolýza** (esterů a amidů),

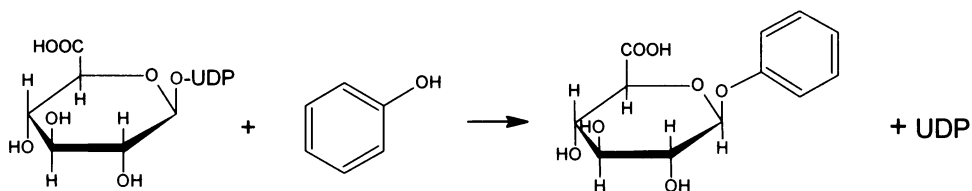
- **redukce** (nitro- a azoredukce) - příkladem kancerogenů, které jsou aktivovány redukční cestou jsou 2-nitroanisol^[64], 1-nitropyren^[43], 1,6-nitropyren^[28] či aristolochové kyseliny^[98, 99].

Mezi enzymy participující na derivatizačních reakcích xenobiotik patří enzymy mikrosomální frakce (subcelulární systém získaný destrukcí endoplasmatického retikula při homogenisaci buněk) a cytosolu (tímto pojmem je označován roztok cytoplasmu a isolačního pufru). Klíčovým enzymovým systémem I. fáze biotransformace je mikrosomální **systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO) s cytochromem P450 jako terminální oxidasou** (kapitola 1.3), který provádí zejména většinu oxidačních reakcí. Dalšími enzymovými systémy podílejícími se na derivatizační fázi biotransformace xenobiotik jsou **NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (DT-diaforasa**, kapitola 1.4.1), **hemové peroxidasy**, mikrosomální monooxygenasa obsahující flavin (Zieglerův enzym)^[119], alkohol- a aldehyddehydrogenasy a reduktasy (cytosolární xanthinoxidasa)^[80].

1.2.2 DRUHÁ FÁZE BIOTRANSFORMACE

V konjugační fázi biotransformace jsou na reaktivní funkční skupiny vytvořené v derivatizační fázi vázány malé endogenní hydrofilní molekuly. Tím se ještě zvýší polarita původně hydrofobní molekuly xenobiotika a usnadní se tím její vyloučení z organismu. Exkrece nejčastěji probíhá močí a žlučí.

Nejčastěji dochází ke konjugaci s kyselinou glukuronovou (**Obr. 3**). Tato reakce je katalyzována **UDP-glukuronosyltransferasou** a vzniklé konjugáty (O- či N-glukosiduronáty) jsou vylučovány zejména močí^[107].

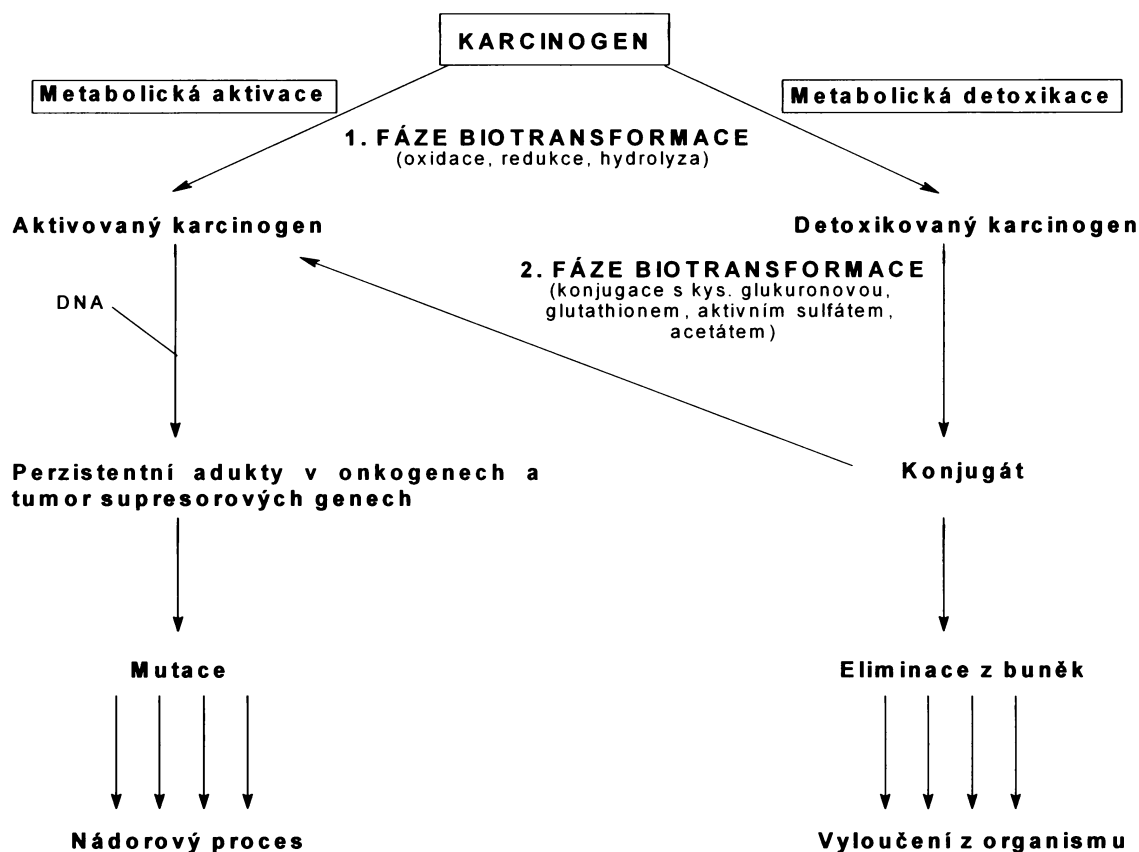


Obr. 3 Konjugace derivatizovaného xenobiotika s uridyldifosfoglukuronovou kyselinou^[55]

Enzymem participujícím na antikancerogenních procesech je **glutathion-S-transferasa**, která je schopna vázat reaktivní metabolity a katalyzovat jejich vazbu s glutathionem^[112]. Dále dochází k odštěpení γ -glutamylvého zbytku v ledvinách a glycylového v játrech. Cysteylový zbytek dále podléhá acetylaci (katalyzována acetyltransferasami) a vzniká merkapturová kyselina, která již může být vyloučena močí. Glutathion je považován za „scavenger“ (vychytávač) cizorodých látek^[107]. Obdobně jsou xenobiotika konjugována i s cysteinem.

Žlučí jsou vylučovány konjugáty látek fenolické povahy s aktivním sulfátem či konjugáty karboxylových kyselin s glycinem nebo taurinem. Touto cestou je také vylučována kyselina cholová, která je finálním produktem degradace endogenních steroidních látek^[107].

Také v této fázi však může dojít k aktivaci xenobiotika na sloučeninu toxickejší (**Obr. 4**). K tomu dochází např. u konjugátů s aktivním sulfátem vznikajících z N-hydroxylovaných aromatických aminů účinkem **sulfottransferas** (sulfát je pro konjugační reakci nejprve aktivován na 3'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát neboli PAPS). Konjugát sulfátu s N-hydroxysloučeninami je v kyselém prostředí močových cest nestabilní a rozpadá se za vzniku nitréniového (popř. karbéniového) iontu, vzniká tedy elektrofil, který reaguje s DNA a proteiny^[112].

Obr. 4 Metabolická aktivace a detoxikace karcinogenu^[106]

1.3 MIKROSOMÁLNÍ MONOOXYGENASOVÝ SYSTÉM (MFO)

Mikrosomální monooxygenasový systém, nejdůležitější enzymový systém první fáze biotransformace xenobiotik, katalyzuje celou řadu oxidačních, oxygenačních, popř. redukčních reakcí, přičemž využívá především molekulární kyslík. Je lokalizován na vnější straně endoplasmatického retikula a někdy je též označován jako systém oxidas a oxygenas se smíšenou funkcí (mixed function oxidases - MFO systém)^[100, 102]. Má tři základní složky:

- **NADPH:cytochrom P450 reduktasu** - flavoproteinový enzym (kapitola 1.3.1), slouží jako dělič elektronového páru,
- **cytochrom P450** - hemthiolátový enzym (kapitola 1.3.2), terminální oxidasa, neméně důležitou součástí je též cytoplasmatická membrána,

- **membránové lipidy** - způsobují konformační změny cytochromu P450, které zvyšují jeho afinitu k substrátu, a stimulují tvorbu funkčně aktivního komplexu *cytochrom P450-NADPH:cytochrom P450 reduktasa*^[34].

Fakultativně MFO systém obsahuje **cytochrom b₅** a **NADH:cytochrom b₅ reduktasu**^[101].

MFO systém je lokalizován:

- **na vnější (cytosolární) straně membrány hladkého i hrubého endoplasmatického retikula** v orgánech exponovaných látkám cizorodé povahy (játra, ledviny, plíce, gastrointestinální trakt, kůže, mozek). Zde se účastní derivatizační fáze xenobiotik,
- **na mitochondriální membráně** – tak je tomu zejména v kůře nadledvin, kde participuje na metabolismu endogenních látek (mastných kyselin a steroidů).

1.3.1 NADPH:CYTOCHROM P450 REDUKTASA

Enzym NADPH:cytochrom P450 reduktasa (EC 1.6.2.4), membránově vázaný „žlutý protein“, katalyzuje přenos elektronů z NADPH na všechny známé formy cytochromu P450^[90] (v daném organismu je jedna forma NADPH:cytochrom P450 reduktasy schopna spolupracovat s více formami cytochromu P450). Elektrony jsou přenášeny také na cytochrom c, cytochrom b₅, hem oxygenasu, ferrikyanid, elongasu mastných kyselin a další^[37]. NADPH:cytochrom P450 reduktasa může být za určitých okolností nahrazena NADH:cytochrom b₅ reduktasou^[101], která jako donor vodíku využívá NADH.

NADPH:cytochrom P450 reduktasu tvoří dvě funkční domény, hydrofobní N-terminální (6 kDa), kterou je zakotvena v membráně^[51], a hydrofilní C-terminální katalytická doména (72 kDa)^[116].

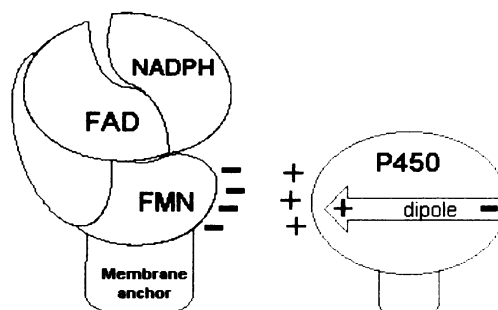
C-terminální funkční doména je složena z FMN- a FAD- vazebné strukturní domény, „spojovací“ struktura umístěná mezi FMN- a FAD- vazebnou doménou je pak zodpovědná za správnou prostorovou orientaci obou strukturních domén. FAD a FMN skupiny se vzájemně nepřekrývají, jsou v kontaktu prostřednictvím 7- a 8- methylových

skupin isoalloxazinových kruhů, které leží těsně u sebe a svírají úhel zhruba 150°. Přenos elektronů mezi flaviny je tedy nejspíše přímý, není zprostředkován zbytkem aminokyseliny, a proto je tento přenos rychlý^[116].

FAD-vazebná doména zodpovídá za (nekovalentní) vazbu NADPH; pozitivně nabitě aminokyseliny (arginin, lysin) v místě vazby NADPH interagují s negativně nabitou fosfátovou skupinou v poloze 2' ribosy, kterou se tento koenzym liší od NADH, a způsobují tak neobvykle vysokou selektivitu NADPH:cytochrom P450 reduktasy vůči NADPH^[116].

FMN-vazebná doména je zodpovědná za přenos elektronů na molekulu akceptoru (cytochrom P450, cytochrom c). Pyrimidinová strana isoalloxazinového kruhu FMN se nachází blízko povrchu enzymu a je tak pro akceptorovou molekulu snadno dostupná.

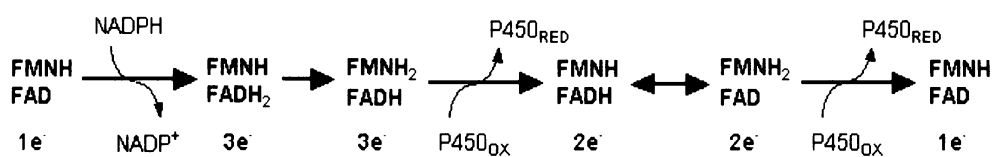
Interakce mezi NADPH:cytochrom P450 reduktasou a cytochromem P450 jsou hlavně elektrostatické povahy (**Obr. 5**). Kladně nabitý povrch cytochromu P450 (argininy, lysiny) interaguje se záporně nabitým povrchem NADPH:cytochrom P450 reduktasy (glutamát, aspartát). Dále se uplatňují také



Obr. 5 Složky MFO systému - NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa, cytochrom P450 a membránové lipidy^[128]

hydrofobní interakce mezi nepolárními aminokyselinami (valin, tryptofan, leucin) v oblasti membránových domén NADPH:cytochrom P450 reduktasy a cytochromu P450^[69, 108].

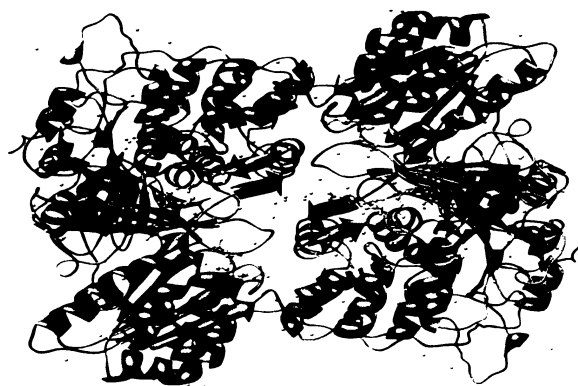
Na základě rozdílných redoxních potenciálů obou flavinových prosthetických skupin byla vysvětlena funkce NADPH:cytochrom P450 reduktasy jako děliče elektronového páru (**Obr. 6**)^[77, 113]. Akceptorem elektronů (resp. atomů vodíku) od NADPH je FAD, který elektrony následně předává FMN. Za jedoelektronovou redukci akceptorové molekuly - cytochromu P450 - je (v případě savčí NADPH:cytochrom P450 reduktasy) zodpovědný zcela redukovaný hydrochinon FMNH_2 ^[107, 127].



Obr. 6 Schéma přenosu elektronů mezi flaviny NADPH:cytochrom P450 reductasy^[128]

Aktivita NADPH:cytochrom P450 reductasy je regulována zejména hormonálně, a to především prostřednictvím hormonu štítné žlázy trijodtyroninu (T₃), který zasahuje do regulace exprese genu pro NADPH:cytochrom P450 reductasu na úrovni transkripce prostřednictvím responsivního elementu pro thyroidální hormony (TRE) v promotorové oblasti genu, a v menší míře se uplatňuje též stabilizace mRNA^[124]. Při absenci thyroidních hormonů v organismu dochází k poklesu aktivity NADPH:P450 reductasy v mikrosomech jater o 75 až 85 %, naproti tomu v ledvinách či plicích je tento pokles 30 až 50 %^[75, 81]. V nadledvinách a jiných steroidogenních tkáních je hladina NADPH:cytochrom P450 reductasy regulována adrenokortikotropním hormonem (ACTH)^[25].

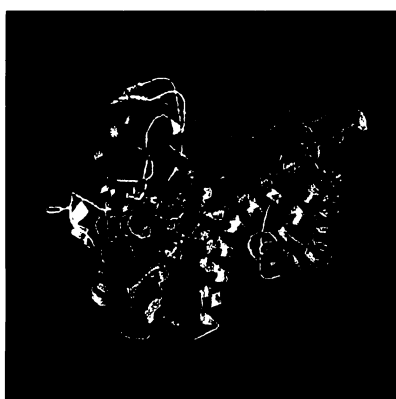
NADPH:cytochrom P450 reductasa (Obr. 7) je v rámci fylogeneze velmi konzervovaný enzym. NADPH:cytochrom P450 reductasy z různých živočišných a rostlinných druhů vykazují vysokou homologii v aminokyselinové sekvenci (např. lidská a potkaní forma mají sekvenční homologii 92 %, přičemž nejvíce odlišnosti v aminokyselinové sekvenci se nachází v N-terminální „kotvící“ oblasti a naopak, FMN-vazebná doména je u obou forem téměř shodná)^[123]. Tento fakt ukazuje na významnou roli tohoto enzymu v průběhu evoluce^[89].



Obr. 7 NADPH:cytochrom P450 reductasa (potkan)^[125]

1.3.2 CYTOCHROM P450

Cytochrom P450 (EC 1.14.14.1, **Obr. 8**) je terminální oxidasou MFO systému. Zprostředkovává vazbu molekulárního kyslíku, jeho aktivaci (oxidasová funkce) a zabudování jednoho atomu kyslíku do molekuly substrátu (oxygenasová funkce)^[82]. Druhý atom kyslíku je redukován na vodu^[23]. Elektrony potřebné k redukci dodává NADPH:cytochrom P450 reduktasa^[39], případně NADH:cytochrom b₅ reduktasa^[109].



Obr. 8 Cytochrom P450 2B4 ^[126]

V roce 1958 byl Garfínkelem a Klingenbergem objeven v jaterních mikrosomech pigment, který po redukci vykazuje v komplexu s oxidem uhelnatým absorpční maximum při 450 nm^[36, 54]. Roku 1964 Omura a Sato prokázali hemoproteinový charakter tohoto pigmentu. Na základě podobnosti povahy vazby hemu cytochromů b a podle netypického maxima Soretova pásu jej nazvali cytochromem P450^[76].

Z evolučního hlediska je cytochrom P450 považován za velmi starý hemoprotein, který se objevil mnohem dříve než hemoglobin^[71, 73]. Je to enzym, který se vyvíjel cestou tzv. divergentní evoluce. Z jediného genu cytochromu P450 archebakterií z doby více než před 1,5 miliardami let se do současnosti vyvinulo velké množství odlišných genů kódujících cytochromy P450 prokaryotních i eukaryotních organismů^[100]. Všechny obsahují konzervované aminokyselinové sekvence oblastí v blízkosti vazného místa pro hem; přes to existují značné rozdíly v jejich struktuře a substrátové specifitě^[22].

Systém cytochromu P450 je v eukaryotických buňkách lokalizován v membráně endoplasmatického retikula nebo mitochondrií, kde je makromolekula cytochromu P450 pevně ukotvena prostřednictvím transmembránového N-terminálního α -helixu v membránové lipidové dvojvrstvě^[30], zatímco bakteriální cytochromy P450 jsou enzymy rozpustné.

Porfyrinový skelet neboli protoporfyrin IX je v molekule enzymu vázán hydrofobními silami a zároveň prostřednictvím thiolátové síry sulfhydrylové skupiny cysteinu přítomné v aktivním centru enzymu, která je proximálním (pátým) ligandem

železa v hemu^[3, 45]. Nejedná se tedy o klasický cytochrom (protoporfyrin IX vázán prostřednictvím imidazolového zbytku histidinu^[44]), ale o **hemthiolátový protein** (správnější označení by bylo „enzym P450“). Toto uspořádání umožňuje výjimečné chování těchto hemoproteinů a odlišuje je od hemoproteinů ostatních. Šestým ligandem je atom kyslíku molekuly vody^[35].

1.3.2.1 CYTOCHROM P450 A JEHO SPINOVÉ FORMY

Cytochromy P450 díky přechodnému charakteru hemového železa existují ve dvou spinových formách (**Obr. 9**)^[44, 107]:

- **vysokospinová forma** vzniká v případě, že ion železa je v **pentakoordinovaném** stavu a všechny jeho valenční elektrony jsou nespárované (spin 5/2). Centrální atom železa je „vytahován“ thiolátovou skupinou nad rovinu porfyrinového skeletu. Tato forma vykazuje maximum Soretova pásu při **390 nm**.
- **nízkospinová forma** (spin 1/2) je charakteristická maximem absorpce **při 418 nm**. Železo v porfyrinovém skeletu molekuly interaguje ještě s jedním ligandem (např. s -OH, -COOH nebo -NH₂ skupinou postranních řetězců aminokyselin apoproteinu^[37] či atomem kyslíku z molekuly vody^[35]). Je ve formě **hexakoordinované** a leží prakticky v rovině kruhu protoporfyrinu IX.

Oba spinové stavy jsou v klidovém stavu v rovnováze. Ke změně jejich poměru dochází při **vazbě substrátu** do vazebného místa, kdy dochází k vytlačení šestého ligandu a tedy nárůstu obsahu vysokospinové formy. V absorpčním spektru lze tedy sledovat nárůst absorpance při 390 nm a pokles při 418 nm - tzv. „substrátové spektrum“.

Šestým ligandem železa může být i samotný **substrát** (či nepřeměňovaná látka vázající se do aktivního centra enzymu), pak pozorujeme pokles absorpance při 390 nm a nárůst (dle heteroatomu) při 418 až 460 nm, tedy tzv. „ligandové spektrum“^[44, 107].



Obr. 9 Struktura hemu cytochromu P450^[55]

- a) vysokospinová forma
- b) nízkospinová forma

1.3.2.2 ENZYMOVÉ FUNKCE CYTOCHROMU P450

Oxidasová funkce

- aktivace biatomické molekuly kyslíku pro klíčové reakce^[16]. Spontánní reakce organických molekul s atmosférickým kyslíkem jsou spinově zakázané. V aerobních organismech se proto vyskytuje řada proteinů mající prosthetickou skupinu s kovem nebo flavinem, které jsou schopny katalyzovat aktivaci biatomické molekuly kyslíku pro klíčové reakce^[16].

Oxygenasová aktivita

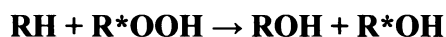
- zabudování kyslíku do molekuly málo reaktivního substrátu.

Redukční reakce

- elektrony poskytnuté NADPH:cytochrom P450 reduktasou redukují přímo substrát a nejsou využity k aktivaci molekuly kyslíku. K tomu dochází, pokud je hydrofobní substrát zároveň dobrým ligandem železa porfyrinového skeletu a vytváří s enzymem komplex. Hydrofobní substrát je tedy vázán jako šestý ligand místo kyslíku. Tento mechanismus je popsán *in vitro* a existují i nepřímé důkazy pro jeho průběh *in vivo*^[61].

Peroxidasová aktivita

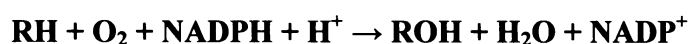
- místo kyslíku je druhým substrátem organický peroxid (R^*OOH) nebo peroxid vodíku^[2]. Pro průběh reakce není potřeba NADPH jako zdroj elektronů^[24]. Produktem reakce je stejně jako při klasickém mechanismu hydroxylovaný substrát (ROH):

*Produkce H_2O_2 a aktivních forem kyslíku*

- k této reakci dochází, když MFO systém interaguje s látkou, která se obtížně hydroxyluje (je pouze hydrofobní, tvoří komplex s enzymem, ale těžko se do ní zabudovává kyslík). Proběhne oxidasová fáze funkce cytochromu P450 (tzn. aktivuje se molekula kyslíku), ale už neproběhne fáze oxygenasová. Dochází k uvolnění aktivní formy kyslíku z molekuly do okolí, kde přijímá protony nebo dismutuje^[107].

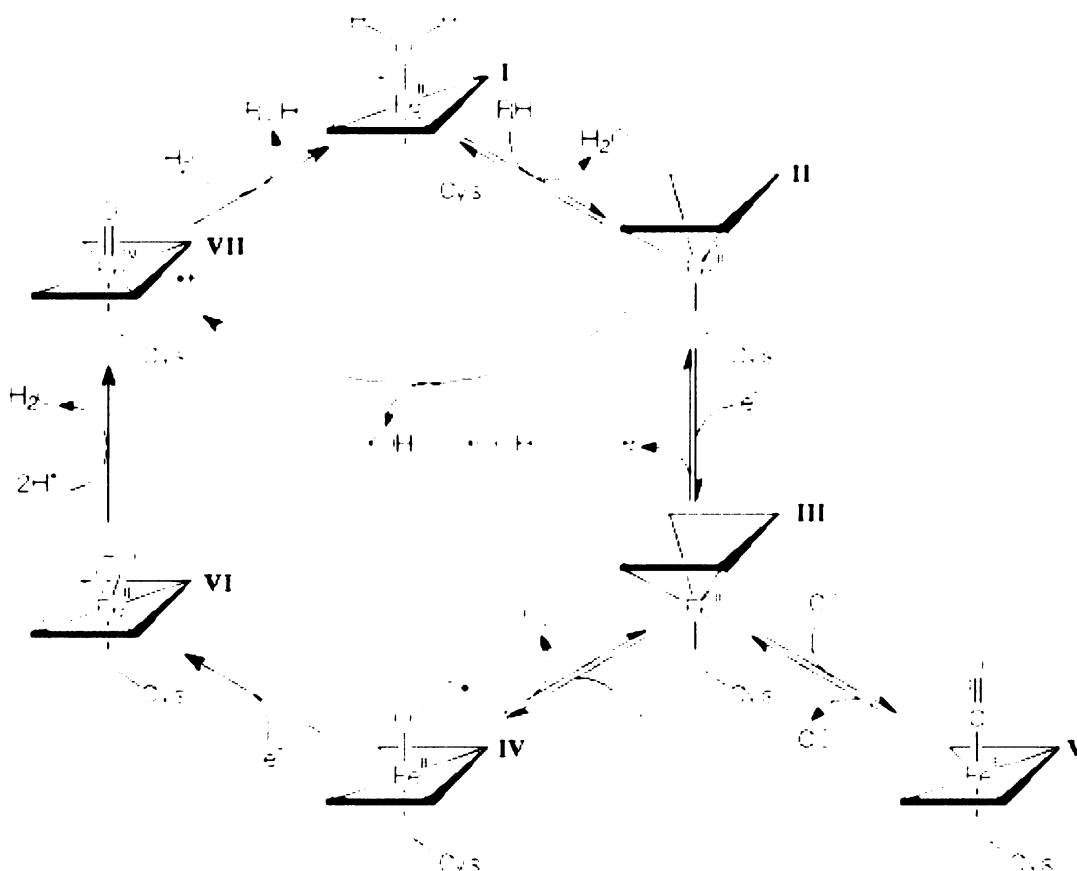
1.3.2.3 REAKČNÍ MECHANISMUS MONOOXYGENASOVÉ REAKCE

Nejtypičtější reakcí katalyzovanou cytochromy P450 je monooxygenasová reakce, která představuje aktivaci molekulárního kyslíku a zabudování jednoho atomu do molekuly substrátu prostřednictvím MFO systému.. Aktivace kyslíku je umožněna dvěma elektrony pocházejícími převážně z NADPH:cytochrom P450 reduktasy, ale donorem druhého elektronu může být i cytochrom b_5 reduktasa^[37]. Druhý atom kyslíku je redukován na vodu. Obecný průběh monooxygenasové reakce katalyzované cytochromem P450 lze vyjádřit sumární rovnicí:



kde RH je substrát a ROH hydroxylovaný produkt reakce.

Reakční cyklus cytochromů P450 probíhá uspořádaným mechanismem a sestává se pravděpodobně z osmi kroků. Schéma je znázorněno na **Obr. 10**.



Obr. 10 Schéma reakčního mechanismu monooxygenasové reakce, naznačena je i peroxidasová aktivita cytochromu P450 a tvorba komplexu s oxidem uhelnatým^[120]

- I. V klidovém stavu je hemové železo ve ferri formě (má oxidační číslo III) a je hexakoordinováno (nízkospinový stav). Šestá valence je obsazena kyslíkem vody či aminkyselinovým (interním) ligandem.
- II. Po vniknutí substrátu (RH) do aktivního místa dochází k vytlačení šestého ligandu železa, které zůstane pentakoordinované, a zároveň nastane konformační změna v molekule enzymu^[101]. Vzniká binární komplex enzym-substrát ($\text{Fe}^{\text{III}+} - \text{RH}$).
- III. Dalším krokem je jednoelektronová redukce cytochromu P450 interakcí s NADPH:cytochrom reduktasou, čímž se hemové železo redukuje na ferro formu (Fe^{II}), protože pouze redukovaná forma je schopna vázat molekulární kyslík nebo

- jiné ligandy. Železo je stále pentakoordinováno (vysokospinový stav).
- IV. Navázáním molekulárního kyslíku na formu [III] vzniká ternární ferri-superoxidový komplex. Ion železa je v nízkospinové formě a hexakoordinován. Tento komplex není příliš stabilní, je dále redukován NADPH:cytochrom P450 reduktasou nebo NADH:cytochrom b5 reduktasou, čímž je aktivován kyslík za tvorby peroxidového aniontu. Pokud není druhý elektron k dispozici dostatečně rychle, komplex [IV] se rozpadá a uvolněný seperoxidový anionradikál je pak superoxidodismutasou přeměněn na peroxid vodíku, který je pro buňku toxický^[101].
 - V. Vazba kyslíku na formu [III] může být inhibována za přítomnosti oxidu uhelnatého, který vytváří ternární ferrokomples cytochrom P450-CO-RH.
 - VI. U komplexu cytochromu P450 s biatomickou molekulou kyslíku, který je již po druhé redukcí zcela aktivovanou formou cytochromu P450, dochází k heterolytickému štěpení vazby O-O, přičemž jeden atom kyslíku je redukován, přijme dva protony a dojde k uvolnění vody^[101].
 - VII. Druhý atom kyslíku zůstává vázán na atomu Fe v hemu a vzniká ferrioxenový komplex, který je stabilizován mesomerním posunem elektronu z thiolátové síry na kyslík^[107]. Vzniklý reaktivní kyslíkový radikál je schopen vytrhnout vodíkový atom z molekuly vhodného substrátu za vzniku radikálu substrátu a hydroxylovaného radikálu vázaného na Fe hemu. Dochází k rekombinaci radikálů za uvolnění hydroxyderivátu substrátu (ROH) z enzymu a obnovení nativní formy cytochromu P450 [I]^[101, 107].

Za přítomnosti oxidačních činidel (např. organických peroxidů) může z komplexu [III] vznikat přímo stav [VII] (tzv. peroxidasová aktivita)^[101].

1.3.2.4 NÁZVOSLOVÍ CYTOCHROMU P450

Cytochromy P450 existují v různých formách (isoformy, isoenzymy), které jsou rozděleny na základě podobnosti aminokyselinové sekvence do genetických rodin (sekvenční homologie větší než 40 %) a podrodin (sekvenční homologie větší než 60 %)^[72]. Současná nomenklatura byla navržena Nebertem a jeho spolupracovníky. Pro

cytochrom P450 byla zavedena zkratka CYP, rodiny cytochromů P450 jsou označovány prvním číslem za touto zkratkou (CYP2), za ním následuje velké písmeno označující podrodinu (CYP2B). Posledním číslem je označen konkrétní enzym (CYP2B4)^[72].

U člověka bylo dosud nalezeno 58 genů pro cytochromy P450 klasifikovaných do 17 rodin^[121]. Metabolismu léčiv respektive xenobiotik se účastní cytochromy P450 pouze z těchto tří rodin: CYP1, CYP2 a CYP3 (v menší míře též rodina CYP4). Ostatní rodiny participují na biosyntéze steroidů, cholesterolu či žlučových kyselin, na metabolismu mastných kyselin, kyseliny arachidonové apod.^[121].

1.3.2.5 SUBSTRÁTOVÁ SPECIFITA CYTOCHROMU P450

Substrátová specifita cytochromů P450 participujících na biotransformaci xenobiotik je ve většině případů široká. Hydroxylují celou škálu organických sloučenin [např. polycyklické aromatické uhlovodíky (PAU), alifatické uhlovodíky, polycyklické aromatické nitrosloučeniny, aromatické i alifatické aminy, fenoly, řadu léčiv...]. Existují však i cytochromy P450, které hydroxylují pouze malý počet substrátů. Takovými enzymy jsou cytochromy P450 metabolisující endogenní sloučeniny v eukaryotických buňkách (např. steroidní hormony)^[100, 102].

Základní dosud známé údaje o enzymových aktivitách forem cytochromu P450 katalyzujících biotransformaci xenobiotik ukazuje **tabulka 2**.

Tabulka 2 Lidské formy cytochromu P450 významné pro metabolismus xenobiotik^[100, 107, 122, 124]

CYP	Orgánová distribuce, inducibilita, polymorfismus	Substráty	Induktory (↑) a inhibitory (↓)
1A1	<ul style="list-style-type: none"> • konstitutivně: <u>plíce</u>, ledviny, kůže, placenta lymfocyty, gastrointestinální trakt (GIT) • inducibilní ve všech tkáních • polymorfismus • <i>souvislost exprese, kouření a bronchogenní rakoviny</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • polycyklické aromatické uhlovodíky (<u>PAU</u>)-např. benzo(a)pyren • aflatoxiny • spíše aktivační funkce 	<ul style="list-style-type: none"> • výživa • <u>↑kouření</u>, • ↓N₂O • léčiva: ↓?ellipticin • polutanty: <u>↑PAU</u>, <u>↑polychlor.bifenyly</u>

CYP	Orgánová distribuce, inducibilita, polymorfismus	Substráty	Induktory (↑) a inhibitory (↓)
1A2	<ul style="list-style-type: none"> konstitutivně: <u>játra</u> (13 % CYP) a plíce inducibilní ve všech tkáních polymorfismus (vzácně se vyskytuje bodová mutace v čínské populaci) <i>souvislost exprese, metab. aromat. aminů a nádorů močového měchýře</i> 	<ul style="list-style-type: none"> <u>aromatické a heterocyklické aminy</u> (vznikají při vysokoteplotní úpravě masa) některé steroidní látky bufuralol, fenacetin, paracetamol, kofein, theofylin spíše aktivací funkce 	<ul style="list-style-type: none"> výživa: ↑<u>grilované maso</u>, ↑?brukvovitá zelenina ↑<u>kouření</u> ↑tělesná námaha ↑polutanty: ↑dioxiny léčiva: ↓estrogeny, ↓?ellipticin, ↑?rifampicin, ↑?fenobarbital, ↑insulin
2B6	<ul style="list-style-type: none"> konstitutivně: játra, plíce, GIT inducibilní 	<ul style="list-style-type: none"> nikotin, aflatoxiny protinádorová léčiva (cyklofosfamid) 	<ul style="list-style-type: none"> léčiva: ↑barbituráty, ↑dexametazon
2C19	<ul style="list-style-type: none"> konstitutivně: játra, duodenum <u>polymorfismus</u> 	<ul style="list-style-type: none"> diazepam, barbituráty, cyklofosfamid, progesteron, aminopyrin 	<ul style="list-style-type: none"> léčiva: ↓ fluoxetin (Prozac), ↑rifampicin
2E1	<ul style="list-style-type: none"> konstitutivně: <u>játra</u> (7 % CYP), ledviny, nosní sliznice, plíce, GIT, lymfocyty inducibilní polymorfismus <i>souvislost s rakovinou hlavy, krku a plic</i> 	<ul style="list-style-type: none"> nízkomolekulární lipofilní látky: etanol, aceton, hexan, benzen, dietyléter, chloroform, anilin, chlorzoxazon, nitrosaminy, paracetamol, kofein, dextrameterfan 	<ul style="list-style-type: none"> výživa: ↑<u>hladovění</u> (=endogenní tvorba acetonu), <u>alkohol</u> (↓akutní/↑chronický příjem), ↑diabetes mellitus, ↓?řeřicha ↑organická rozpouštědla (toluen, aceton) ↑polutanty
3A4 3A5	<ul style="list-style-type: none"> konstitutivně: <u>játra</u>, <u>GIT</u>, <u>ledviny</u>, děloha, ?plod, plíce (3A=60 % jaterního CYP) inducibilní polymorfismus neprokázán geneticky podmíněná různá míra inducibility <i>souvislost s rakovinou jater (oxidace aflatoxinů)</i> 	<ul style="list-style-type: none"> extrémně široká substrátová specifita léčiva (cyklofosfamid, metadon, erytromycin, kodein, dextrameterfan) látky steroidní povahy (kortisol, estradiol, progesteron, testosteron) karcinogenní xenobiotika 	<ul style="list-style-type: none"> výživa: ↓grapefruitový džus (ireverzibilně), ↓chinin růstový hormon léčiva: ↑rifampicin, barbituráty, ↑steroidní látky, ↑metadon, ↓erytromycin, ↓clotrimazol ↑polutanty

1.4 CYTOPLASMATICKÉ ENZYMY KATALYZUJÍCÍ REDUKČNÍ REAKCE XENOBIOTIK

1.4.1 DT-DIAFORASA

DT-diaforasa (NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa, EC 1.6.99.2, obr. **Obr. 11**) je cytoplasmatický enzym katalyzující dvouelektronové redukce chinonů a chinoidních sloučenin na hydrochinony (bez tvorby radikálů). Jako donor elektronů může využívat

NADH i NADPH s téměř totožnou efektivitou^[87].

DT-diaforasa je homodimer skládající se ze dvou identických podjednotek v „head-to-tail“ uspořádání. Každá podjednotka obsahuje jednu molekulu FAD jako prostetickou skupinu a obě aktivní místa jsou tvořena částmi obou podjednotek^[57]. Byla nalezena významná homologie v sekvenci aminokyselinových zbytků 142 a 158 DT-diaforasy izolované z jaterního cytosolu potkanů a v sekvencích vázajících pyrofosfát v jiných NAD(P)H-dependentních enzimech^[38].



Obr. 11 Struktura lidské formy DT-diaforasy (převzato z^[11])

Toxické efekty chinoidních sloučenin, vznikajících například biotransformací benzenu či benzo[a]pyrenu, spočívají v jejich schopnosti kovalentně se vázat na DNA, RNA nebo proteiny a také v účasti na jednoelektronových oxidačně-redukčních pochodech vedoucích k tvorbě oxidativního stresu. Ochranná role tohoto enzymu spočívá ve schopnosti redukovat chinony na hydrochinony, které jsou dále inaktivovány CDP-glukuronosyltransferasami^[17, 58]. Vedle redukce chinonů je DT-diaforasa schopna také redukovat řadu dalších sloučenin jako cytostatika (například mitomycin C) či nízkomolekulární xenobiotika (například nitrosloučeniny a azobarviva)^[87]. Výsledky experimentů v naší laboratoři (PřF UK Praha, katedra biochemie) potvrdily, že potkaní a lidská DT-diaforasa má nitroreduktasovou aktivitu také vůči aristolochovým kyselinám (AA)^[95, 97].

U nádorových buněk bývá zvýšena aktivita DT-diaforasy v porovnání s buňkami zdravé tkáně^[85, 91]. Byla nalezena zvýšená aktivita tohoto enzymu v buňkách karcinomu

tlustého střeva, jater, plic a prsu, zatímco u buněk adenokarcinomu žaludku byla ve srovnání s buňkami zdravé tkáně aktivita DT-diaforasy nižší^[91]. DT-diaforasa je účinnější za anaerobních podmínek, které jsou typické pro maligně transformované buňky^[98].

1.4.1.1 INDUKCE DT-DIAFORASY

DT-diaforasa je inducibilní enzym. Existuje mnoho strukturně odlišných sloučenin, které mají schopnost indukovat DT-diaforasu, a tak chránit laboratorní zvířata před efekty karcinogenů. Patří sem např. 1,1'-azonaftaleny, analoga Sudanu I, Sudanu III, kumariny, flavonoidy, polycyklické aromatické uhlovodíky, sloučeniny obsahující ve své molekule síru, fenolické antioxidanty, butylovaný hydroxytoluen (BHT), butylovaný hydroxyanisol (BHA)^[26]. Přesný mechanismus indukce DT-diaforasy ještě nebyl zcela objasněn, nicméně existence různých genů v potkaních i lidských játrech nasvědčuje přítomnosti násobných forem enzymu^[66, 84]. DT-diaforasa je indukována prostřednictvím Ah receptoru, stejně jako například CYP1A. Tímto pravděpodobně nejdůležitějším mechanismem stimulují expresi tohoto enzymu například azobarviva a polycyklické aromatické uhlovodíky^[27]. Tamoxifen, transhydroxytamoxifen a další látky patřící do skupiny antiestrogenů zajišťují indukci tohoto enzymu prostřednictvím receptoru specifického pro estrogény (ER receptor)^[66], jiné induktory (např. tert-butyhydrochinon) k indukci DT-diaforasy intracelulární receptor nepotřebují^[66].

1.4.1.2 LIDSKÁ ISOFORMA DT-DIAFORASY

Gen *NQO1*, lokalizovaný na chromozomu 16q2.2, kóduje hlavní cytosolární formu lidské DT-diaforasy^[49]. V lidské populaci se však vyskytují dvě rozdílné alely genu *NQO1*. Vzácnější forma kódující nefunkční DT-diaforasu je nazývána „null“ alela^[92]. Nález „null“ alely genu *NQO1* výrazně zvyšuje riziko vzniku urologických malignit^[92] a karcinomu plic^[46, 86].

Lidská isoforma je složena ze dvou polypeptidových řetězců, přičemž každý je složen ze 274 aminokyselin a má molekulovou hmotnost 30 867 Da^[38]. Řetězce jsou

identické z hlediska primární struktury, liší se ale zastoupením α -helixů a β -struktur, tedy na úrovni sekundární struktury. V každém řetězci se nachází výrazná stočená antiparalelní struktura^[38].

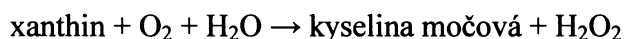
Specifickými inhibitory lidské isoformy DT-diaforasy jsou antikoagulanty (např. dikumarol)^[41, 46].

1.4.1.3 POTKANÍ ISOFORMA DT-DIAFORASY

Potkaní isoforma DT-diaforasy je složena také ze dvou polypeptidových řetězců. Každý z obou je tvořen 273 aminokyselinami a jeho molekulová hmotnost je 30 801 Da. V každém řetězci se nachází výrazná stočená antiparalelní struktura^[38]. Řetězce jsou na primární úrovni identické, liší se však na úrovni sekundární struktury, tedy zastoupením α -helixů a β -struktur. Řetězec „A“ je složen ze sedmi α -helixů (27,8 %) a osmi β -struktur (12,8 %), zatímco řetězec „B“ tvoří osm α -helixů (29,7 %) a osm β -struktur (13,2 %)^[57].

1.4.2 XANTHINOXIDASA

Xanthinoxidasa je flavoprotein, který katalyzuje oxidativní hydroxylaci řady aromatických heterocyklických sloučenin (xanthinu, hypoxanthinu) a aldehydů. V organismu má důležitou funkci především při odbourávání purinových bází. Z purinů se nejprve odštěpí ribosa a uvolněný guanin se deaminuje na xanthin. Ten podléhá hydroxylaci v poloze C₈ a vzniká kyselina močová^[114]. Reakci lze schematicky znázornit rovnicí:



Eukaryotická xanthinoxidasa je homodimer, složený se ze dvou identických podjednotek o molární hmotnosti 130 kDa. Každý monomer je uspořádán do několika domén (několika systémů přenášejících elektrony):

- každá z prvních dvou domén je koordinována s $[\text{Fe}_2\text{S}_2]$ klastrem
- následuje flavinová doména
- nakonec jsou dvě domény vážící dvě molekuly molybdenu jako kofaktoru.

Tento komplex cyklicky přechází z plně oxidovaného stavu (Mo VI) do redukovaného stavu (Mo IV)^[123].

Enzym se vyskytuje v jaterní tkáni obratlovců převážně ve formě xanthindehydrogenasy, skladováním při teplotě -20°C za přidání organických rozpouštědel může být převeden do oxidasové formy^[123].

Indukce xanthinoxidasy xenobiotiky nebyla prakticky zjištěna, existuje však regulace její aktivity endogenními látkami^[80].

1.5 AROMATICKÉ NITROSLOUČENINY

Aromatické nitrosloučeniny tvoří významnou součást toxických a karcinogenních kontaminantů životního prostředí, které představují značný rizikový faktor pro lidské zdraví. Jsou přítomny ve všech složkách životního prostředí. Nitroaromáty se např. vyskytují ve výfukových plynech a jsou adsorbovány na vzdušné prachové částice. Regionální znečištění těmito sloučeninami je spojeno s řadou procesů. Nitroaromáty vznikají z oxidů dusíku produkovaných všemi vysokoteplotními procesy (spalování fosilních paliv, tepelná likvidace odpadů a zpracování kovů), dalších vzdušných polutantů a polycyklických aromatických uhlovodíků – ty provázejí silnou automobilovou dopravu. Lokální znečištění aromatickými nitrosloučeninami je vyvoláno především úniky z technologií na jejich zpracování. Nachází se rovněž v cigaretovém kouři a vznikají i při úpravě některých potravin. Nitrofurany a nitroimidazoly jsou používány jako léčiva^[106].

Z hlediska vlivu na zdraví člověka mohou být aromatické nitrosloučeniny někdy považovány za jednotnou skupinu sloučenin. Jednotliví zástupci však vykazují speciální působení, které vyplývá z heterogenity jejich metabolismu a enzymů podílejících se na tomto procesu v organismech. Většina aromatických nitrosloučenin vykazuje mutagenní aktivitu v bakteriálních i savčích systémech, řada z nich vykazuje i karcinogenní aktivitu, jež vyvolává nádorové procesy především v játrech, plicích a prsních žlázách. Jejich podíl

na vývoji nádorových procesů v lidském organismu se nepodařilo doposud jednoznačně prokázat, ale epidemiologické studie u pacientů trpících nádorovým onemocněním prsu a plic naznačují potenciální podíl těchto sloučenin na etiologii onemocnění u obyvatelstva žijícího v prostředí jimi kontaminovaném^[106].

1.5.1 NITROAROMÁTY A JEJICH VLIV NA LIDSKÉ ZDRAVÍ

Národním toxikologickým programem USA byly označeny jako silně podezřelé karcinogeny pro lidský organismus tyto sloučeniny: 2-nitroanisol, 1-nitropyren, 4-nitropyren, 1,6-dinitropyren, 1,8-dinitropyren, 6-nitrochrysen a nitrofen. Z dalších fyziologicky účinných nitroaromátů je nutné zmínit rostlinné produkty aristolochové kyseliny a léčiva používaná v humánní a veterinární medicíně, nitrofurany a nitroimidazoly^[106].

Nitropyreny jsou polutanty obsažené v ovzduší. 1-nitropyren je jedna z hlavních mutagenních komponent ve výfukových plynech, zatímco dinitropyreny jsou složkami minoritními. Všechny mono- a dinitropyreny jsou pro experimentální zvířata karcinogenní. Z těchto sloučenin jsou nejnebezpečnější 1-nitropyren, který je dokonce spojován s vývojem nádorového onemocnění (plicní nádory) v lidském organismu a 6-nitrochrysen iniciující v organismech experimentálních zvířat nádory plic, jater a prsních žláz^[106].

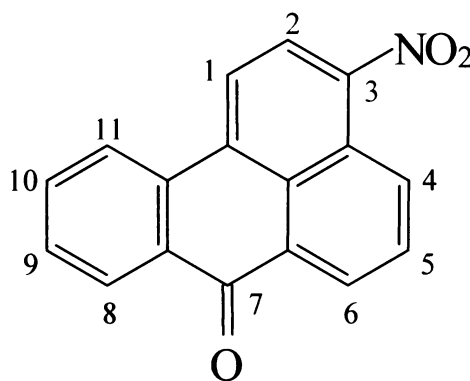
4-nitrobifenyl a jeho redukční derivát 4-aminobifenyl jsou polutaty pracovního prostředí chemického průmyslu, vyvolávající nádory močového měchýře. Nitrofen byl dlouhodobě používán jako kontaktní herbicid v ochraně kulturních plodin, jako jsou rýže, květák, brokolice, zelí, cibule, česnek a celer. Vzhledem k jeho hromadění v půdě, její kontaminaci a také kontaminaci samotných zemědělských produktů a silným karcinogenním účinkům nitrofenu na experimentální zvířata bylo jeho používání zakázáno^[106].

Nitrofurany a nitroimidazoly jsou používány v lidské a veterinární medicíně pro své antibakteriální účinky. 5-nitroimidazoly jsou účinné proti *Trichomonas vaginalis* a dalším infekčním onemocněním člověka. Misoimidazol je využíván pro zvýšení účinnosti v radiační chemoterapii. Nitroimidazoly vykazují v bakteriálních testech mutagenní aktivitu, ale v savčích systémech je jejich mutagenita podstatně nižší^[106].

Mezi velmi nebezpečné nitroaromáty patří i některé přírodní produkty. Aristolochové kyseliny nacházející se v listech a kořenech rodu *Aristolochia* jsou jedním z příkladů. Jejich fatální použití v terapii nadváhy pomocí čínských bylin vedlo k vývoji ledvinového selhání a nádorů močových cest. Farmaceutické používání těchto látek bylo proto také zakázáno^[106].

1.5.1.1 3-NITROBENZANTHRON

3-nitrobenzanthron (3-NBA, 3-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on, **Obr. 12**), polycyklická aromatická nitrosloučenina, je jedním z nejsilnějších mutagenů, který je i karcinogenem pro hlodavce^[13, 33, 70]. Jeho genotoxicita byla prokázána v řadě testů na mutagenitu^[5, 56, 79] a potenciálem tvořit specifické adukty s DNA, detekované v experimentech *in vitro*, v buněčných kulturách, *in vivo* v organismu laboratorního potkana^[4, 6, 7, 10, 12, 18, 20, 21, 32, 52]. Vyskytuje se ve složkách životního prostředí a jako součást výfukových plynů byl prokázán teprve nedávno^[33]. Tvořen je pravděpodobně buď nedokonalým spalováním nafty nebo reakcí parentálního polycyklického uhlovodíku s oxidy dusíku z atmosféry^[33]. Výskyt 3-NBA je však



Obr. 12 Vzorec 3-nitrobenzanthronu

daleko širší. Nedávno byl detekován také v půdě na zemském povrchu a jako součást srážkových vod^[67, 68, 117]. Tato sloučenina tedy ohrožuje velké skupiny lidské populace. Vyšší riziko jeho toxického působení připadá na skupiny obyvatelstva působící v pracovním prostředí některých odvětví. Ohroženi jsou především profesionální řidiči, pracovníci garáží, mechanici či horníci^[88]. Jako marker vystavení populace 3-NBA by mohl sloužit jeho redukční metabolit 3-aminobenzanthron (3-ABA). Ten byl nedávno detekován v moči pracovníků solných dolů vystavených působení výfukových plynů^[88]. I u této sloučeniny byla prokázána její genotoxicita^[10]. 3-NBA vstupuje do organismu hlavně inhalační cestou, rizikovým orgánem jsou tedy především plíce^[19].

3-NBA a jeho redukční metabolit 3-ABA jsou schopné generovat adukty s DNA.

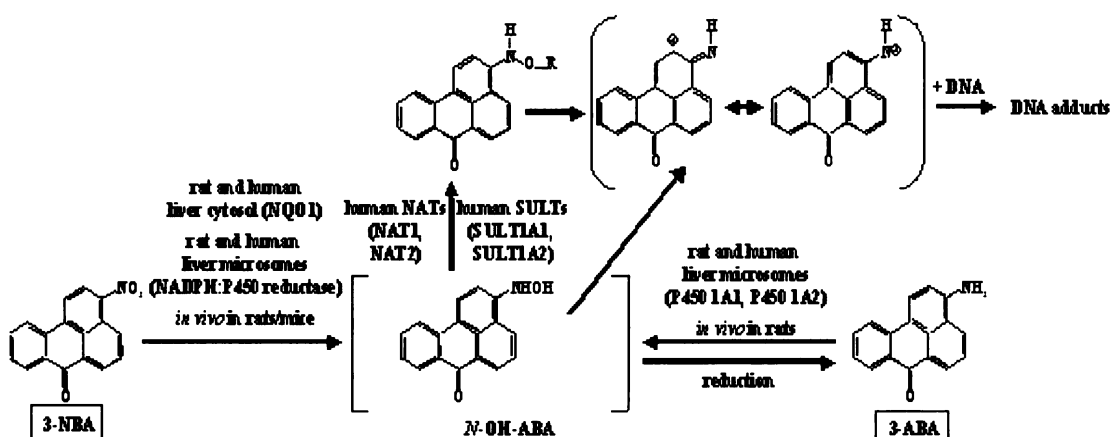
Ty byly detekovány jak v experimentech *in vitro*, tak i *in vivo* v různých tkáních laboratorních potkanů, kterým byly tyto sloučeniny aplikovány intraperitoneálně a intratracheálně^[4, 6, 7, 10, 11, 12, 18 19, 20, 21, 33].

Metabolismus 3-NBA

Předpokládaná cesta metabolické aktivace 3-NBA a 3-ABA za tvorby aduktů s DNA je uvedena na **Obr. 13**. Biotransformace 3-NBA probíhá zřejmě zejména redukční cestou. $-\text{NO}_2$ skupina je redukována na $-\text{NHOH}$. N-hydroxylamin je nestabilní, rozpadá se na nitreniový ion, který buď sám nebo po přeměně na ion karbéniový reaguje s nukleofilními centry DNA za tvorby aduktů. Tvorba nitreniového iontu je zvýšena konjugací s aktivním sulfátem nebo acetátem^[8].

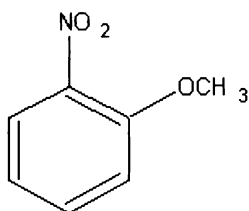
N-hydroxylamin může být redukován až na 3-ABA, který může být naopak oxidován za vzniku N-hydroxylaminu.

Metabolická aktivace 3-NBA a 3-ABA probíhají v organismu enzymově katalyzovanými reakcemi. Enzymy participující na aktivaci těchto sloučenin byly určeny teprve nedávno. Jedná se o cytochromy P450 (oxidují 3-ABA na N-hydroxylamin), NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasu a DT-diaforasu (redukují 3-NBA na N-hydroxylamin)^[11, 12].



Obr. 13 Předpokládaná cesta metabolické aktivace 3-NBA a 3-ABA^[11]

1.5.1.2 2-NITROANISOL



Obr. 14 Vzorec 2-nitroanisolu

2-nitroanisol (1-methoxy-2-nitrobenzen, **Obr. 14**) je primárně používán jako prekurzor při výrobě 2-anisidinu (2-methoxyanilinu). Je tedy používán v barvářském průmyslu při výrobě azobarviv^[106]. Je rovněž používán ve farmaceutickém průmyslu jako meziprodukt při syntéze některých léčiv^[106]. Patří mezi látky toxické a karcinogenní^[29, 48], se kterými se běžně setkáváme jak v pracovním prostředí (chemický průmysl), tak v prostředí životním, kde přispívají k lokálnímu a regionálnímu znečištění (výfukové plyny automobilů, úniky z technologií)^[105]. Zájem mnoha vědeckých pracovišť o tuto látku byl vyvolán v roce 1993 havárií ve firmě Hoechst v Německu, při které došlo k masivnímu úniku 2-nitroanisolu a k velkému lokálnímu znečištění touto sloučeninou^[105].

2-nitroanisol je látka toxická. Jeho působení způsobuje methemoglobinemii, což je onemocnění, při kterém dochází ke vzrůstu koncentrace methemoglobinu, jehož železo v mocenství 3⁺ není schopno vázat kyslík, a urychlené destrukci erytrocytů, což způsobuje poruchy dýchání^[106]. V dětské populaci žijící v oblasti nehody byl zaznamenán nárůst výskytu atopického ekzému, dokonce i zhoršení latentní formy a vývoj nových typů tohoto onemocnění po 1,5 roku od havárie^[83].

2-nitroanisol je karcinogenem vyvolávajícím u myší a potkanů tvorbu nádorů močového měchýře, v menší míře také sleziny, jater a ledvin. Je jen slabě mutagenní v Amesově testu pro kmen *Salmonella typhimurium*, u dalších kmenů nebyla mutagenní aktivita prokázána vůbec. Tato látka vykazuje také malou aktivitu v cytogenetických testech, kdy pouze při velkých koncentracích indukuje nepatrný nárůst chromosomálních aberací a sesterských chromatidových výměn^[106]. Tyto výsledky spolu se známým silným karcinogenním účinkem 2-nitroanisolu vyvolávají otázku, jakým mechanismem se tato sloučenina uplatňuje v procesu kancerogeneze, zda je tato látka karcinogenem genotoxickým či epigenetickým a jaké fáze kancerogeneze se vlastně účastní^[105].

U požárníků pracujících na místě nehody, vystavených tedy zvýšené koncentraci 2-nitroanisolu, byl pozorován nárůst jednořetězcových zlomů v DNA, který po třech

měsících od nehody poklesl na normální hladinu, pravděpodobně díky DNA opravným mechanismům^[40].

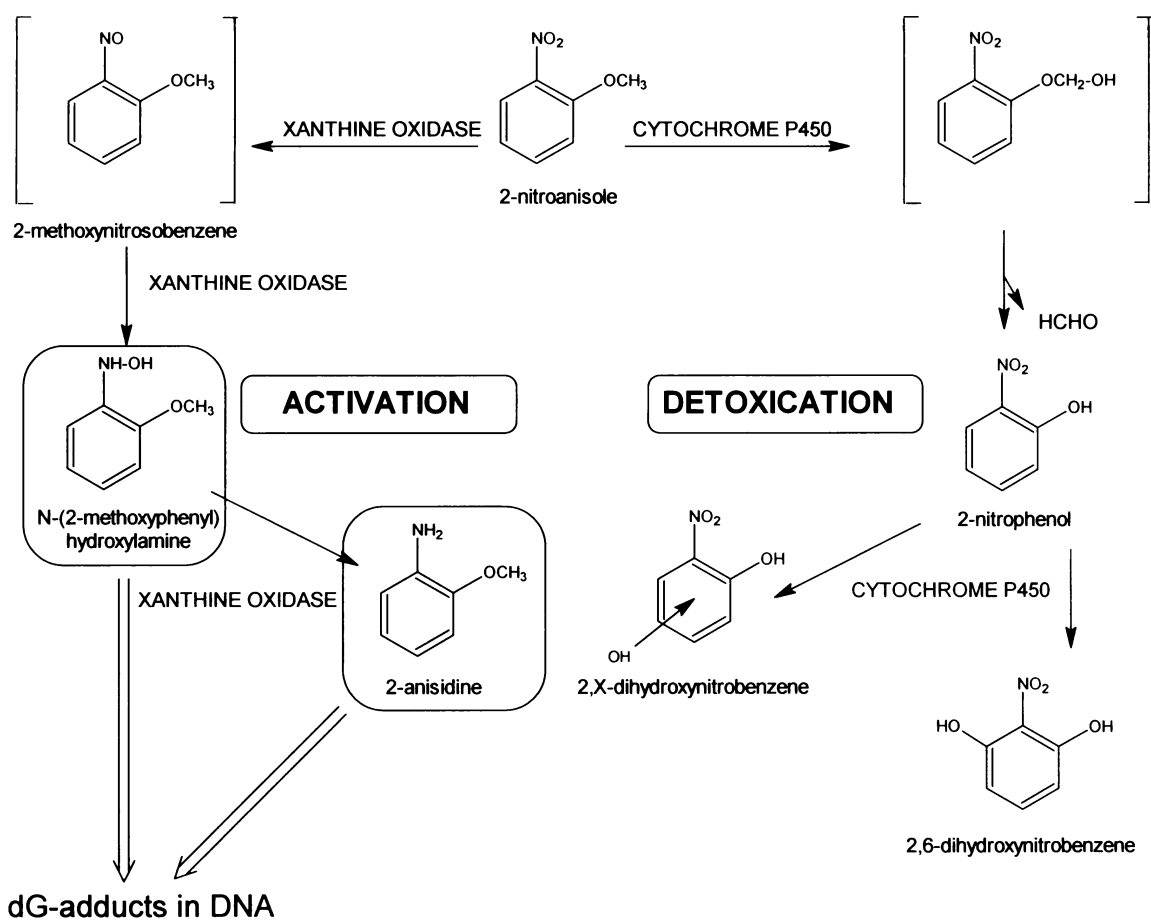
Model mechanismu kancerogeneze 2-nitroanisolu

Analýzou typu indukce tvorby nádorů močového měchýře způsobených 2-nitroanisoem byla zjištěna viditelná shoda s typem kancerogeneze pozorované u dobře prostudovaného karcinogenu stejného orgánu A-[4-(5-nitro-2-furyl)-2-thiazolyl]formamidu (FAFNT). U této sloučeniny byl navržen model dvoustupňového procesu kancerogeneze, to znamená, že FAFNT zasahuje jak do iniciační fáze procesu vzniku nádoru modifikací DNA cílových buněk, tak do promoční fáze stimulací proliferace cílových buněk^[47]. Tento navržený model však dosud pro FAFNT ani pro 2-nitroanisol nebyl experimentálně prokázán.

Metabolismus 2-nitroanisolu:

Hlavní cesta metabolismu 2-nitroanisolu *in vivo* je jeho oxidační demethylace na 2-nitrofenol, který je vylučován z těla močí ve formě buď sulfátového konjugátu vytvořeného reakcí s fosfoadenosinfosulfátem katalyzovanou enzymem sulfotransferasou, anebo konjugátu s kyselinou glukuronovou vzniklého reakcí s UDP-glukuronovou kyselinou^[65]. Druhou cestou metabolismu je redukce 2-nitroanisolu na 2-anisidin (2-methoxyanilin), která ovšem probíhá v daleko menší míře (necelé 1 %), a to v játrech^[96]. Za vyšších dávek může oxidační cesta metabolismu dosáhnout saturace, což vede k úměrně větší tvorbě 2-anisidinu.

In vitro byla zjištěna jak tvorba oxidačních, tak i redukčních metabolitů (**Obr. 15**). 2-nitroanisol je cytochromy P450 oxidován na 2-nitrofenol, který je dále opět cytochromy P450 oxidován za vzniku dvou metabolitů – 2,6-dihydroxynitrobenzenu a 2,X-dihydroxynitrobenzenu. Tato cesta je detoxikační. 2-nitroanisol může být také redukován xanthinoxidasou. Vzniká N-(2-methoxyfenyloxy)-hydroxylamin, který buď sám nebo přeměněn na 2-anisidin tvoří kovalentní adukty s DNA^[63, 64, 103].

Obr. 15 Schéma metabolismu 2-nitroanisolu ^[64]

2 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce bylo rozšířit poznatky o metabolismu aromatických nitrosloúčenin, karcinogenních látek 3-nitrobenzanthronu (3-NBA) a 2-nitroanisolu. Konkrétními cíli bylo:

- Studie redukce 3-nitrobenzanthronu lidskou rekombinantní DT-diaforasou (NQO1).
- Studie metabolismu 3-nitrobenzanthronu potkaním jaterním mikrosomálním systémem.
- Identifikace oxidačního metabolitu 2-nitroanisolu vznikajícího mikrosomálními cytochromy P450.

Diplomová práce byla řešena jako součást grantového vědeckého projektu podporovaného GAČR (grant 303/05/2195), který je zaměřen na studium mechanismu působení 3-nitrobenzanthronu na lidský organismus. Výsledky získané v rámci této diplomové práce byly prezentovány formou plakátového sdělení na X. Pracovním setkání biochemiků a molekulárních biologů v Brně (8. 2. - 9. 2. 2006).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 MATERIÁL

Chemikálie a materiál, které byly použity v experimentech, pocházejí z těchto zdrojů:

- **Chemopetrol, Česká republika**
suchý led

- **Firma RNDr. Jan Kulich, Česká republika**
Folinovo činidlo

- **Fluka, Švýcarsko**
metanol, 2-nitroanisol, tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), Tween 20

- **Lachema, Česká republika**
aceton, citrát sodný, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, deoxycholát sodný, dithioničitan sodný, etanol, éter, glycerol, KH_2PO_4 , KOH, KCl, MgCl_2 , Na_2CO_3 , NaOH, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, kyselina askorbová, kyselina citrónová, kyselina chlorovodíková, kyselina sírová, vínan sodnodraselný

- **Linde, Česká republika**
dusík (g), kapalný dusík, oxid uhelnatý

- **Merck, Německo**
etylacetát

- **Sevapharma, Česká republika**
hovězí sérový albumin (BSA)

- **Serva, Německo**
lidský sérový albumin (HSA)

- **Sigma, USA**
butanol, dimethylsulfoxid (DMSO), fenacetin, glukosa-6-fosfát, glukosa-6-fosfát dehydrogenasa, lidská rekombinantní DT-diaforasa, nikotinamidadeninukleotidfosfát (NADP⁺), nikotinamidadeninukleotidfosfát – redukovaná forma (NADPH), 2-nitrofenol

- **Veb Laborchemie Apolda, Německo**
kyselina chloristá

- 3-nitrobenzanthron a 3-aminobenzanthron – dar Doc. H.H. Schmeisera, Německé centrum pro výzkum rakoviny v Heidelbergu

- jaterní mikrosomy potkana a králíka – izolovány kolegy v laboratoři, PřF UK, katedra biochemie

3.2 PŘÍSTROJE

- **Centrifugy:**
 - K23, Janetzki, Německo (výkyvný rotor)
 - K24, Janetzki, Německo (úhlový rotor)
 - T52.2, MLW, Německo (výkyvný rotor)
 - Optima LE-80K Ultracentrifuge, Beckman Coulter, USA (úhlový rotor Ti 45)
 - Microcentaur MSE, Sanyo, UK (úhlový rotor)

➤ **Spektrofotometry:**

Hewlett Packard E8453, USA

Spektromom 195 D, MOM, Maďarsko

Specord M40, Carl-Zeiss Jena, Německo

Specord M42, Carl-Zeiss Jena, Německo

➤ **Váhy:**

PESA 40SM-200A, Švýcarsko (analytické váhy)

KERN EW600-2M, Německo (předvážky)

➤ **System HPLC:**

pumpa: Dionex pump P580

ASI-100 Automated Sample Injector

UV/VIS Detector UVD 170S/340S, USA

termobox pro kolonu: COLUMN OVEN LCO 101

kolona: Macherey-Nagel, Německo - nukleosil 100-5 C18 HD (4 x 250 mm)

program Chromeleon™ 6.01

➤ **Další přístroje:**

pH metr ATI Orion 370 s kombinovanou elektrodou, USA

magnetická míchačka Variomag, Monotherm, Německo

homogenizátor dle Pottera a Elvehjema

sonikátor Teson1, Tesla

Vortex MS 1 Minishaker, Schiller Pharma

Vortex Genius 3, IKA

inkubátor Thermomixer compact, Eppendorf, Německo

automatické mikropipety: Biohit, Finsko

Nichiryō Nichipet EX, Japonsko

vakuová odparka Laborota 4002 digital s manostatem, Heidolph, Německo

bodotávek Melting Point B-545, Büchi, Švýcarsko

3.3 METODY

3.3.1 ISOLACE MIKROSOMÁLNÍ FRAKCE JATER KRÁLÍKA A POTKANA

Použité pufrы: pufr P1 (2000 ml): 150 mM KCl, 50 mM Tris, pH 7,4

pufr P2 (1000 ml): 0,1 M Na₄P₂O₇ · 10 H₂O, pH 7,2

pufr P3 (100 ml): 150 mM KCl, 50 mM Tris, 20 % glycerin, pH 7,4

Mikrosomální frakce byla izolována diferenční centrifugací homogenátu jaterní tkáně modifikovaným postupem podle Lindström-Seppä^[59]. Celý proces probíhal při teplotě 6°C a používané roztoky a pomůcky byly předem vychlazeny.

Zvířata byla narkotizována oxidem uhličitým a poté usmrcena stržením vazů (Stiborová, ústní sdělení). Jaterní tkáň byla rozstříhána na malé kousky a několikrát propláchnuta pufr P1. Došlo k částečnému odkrvení tkáně, která byla dále po malých částech homogenisována v homogenisátoru dle Pottera a Elvehjema s teflonovým pístem s objemem (ml) pufru P1 odpovídajícím čtyřnásobné hmotnosti (g) jater. Homogenát byl filtrován přes 4x složenou gázu a centrifugován při 600 x g po dobu 10 minut při teplotě 4°C [centrifuga Janetzki K-23 (Německo) s výkyvným rotorem, 4 x 70 ml, 2 000 RPM]. Peleta byla rehomogenisována v těsnějším homogenisátoru v malém množství pufru P1 a centrifugována za výše uvedených podmínek. Spojené supernatanty byly odstředěny 20 minut při 15 000 x g [centrifuga Janetzki K-24 (Německo) s úhlovým rotorem, 6 x 35 ml, 13 500 RPM]. Supernatanty byly centrifugovány po dobu 60 minut při 105 000 x g (ultracentrifuga Beckman Optima LE-80K s úhlovým rotorem Ti 45, 6 x 65 ml, 45 000 RPM). Peleta mikrosomů byla přenesena do malého homogenisátoru (dle Pottera a Elvehjema, objem 25 ml) a resuspendována s pufr P2 (dvojnásobný objem původní hmotnosti orgánu). Homogenní suspenze byla opět odstředěna 60 minut při 105 000 x g (viz výše zmíněné podmínky). Mikrosomální peleta byla přenesena do malého homogenisátoru (dle Pottera a Elvehjema, objem 25 ml) a resuspendována v pufru P3 (pětina objemu původní hmotnosti orgánu). Mikrosomy (1 ml alikvoty) byly zmrazeny

v kapalném dusíku a dále uskladněny při - 80°C.

3.3.2 STANOVENÍ KONCENTRACE CYTOCHROMU P450

Princip: Cytochrom P450 vykazuje v redukovaném stavu v komplexu s CO absorpční maximum při vlnové délce 450 nm. Na základě této vlastnosti se stanovuje koncentrace cytochromu P450 metodou diferenčních spektroskopie^[76].

Postup: Do zkumavky bylo pipetováno podle odhadnutého ředění měřeného vzorku n ml (0,05 – 1,0 ml vzorku) a doplněno pufrem do 2 ml. Dále bylo přidáno 5 mg dithioničitanu sodného, čímž proběhla redukce cytochromu P450. Po promíchání byl roztok rozdělen do dvou kyvet s optickou drahou 1 cm. První kyveta sloužila jako srovnávací, roztok v druhé kyvetě byl sycen proudem CO (g) po dobu 60 sekund. Následně bylo na dvoupraprskovém spektrofotometru Specord M-40 měřeno diferenční spektrum v rozsahu vlnových délek 400 – 510 nm. Koncentrace cytochromu P450 byla vypočtena ze získaných absorbancí podle vzorce:

$$c_{P450} = (A_{450} - A_{490} / \epsilon_{P450}) \cdot \text{ředění} \quad [\mu\text{M}]$$

c_{P450}koncentrace cytochromu P450

A_{450}absorbance při vlnové délce 450 nm

A_{490}absorbance při vlnové délce 490 nm

ϵ_{P450}molární absorpční koeficient cytochromu P450 ($\epsilon = 0,091 \text{ mmol}^{-1} \cdot \text{dm}^3 \cdot \text{cm}^{-1}$)

3.3.3 STANOVENÍ KONCENTRACE PROTEINU^[60]

Princip: Bílkoviny přítomné ve vzorku se rozpustí v alkalickém roztoku deoxycholátu sodného a následně reagují po přidání Folinova činidla (roztok fosfomolybdenové a fosfowolframové kyseliny) za vzniku modré rozpustné sloučeniny^[60].

Postup: 100 μl vzorku bylo ředěno do 0,5 ml destilovanou vodou, pak bylo přidáno 0,15 ml 2 % deoxycholátu sodného (w/v) a 0,15 ml 2 M NaOH. Vše bylo promícháno a

ponecháno 10 minut stát. K roztoku byly přidány 3 ml čerstvě připraveného alkalického činidla [0,5 ml 1 % roztoku $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (w/v) + 0,5 ml 2 % roztoku vlnanu draselinosodného (w/v) + 49 ml 2 % roztoku Na_2CO_3 (w/v)], znovu bylo vše promícháno a ponecháno 10 minut stát. Následně bylo k roztoku přidáno 0,3 ml Folinova činidla (těsně před použitím bylo ředěno v poměru 1:1 destilovanou vodou), roztok byl promíchán a nechán stát 30 minut. Po uplynutí této doby byla ihned měřena absorbance (Spektromom 195 D, MOM, Maďarsko) vzorku při 550 nm oproti „slepému“ vzorku obsahujícímu destilovanou vodu namísto měřeného vzorku. Jako standard byl připraven roztok BSA o koncentraci 0,8; 0,4; 0,2; 0,1; 0,05; 0,025 a 0,0125 mg/ml.

Ze získané kalibrační křivky byly určeny hodnoty koncentrace proteinu ve vzorcích podle vztahu:

$$c_b = A_{550} (\text{vzorek}) / A_{550} (\text{standard}) c_{\text{BSA}} \cdot \text{ředění [mg/ml]}$$

c_b – koncentrace bílkoviny

A_{550} – absorbance při vlnové délce 550 nm

c_{BSA} – koncentrace standardu

3.3.4 STUDIUM METABOLISMU 3-NBA LIDSKOU REKOMBINANTNÍ DT-DIAFORASOU

Složení inkubační směsi:

- pufr 50 mM TRIS/HCl + 0,4 % Tween 20, pH 7,4
- 1 mM NADPH
- roztok DT-diaforasy v pufru (od 5 µg/ml do 100 µg/ml)
- roztok 3-NBA v DMSO (od 5 µM do 50 µM)

Inkubační směs o objemu 0,5 ml obsahovala: pufr (50 mM TRIS/HCl + 0,4 % Tween 20, pH 7,4), 50 µl 10 mM NADPH a různé množství zásobního roztoku DT-diaforasy (0,25 mg/ml). Nad směsí byla vytvořena inertní atmosféra pomocí dusíku (g). Po 15 minutách inkubace směsi při 37°C byla reakce startována přidáním 5 µl

2 mM 3-NBA a směs inkubována po dobu 60 minut (Thermomixer compact eppendorf, 400 RPM, 37°C).

Reakce byla ukončena přidáním 1 ml etylacetátu a produkty reakce extrahovány do tohoto organického rozpouštědla. Dále bylo k směsi přidáno 5 μ l 1 mM fenacetinu jako vnitřního standardu a opakována extrakce produktů spolu s interním standardem do etylacetátu. Směs byla centrifugována 3 minuty při 13 000 RPM (minicentrifuga MicroCentaur MSE, úhlový rotor). Po oddělení organické fáze s produkty reakce byl k vodné fázi přidán opět 1 ml etylacetátu a provedena další extrakce stejným postupem.

Spojené extrakty byly odpařeny. Těsně před analýzou byly odparky rozpuštěny ve 30 μ l metanolu. Metabolity byly separovány pomocí HPLC (aplikováno 20 μ l).

Při zjišťování závislosti přeměny 3-NBA na koncentraci DT-diaforasy obsahovala inkubační směs 5, 10, 20, 30, 40 a 100 μ g/ml DT-diaforasy. V případě zjišťování vlivu doby inkubace na metabolismus 3-NBA byla inkubační směs inkubována 15, 30 a 60 minut. Pro zjištění vlivu koncentrace 3-NBA na jeho metabolickou přeměnu pomocí DT-diaforasy o koncentraci 40 μ g/ml byla použita koncentrace 3-NBA v inkubační směsi 5, 10, 20 a 50 μ M. V případě zjišťování vlivu pH na přeměnu 20 μ M 3-NBA DT-diaforasou o koncentraci 40 μ g/ml byly použity pufrы o pH 5,0; 6,0; 7,4 a 8,4.

3.3.4.1 PŘÍPRAVA STANDARDNÍCH ROZTOKŮ 3-NBA A 3-ABA PRO HPLC

K 25 μ l metanolu bylo přidáno 5 μ l 2 mM 3-NBA (resp. 5 μ l 1 mM 3-ABA). Takto připravené roztoky byly promíchány na Vortexu a centrifugovány 3 minuty při 13 000 RPM (centrifuga Microcentaur MSE, úhlový rotor).

3.3.4.2 VYSOKOÚČINNÁ KAPALINOVÁ CHROMATOGRFIE (HPLC)

K separaci látek obsažených v jednotlivých inkubačních vzorcích byla použita metoda RP-HPLC na koloně C₁₈ (Macherey-Nagel, SRN) při teplotě 35°C. Jako mobilní fáze byl použit 70 % metanol. Rychlost průtoku mobilní fáze při měření byla 0,6 ml/min a jednotlivé složky inkubačních směsí byly detekovány při vlnové délce 254 nm. Vzorky

byly aplikovány v množství 20 μ l.

3.3.5 STUDIUM VLIVU LIDSKÉHO SÉROVÉHO ALBUMINU NA METABOLISMUS 3-NBA LIDSKOU REKOMBINATNÍ DT-DIAFORASOU

Složení inkubační směsi:

- pufr 50 mM TRIS/HCl + 0,4 % Tween 20, pH 7,4
- 1 mM NADPH
- 40 μ g/ml DT-diaforasa
- 0,25 mg HSA v pufru (50 mM TRIS/HCl, pH 7,4)
- 20 μ M 3-NBA v DMSO

Inkubační směs o objemu 0,5 ml obsahovala: pufr (50 mM TRIS/HCl + 0,4 % Tween 20, pH 7,4), 50 μ l 10 mM NADPH, 80 μ l zásobního roztoku DT-diaforasy (0,25 mg/ml) a popř. 10 μ l roztoku HSA. Nad směsí byla vytvořena inertní atmosféra pomocí dusíku (g). Po 15 minutách inkubace směsi při 37°C byla reakce startována přidáním 5 μ l 2 mM 3-NBA a směs inkubována po dobu 60 minut (Thermomixer compact eppendorf, 400 RPM, 37°C). Další postup byl stejný jako při studiu metabolismu 3-NBA NQO1 (kapitola 3.3.4).

Pro zjištění vlivu doby inkubace na metabolismus 3-NBA lidskou rekombinantní DT-diaforasou za přítomnosti HSA byla inkubační směs inkubována 60, 120 a 180 minut. Jako kontrolní vzorky byly použity inkubační směsi stejného složení s výjimkou HSA.

Ke studiu vlivu HSA na metabolismus 3-NBA lidskou rekombinantní DT-diaforasou byly při RP-HPLC užity stejné podmínky jako při studiu metabolismu 3-NBA lidskou rekombinantní DT-diaforasou (kapitola 3.3.4.2).

3.3.6 STUDIUM METABOLISMU 3-NBA MIKROSOMY JATER POTKANŮ PREMEDIKOVANÝCH FENOBARBITALEM, β -NAFTOFLAVONEM A NEPREMEDIKOVANÝCH ZVÍŘAT

Složení inkubační směsi:

- pufr - 50 mM TRIS/HCl, pH 7,4
- 1 mM NADPH
- mikrosomy (0,5 mg proteinu/ml)
- 20 μ M 3-NBA v DMSO

Inkubační směs o objemu 0,5 ml obsahovala: pufr (50 mM TRIS/HCl, pH 7,4), 50 μ l 10 mM NADPH a mikrosomy v takovém množství, aby inkubační směs obsahovala 0,5 mg proteinu/ml. Reakce byla startována přidáním 5 μ l 2 mM 3-NBA a směs inkubována (Thermomixer compact eppendorf, 400 RPM, 37°C). Další postup byl stejný jako při studiu metabolismu 3-NBA NQO1 (kapitola 3.3.4).

Pro zjištění vlivu doby inkubace na metabolismus 3-NBA jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem, β -naftoflavonem a nepremedikovaných zvířat byla inkubační směs inkubována po dobu 60, 120 a 180 minut.

Ke studiu metabolismu 3-NBA mikrosomy jater potkanů premedikovaných fenobarbitalem, β -naftoflavonem a nepremedikovaných zvířat byly při RP-HPLC užity stejné podmínky jako při studiu metabolismu 3-NBA lidskou rekombinantní DT-diaforasou (kapitola 3.3.4.2).

3.3.7 STUDIUM VAZBY 3-NBA AKTIVOVANÉHO LIDSKOU DT-DIAFORASOU NA PROTEINY

Ke studiu vazby 3-NBA aktivovaného lidskou DT-diaforasou na proteiny byly použity vodné fáze jednotlivých inkubací, které jsme získali po oddělení organické fáze

(kapitola 3.3.4). K inkubačním směsím byly po extrakci etylacetátem přidány 4 ml acetonu, roztok byl promíchán a centrifugován (centrifuga MLW 52.2 T, 8 000 RPM, 10 minut). Aceton byl odebrán. Peleta byla dvakrát promyta 1 ml acetonu, roztok byl promíchán a centrifugován za stejných podmínek (viz výše). Aceton byl opět odebrán a peleta promyta 2 ml 100 % etanolu. Směs byla promíchána a opět centrifugována za stejných podmínek. Etanol byl odebrán a k peletě přidány 2 ml 70 % etanolu. Roztok byl zamíchán a centrifugován za výše uvedených podmínek. Etanol byl odebrán a peleta dosušena v digestoři. Peleta byla rozpuštěna v 1 ml 1 M NaOH. Zkumavky s roztokem byly opatrně zahřáty na vodní lázni až do rozpuštění pelet.

Po vychladnutí roztoku byla proměřena absorpční spektra na spektrofotometru Hewlett Packard E8453. Jako blank byl použit 1 mM roztok NaOH.

Ve vzorcích byl stanoven obsah proteinu Lowryho metodou^[60] (kapitola 3.3.3).

3.3.8 PŘÍPRAVA 2,5-DIHYDROXYNITROBENZENU

2-nitrohydrochinon (2,5-dihydroxynitrobenzen) byl připraven metodou podle Elbse^[14,31]. 8,75 g o-nitrofenolu bylo rozpuštěno v 500 ml destilované vody. K roztoku bylo přidáno 14,2 g persíranu sodného a 12,5 g NaOH. Směs byla inkubována při laboratorní teplotě po dobu dvou dnů. Poté byla okyselena kyselinou sírovou. Nezreagovaný o-nitrofenol byl z reakční směsi odstraněn destilací s vodní parou a zbytky reakční směsi byly extrahovány do éteru. Éter byl odpařen na vakuové odparce (Laborota 4002, Heidolph) a výsledný produkt byl dvakrát rekrystalizován z vody. Poté byl přečištěn přes aktivní uhlí a znovu krystalizován z vody. Roztok s drobnými krystalky byl filtrován přes skládaný filtr a krystalky usušeny.

3.3.9 URČENÍ METABOLITU 2-NITROANISOLU TVOŘENÉHO JATERNÍMI MIKROSOMY KRÁLÍKA

Složení inkubační směsi:

- 0,1 M fosfátový pufr, pH 7,4 (směs 0,1 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ a 0,1 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$)
- 1 mM NADPH generující systém
- 1 mM 2-nitroanisol v metanolu
- 1 mM kyselina askorbová
- mikrosomy (koncentrace cytochromu v inkubační směsi 4 μM)

Pro studium přeměny 2-nitroanisolu mikrosomy jater králíka premedikovaného fenobarbitalem byly připraveny reakční směsi o objemu 100 μl . Inkubační směs obsahovala 0,1 M fosfátový pufr (pH 7,4), 10 μl NADPH generujícího systému (10 mM NADP^+ , 100 mM glukosa-6-fosfát, 1 U/ml glukosa-6-fosfát-dehydrogenasa, 100 mM MgCl_2 v destilované vodě), 10 μl 10 mM kyseliny askorbové ve vzorkovém pufru, mikrosomy (koncentrace cytochromu v inkubační směsi 4 μM) a 1 μl 100 mM roztoku 2-nitroanisolu v metanolu. Vzorky byly inkubovány 45 minut v otevřených mikrozkumavkách při teplotě 37°C. Po uplynutí této doby byla reakce ukončena přidáním 20 μl 0,6 M HClO_4 , vzniklá sraženina odstředěna 10 min při 13 000 RPM (centrifuga Microcentaur MSE, úhlový rotor). Takto připravené vzorky byly analyzovány pomocí HPLC.

Pro zjištění optimálních podmínek separace 2-nitroanisolu od jeho metabolitů bylo jejich chování při HPLC analyzováno separátně. K tomu byly připraveny následující roztoky.

K 27 μl metanolu byly přidány 3 μl 10 mM 2-nitroanisolu (resp. 3 μl 10 mM 2-nitrofenolu). Takto připravené roztoky byly promíchány na Vortexu a centrifugovány 3 minuty při 13 000 RPM (centrifuga Microcentaur MSE, úhlový rotor).

K 25 μl metanolu bylo přidáno 5 μl 10 mM 2,5-dihydroxynitrobenzenu. Takto

připravený roztok byly promíchán na Vortexu a centrifugován 3 minuty při 13 000 RPM (centrifuga Microcentaur MSE, úhlový rotor).

K separaci 2-nitroanisolu a jeho metabolitů byla použita metoda RP-HPLC na koloně C₁₈ (Macherey-Nagel, Německo) při teplotě 35°C. Mobilní fáze obsahovala 60 % metanolu a 40 % citrátového pufru (0,02 M kyselina citrónová a 0,02 M citrát sodný, pH 3,0). Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,5 ml/min a jednotlivé složky vzorkové směsi byly detekovány při vlnové délce 254 nm. Vzorky byly na kolonu aplikovány v množství 20 µl.

K určení dosud neznámého metabolitu 2-nitroanisolu, 2,X-dihydroxynitrobenzenu, bylo použito porovnání chromatografických vlastností tohoto metabolitu s vlastnostmi syntetizovaného 2,5-dihydroxynitrobenzenu. Inkubační směs 2-nitroanisolu s mikrosomy jater králíka premedikovaného fenobarbitalem byla analyzována pomocí HPLC, a to buď bez či za přítomnosti syntetizované sloučeniny. Inkubační směsi byly připraveny dle návodu (viz výše). K 30 µl této inkubační směsi bylo přidáno 5 µl 0,1 mM roztoku 2,5-dihydroxynitrobenzenu. Roztok byl zamíchán na Vortexu a 20 µl vzorku aplikováno na kolonu.

4 VÝSLEDKY

4.1 METABOLISMUS 3-NBA LIDSKOU REKOMBINANTNÍ DT-DIAFORASOU

Cílem této práce bylo rozšířit poznatky o efektivitě lidské DT-diaforasy (NQO1) v metabolismu 3-nitrobenzanthronu (3-NBA).

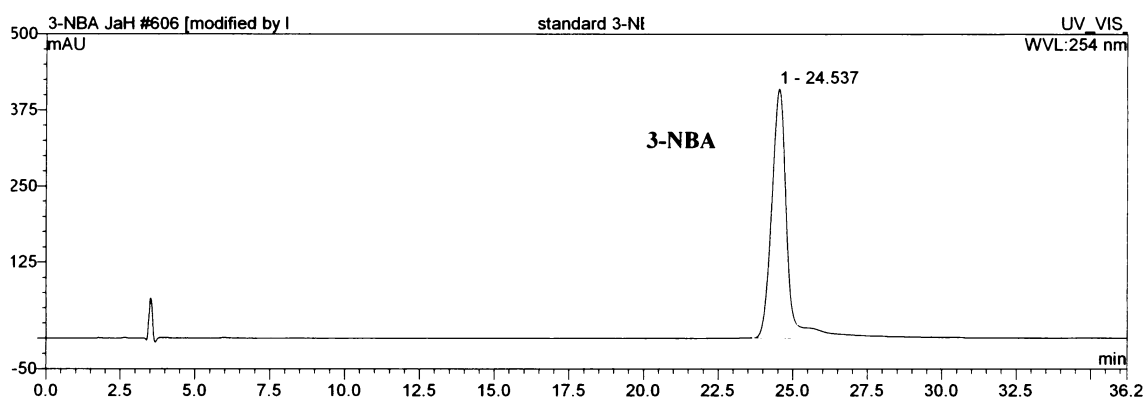
V experimentech byla použita lidská rekombinantní DT-diaforasa (NQO1). Zjistili jsme, že 3-NBA je DT-diaforasou přeměňován za tvorby jednoho metabolitu. Tento majoritní metabolit, 3-aminobenzanthron (3-ABA, viz kapitoly 4.1.1, 4.1.2 až 4.1.6 a 4.2.1), tvořený redukcí nitroskupiny 3-NBA, byl separován pomocí HPLC a detekován při vlnové délce 254 nm.

4.1.1 HPLC 3-NBA A 3-ABA

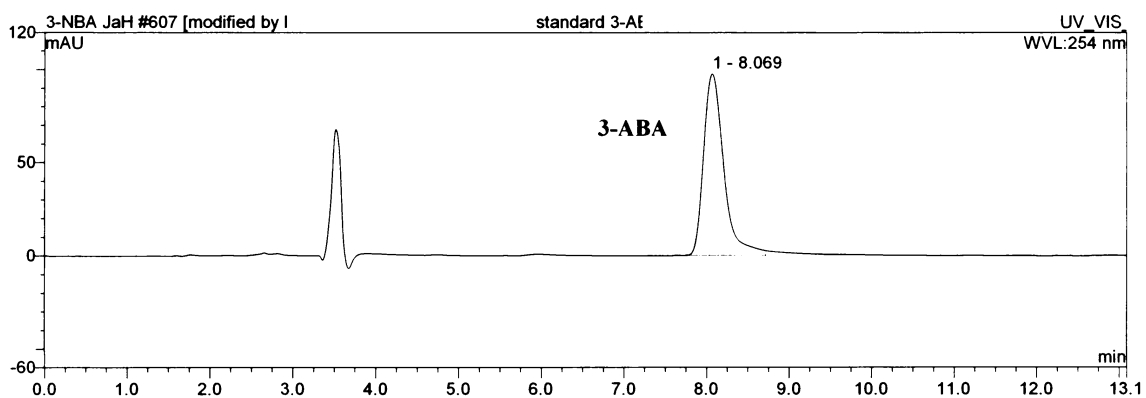
Pro zjištění optimálních podmínek separace 3-NBA od jeho redukčního partnera, 3-ABA, bylo nejdříve jejich chování při HPLC analyzováno separátně. K těmto experimentům byly jako standardy použity 3-NBA a 3-ABA syntetizované na partnerském pracovišti Německého centra výzkumu rakoviny (Heidelberg).

3-NBA je pomocí HPLC (podmínky HPLC jsou popsány v kapitole 3.3.4.2) eluován v retenčním čase 24,5 minut (**Obr. 16**).

3-ABA je eluován při HPLC za stejných podmínek uvedených v kapitole 3.3.4.2 v 8. minutě. HPLC probíhala za stejných podmínek jako v případě 3-NBA (viz výše). Výsledek analýzy HPLC je uveden na **Obr. 17**.



Obr. 16 HPLC 3-NBA. Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 70 % metanol, průtok 0,6 ml/min, kolona Macherey Nagel RP18, teplota 35°C, aplikováno 20 µl vzorku, detekce při 254 nm.

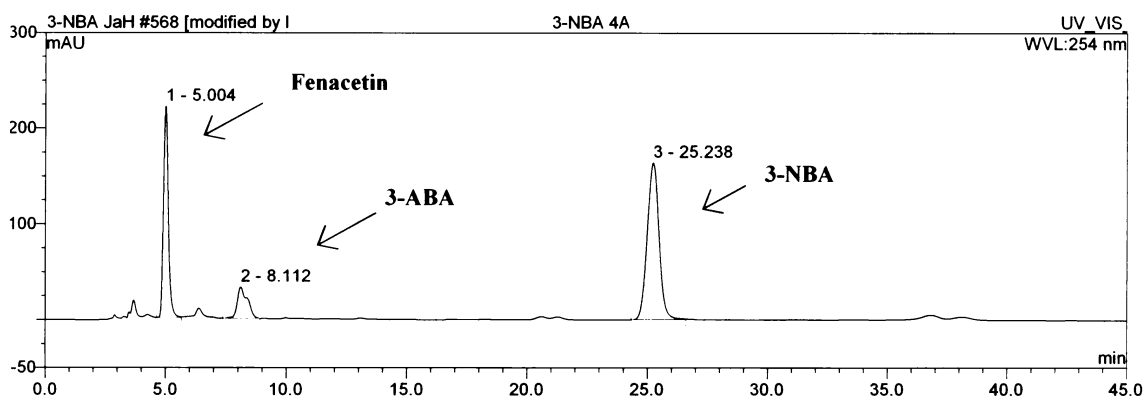


Obr. 17 HPLC 3-ABA. Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 70 % metanol, průtok 0,6 ml/min, kolona Macherey Nagel RP18, teplota 35°C, aplikováno 20 µl vzorku, detekce při 254 nm.

4.1.2 REDUKCE 3-NBA LIDSKOU REKOMBINANTNÍ DT-DIAFORASOU

3-NBA je lidskou rekombinantní DT-diaforasou redukován na 3-ABA. Obě sloučeniny byly detekovány jako dva separátní „píky“ pomocí HPLC (**Obr. 18**). Podmínky analýzy pomocí HPLC jsou uvedeny v kapitole 3.3.4.2. Retenční časy „píků“ obou sloučenin vznikajících inkubací 3-NBA s NQO1 byly identické s retenčními časy syntetizovaných standardů. V průběhu HPLC analýzy nebyly detekovány žádné další

„píky“, které by nasvědčovaly vzniku jiných metabolitů.

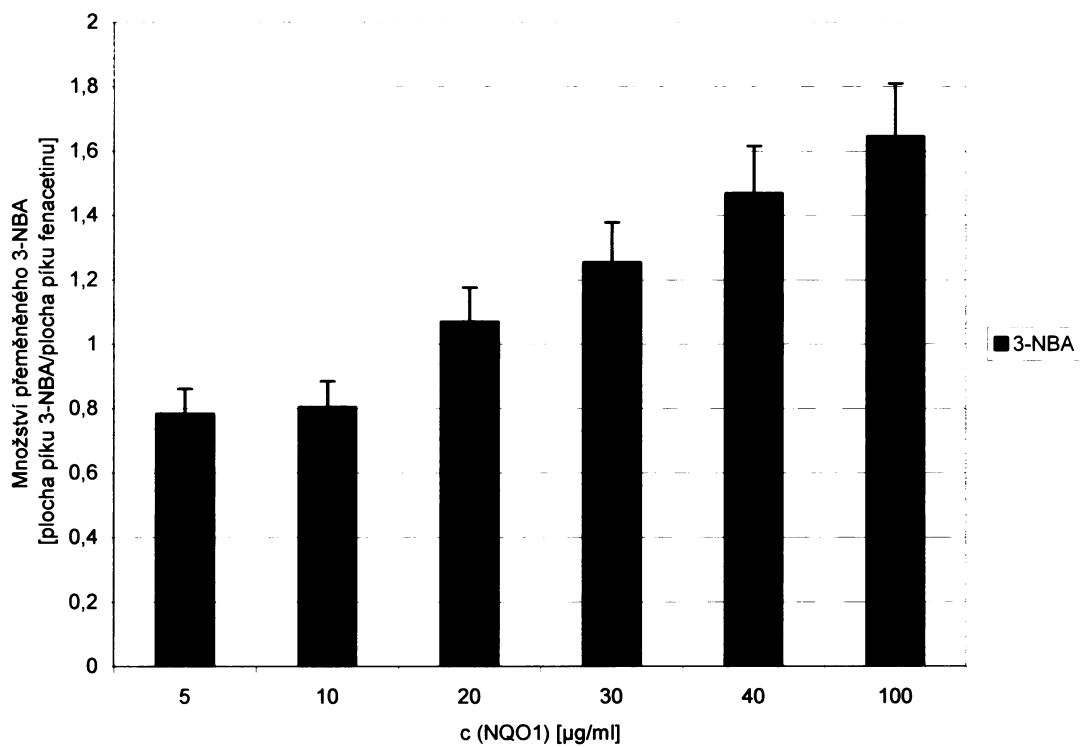


Obr. 18 HPLC směsi získané inkubací 3-NBA s NQO1 (složení inkubační směsi je uvedeno v kapitole 3.3.4). Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 70 % metanol, průtok 0,6 ml/min, kolona Macherey Nagel RP18, teplota 35°C, aplikováno 20 μ l vzorku, detekce při 254 nm.

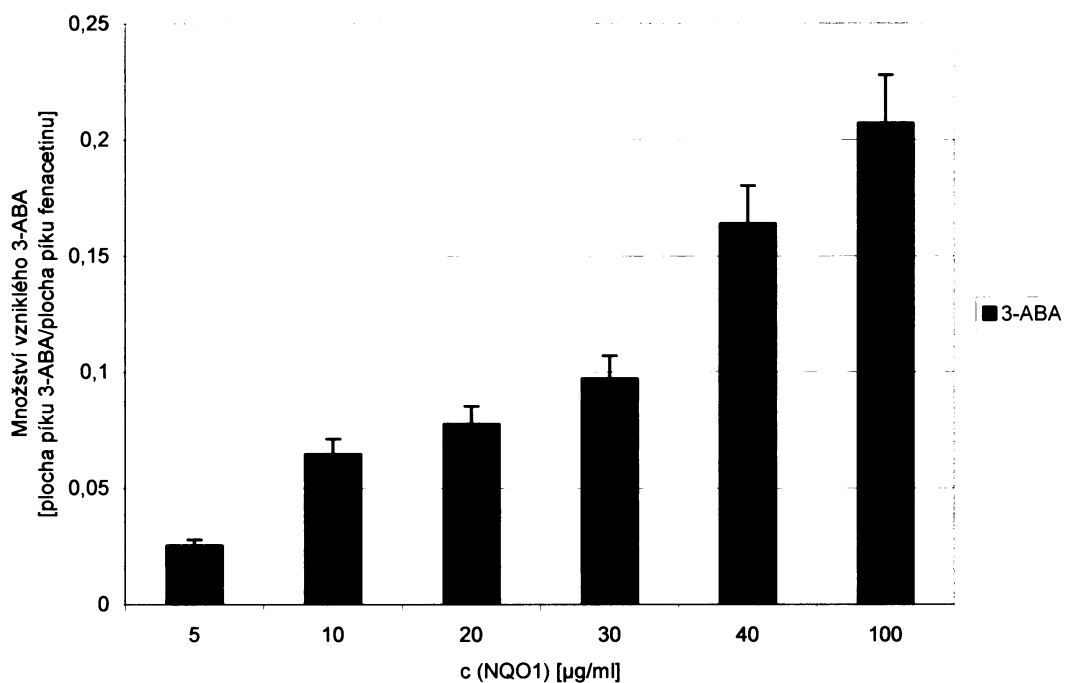
4.1.3 ZÁVISLOST PŘEMĚNY 3-NBA NA KONCENTRACI DT-DIAFORASY

Aby byla zjištěna závislost účinnosti přeměny 3-NBA DT-diaforasou na koncentraci enzymu, byly v inkubační směsi použity koncentrace lidské rekombinantní DT-diaforasy 5, 10, 20, 30, 40 a 100 μ g/ml. Výsledky analýz pomocí HPLC jsou uvedeny na **Obr. 19** a na **Obr. 20**.

Se zvyšující se koncentrací DT-diaforasy v inkubační směsi dochází ke zvýšení přeměny 3-NBA a současně ke zvyšování tvorby redukčního metabolitu (3-ABA). Pro další studie byla používána koncentrace DT-diaforasy 40 μ g/ml.



Obr. 19 Závislost přeměny 3-NBA na koncentraci NQO1. Sloupce uvedené v obrázku udávají množství přeměněného 3-NBA za 60 minut.

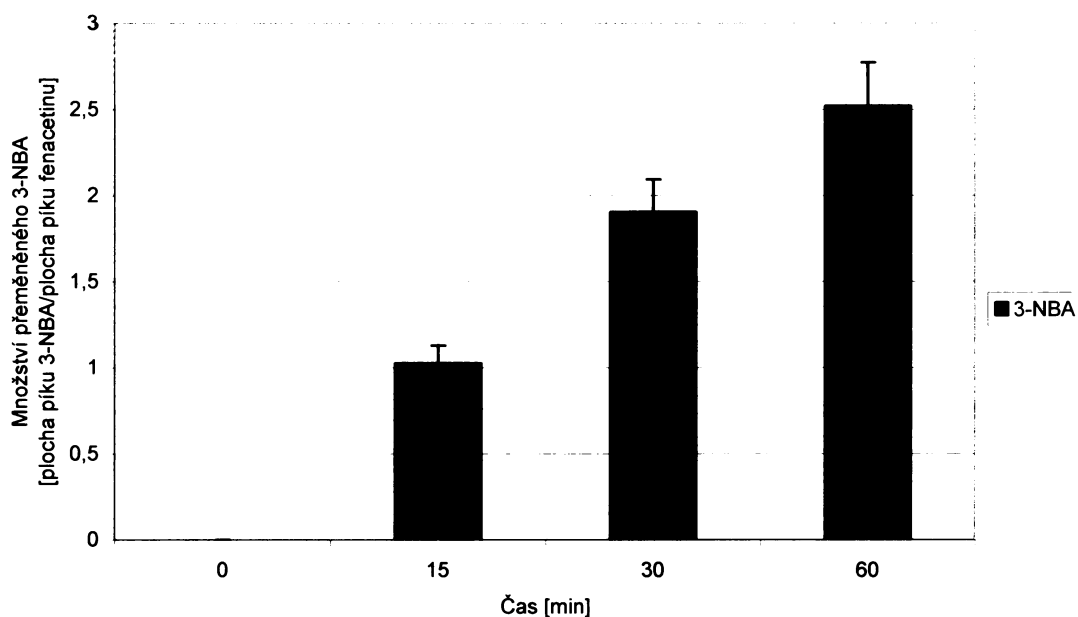


Obr. 20 Závislost přeměny 3-NBA na koncentraci NQO1. Sloupce uvedené v obrázku udávají množství vzniklého 3-ABA za 60 minut.

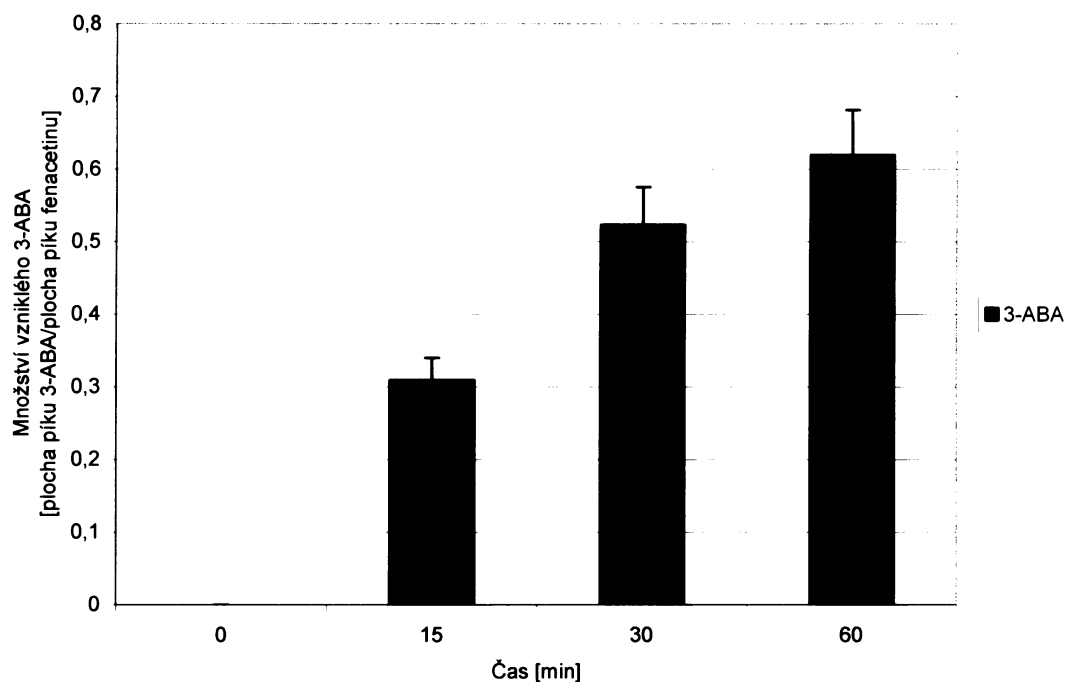
4.1.4 ZÁVISLOST PŘEMĚNY 3-NBA NA DOBĚ INKUBACE S DT-DIAFORASOU

Pro zjištění vlivu doby inkubace na přeměnu 3-NBA DT-diaforasou byla reakční směs inkubována po dobu 15, 30 a 60 minut. Výsledky analýz pomocí HPLC jsou uvedeny na **Obr. 21** a na **Obr. 22**.

Se zvyšující se dobou inkubace 3-NBA s NQO1 dochází ke zvýšení přeměny 3-NBA a k nárůstu množství vzniklého 3-ABA. Průběh reakce je lineární do 30 minut inkubace. Pokles 3-NBA v čase koreluje s přírůstkem jeho redukčního metabolitu, 3-ABA.



Obr. 21 Závislost přeměny 3-NBA na době inkubace s NQO1. Sloupce uvedené v obrázku udávají množství přeměněného 3-NBA.

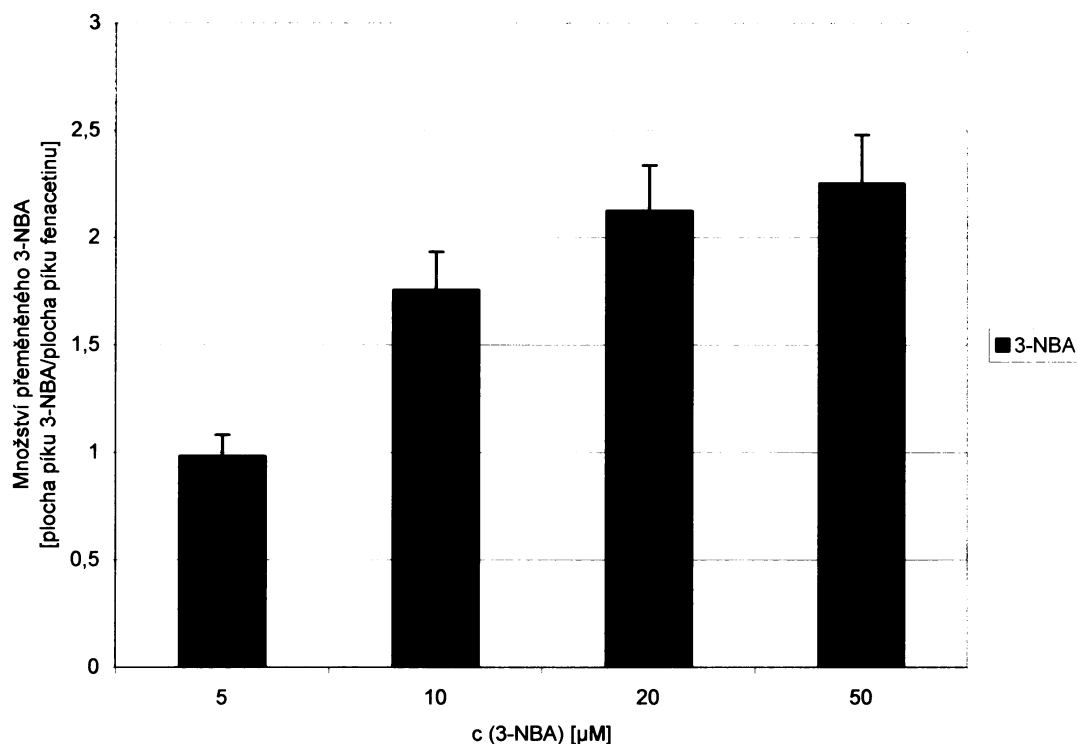


Obr. 22 Závislost přeměny 3-NBA na době inkubace s NQO1. Sloupce uvedené v obrázku udávají množství vzniklého 3-ABA.

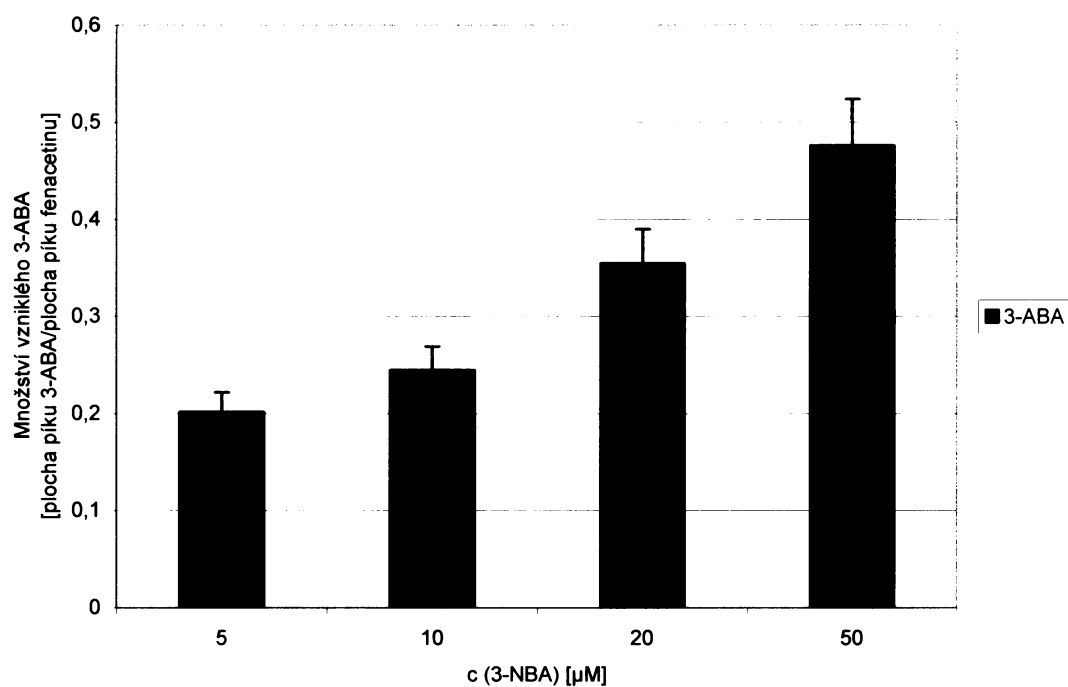
4.1.5 ZÁVISLOST PŘEMĚNY 3-NBA DT-DIAFORASOU NA KONCENTRACI 3-NBA

Pro zjištění vlivu koncentrace 3-NBA na jeho metabolickou přeměnu DT-diaforasou byl do inkubačních směsí přidán 3-NBA o koncentracích 0, 5, 10, 20 a 50 μM . Výsledky analýz pomocí HPLC jsou uvedeny na Obr. 23 a na Obr. 24.

Se zvyšující se koncentrací 3-NBA v inkubační směsi dochází ke zvyšování jeho přeměněného množství až do koncentrace 20 μM . Nárůst množství vznikajícího metabolitu, 3-ABA, byl pozorován až do koncentrace 50 μM . Redukce 3-NBA lidskou NQO1 vykazuje saturační kinetiku.



Obr. 23 Závislost přeměny 3-NBA lidskou DT-diaforasou na jeho koncentraci. Sloupce uvedené v obrázku udávají množství přeměněného 3-NBA za 60 minut.



Obr. 24 Závislost přeměny 3-NBA lidskou DT-diaforasou na jeho koncentraci. Sloupce uvedené v obrázku udávají množství vzniklého 3-ABA za 60 minut.

Z množství přeměněného 3-NBA a vzniklého 3-ABA byly určeny Michaelisovy konstanty (K_m) pro 3-NBA a pro 3-ABA. Jejich hodnoty jsou uvedeny v **tabulce 3**.

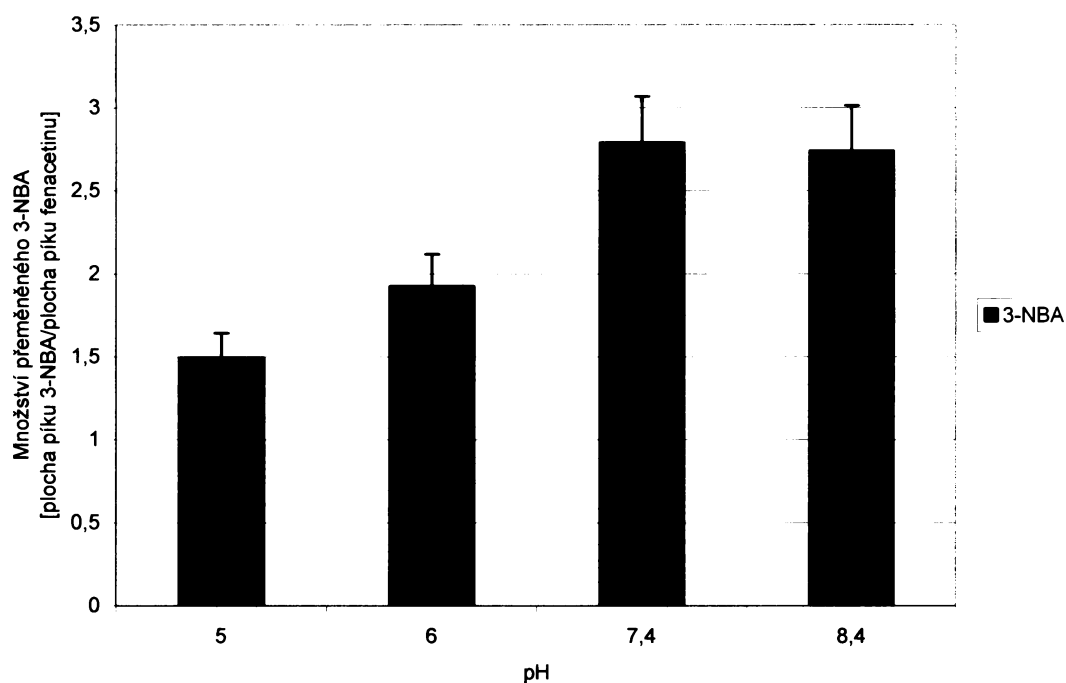
Tabulka 3 Hodnoty Michaelisových konstant redukce 3-NBA na 3-ABA pomocí lidské NQO1

Sloučenina	K_m [μM]
3-NBA	10,28
3-ABA	7,63

4.1.6 ZÁVISLOST PŘEMĚNY 3-NBA DT-DIAFORASOU NA pH

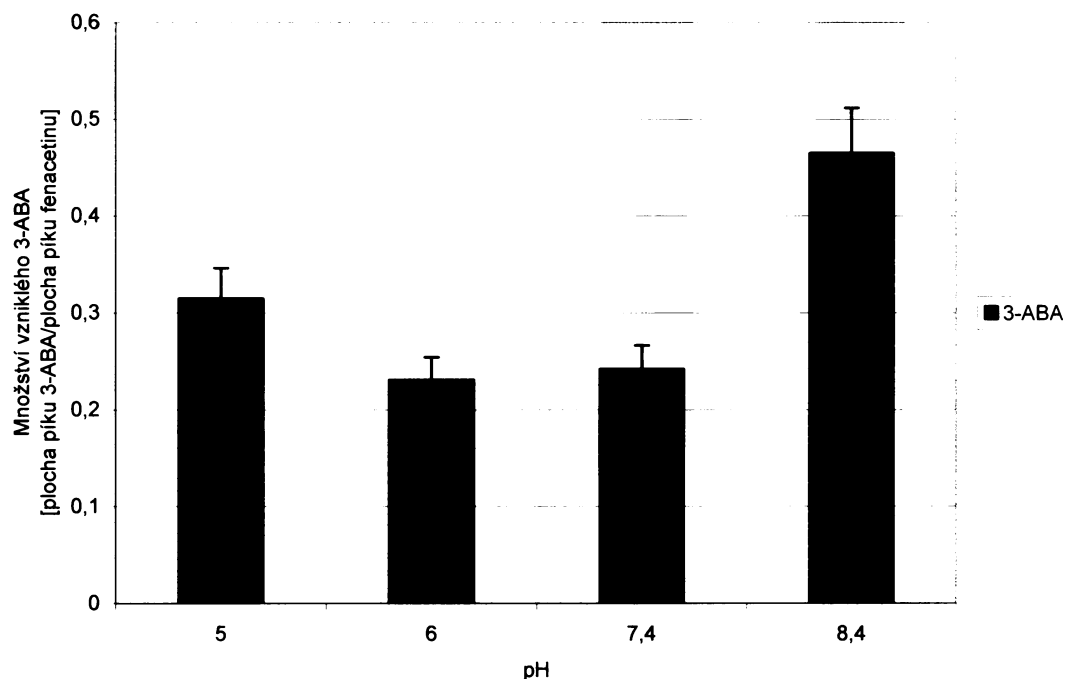
Pro zjištění vlivu pH prostředí na metabolickou přeměnu 3-NBA byl použit 50 mM TRIS/HCl pufr obsahující 0,4 % Tween 20 o pH 5,0; 6,0; 7,4 a 8,4. Výsledky analýz pomocí HPLC jsou uvedeny na **Obr. 25** a na **Obr. 26**.

pH optimum redukce 3-NBA lidskou DT-diaforasou leží v oblasti pH 7,4 – 8,4.



Obr. 25 Závislost přeměny 3-NBA lidskou DT-diaforasou na pH. Sloupce uvedené v obrázku udávají množství přeměněného 3-NBA za 60 minut.

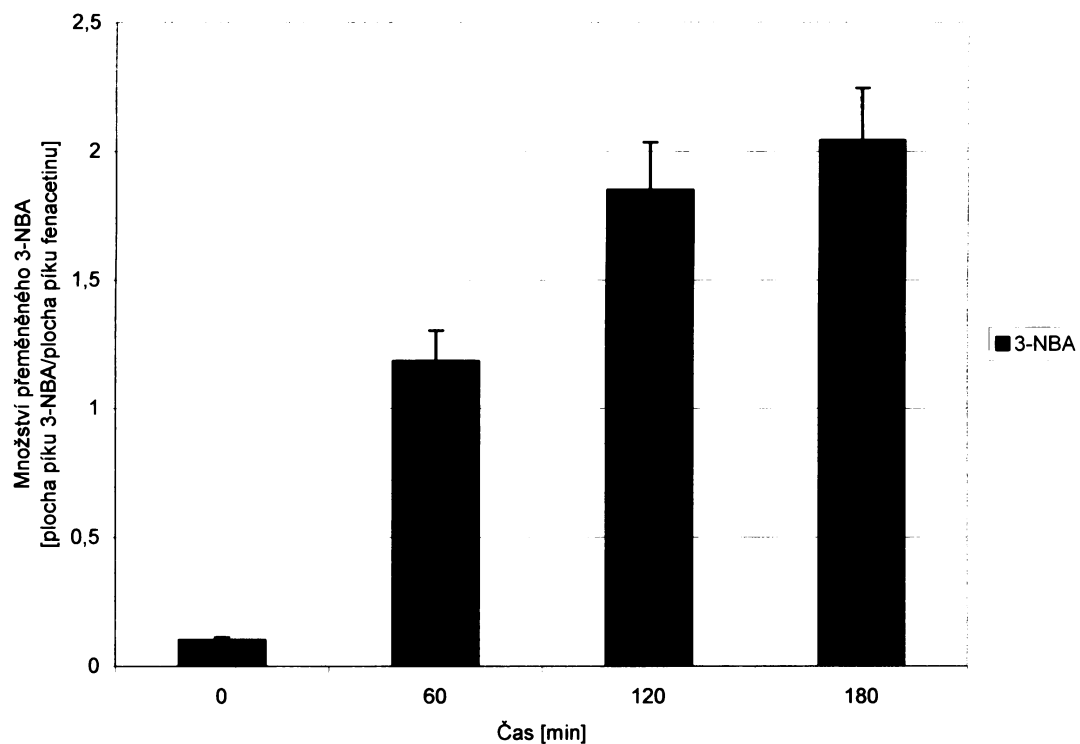
V případě tvorby 3-ABA byl pozorován dosud nejednoznačně interpretovatelný výsledek. Jeho tvorba lidskou DT-diaforasou z 3-NBA je sice nejvyšší při pH 8,4, avšak roste i v kyselé oblasti pH, pH 5,0 (**Obr. 26**).



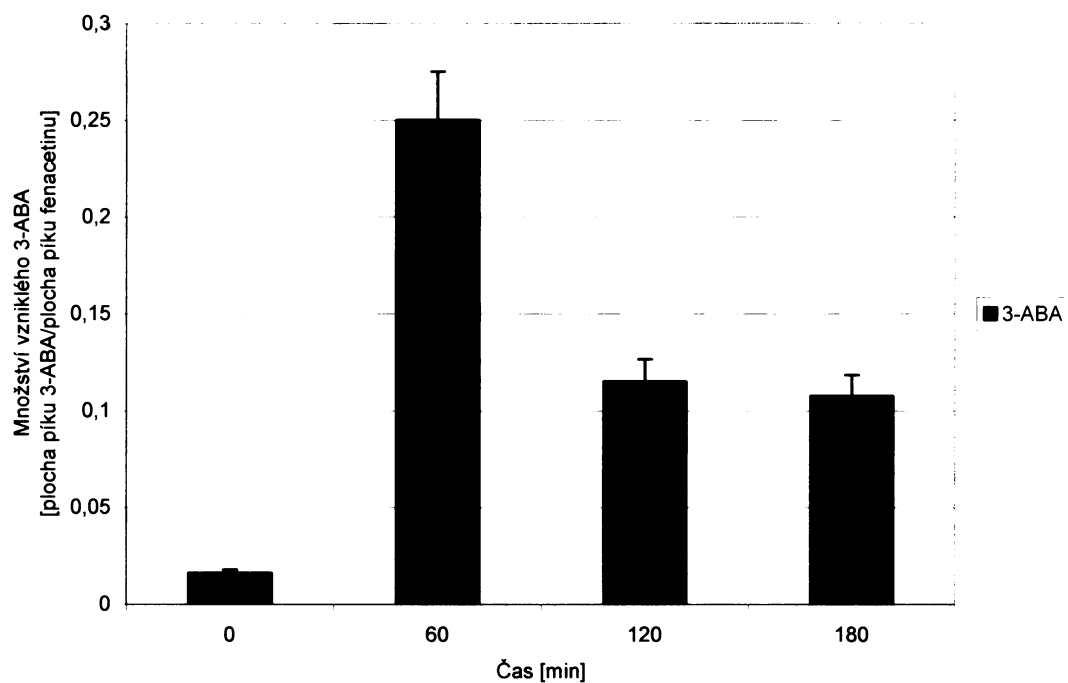
Obr. 26 Závislost přeměny 3-NBA lidskou DT-diaforasou na pH. Sloupce uvedené v obrázku udávají množství vzniklého 3-ABA za 60 minut.

4.2 STUDIUM VLIVU DOBY INKUBACE (60 - 180 MINUT) NA REDUKCI 3-NBA LIDSKOU REKOMBINATNÍ DT-DIAFORASOU

Pro zjištění vlivu delší doby inkubace než 60 minut na redukci 3-NBA lidskou rekombinantní DT-diaforasou byly inkubační směsi (jejich složení je uvedeno v kapitole 3.3.5) inkubovány po dobu 60, 120 a 180 minut. Výsledky analýz pomocí HPLC jsou uvedeny na **Obr. 27** a **Obr. 28**.



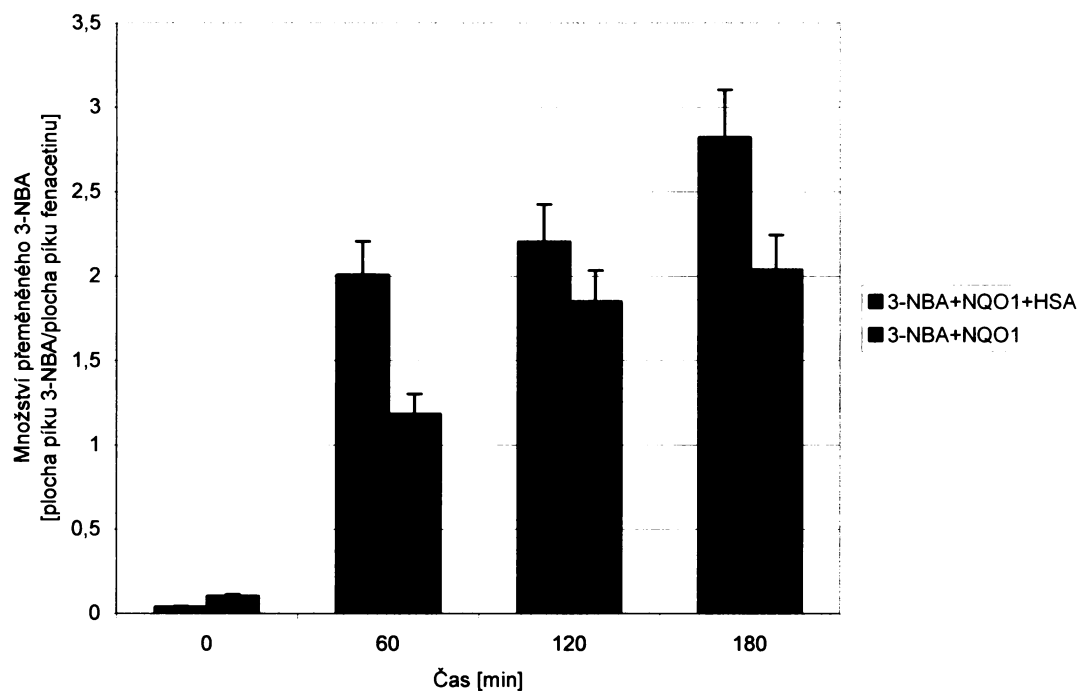
Obr. 27 Vliv doby inkubace na redukci 3-NBA NQO1. Sloupce uvedené v obrázku udávají množství přeměněného 3-NBA.



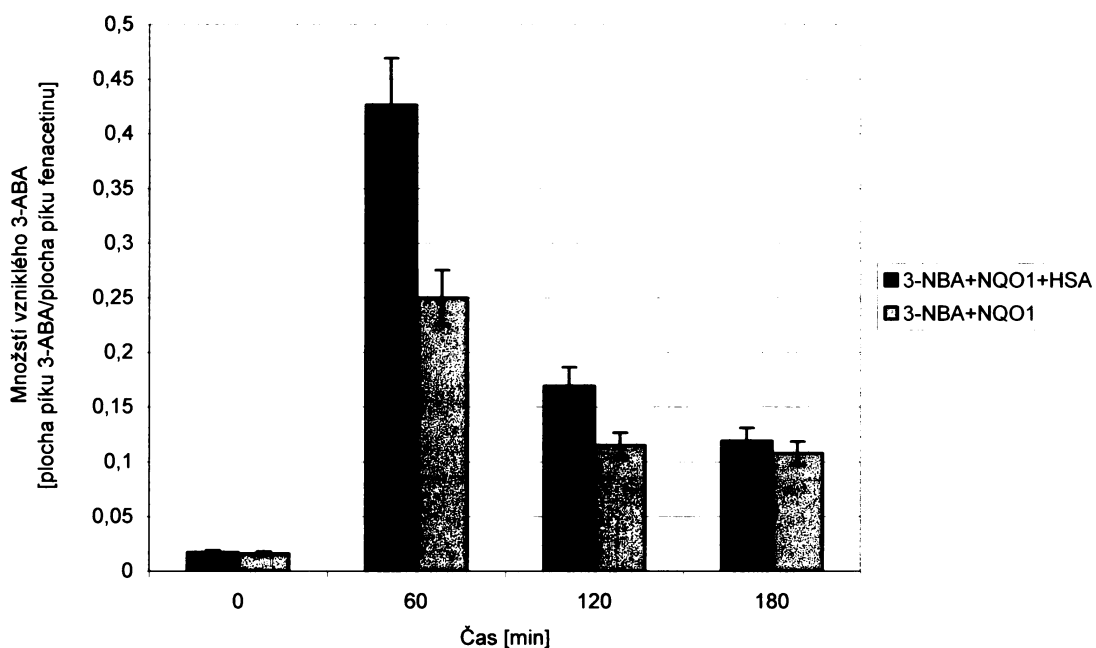
Obr. 28 Vliv doby inkubace na redukci 3-NBA NQO1. Sloupce uvedené v obrázku udávají množství vzniklého 3-ABA.

Množství přeměněného 3-NBA vzrůstá se zvyšující se dobou inkubace. Množství vzniklého 3-ABA je nejvyšší při inkubaci trvající 60 minut, se zvyšující se dobou inkubace klesá. Tento pokles může být způsoben několika faktory, např. zpětnou oxidací 3-ABA na N-hydroxyaminobenzanthron, popř. jiný metabolit, který může být vázán na proteiny v inkubační směsi. Tento předpoklad jsme chtěli potvrdit dalšími experimenty. Do inkubační směsi byl tedy přidáván exogenní protein, lidský sérový albumin (HSA).

Byly připraveny inkubační směsi obsahující lidský sérový albumin v koncentraci 0,5 mg/ml (složení inkubačních směsí je uvedeno v kapitole 3.3.5), které byly inkubovány po dobu 60, 120 a 180 minut. Výsledky analýz redukce 3-NBA pomocí HPLC jsou uvedeny na **Obr. 29** a na **Obr. 30**.



Obr. 29 Vliv HSA na přeměnu 3-NBA lidskou NQO1. Sloupce uvedené na obrázku udávají množství přeměněného 3-NBA.



Obr. 30 Vliv HSA na přeměnu 3-NBA lidskou NQO1. Sloupce uvedené na obrázku udávají množství vzniklého 3-ABA.

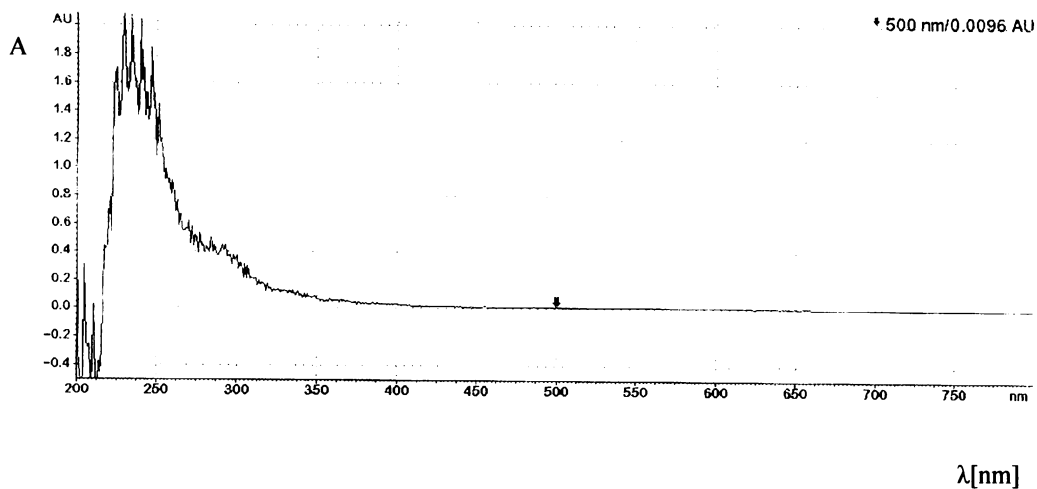
Zjistili jsme, že za přítomnosti HSA v inkubaci dochází k efektivnější redukci 3-NBA na 3-ABA lidskou NQO1. Lze předpokládat, že HSA nějakým, dosud neznámým, mechanismem zvyšuje (ochraňuje) aktivitu NQO1.

4.2.1 STUDIUM VAZBY 3-NBA AKTIVOVANÉHO LIDSKOU DT-DIAFORASOU NA PROTEINY

Ke studiu vazby 3-NBA aktivovaného lidskou DT-diaforasou na proteiny byly použity vodné fáze získané z jednotlivých inkubací 3-NBA s lidskou rekombinantní DT-diaforasou a extrakcí s etylacetátem a sledováno, zda se mění spektrum proteinu NQO1.

Ani v případě DT-diaforasy, ani v případě přídavku HSA nebyla redukcí 3-NBA pozorována změna ve spektrech těchto proteinů. Aktivovaný 3-NBA se tedy na jejich

proteiny nevázal (**Obr. 31**). Jinými slovy, měřením absorpčních spekter proteinu nebyly detekovány změny, které by ilustrovaly kovalentní vazbu metabolitů 3-NBA.



Obr. 31 Absorpční spektrum reakční směsi 3-NBA s lidskou DT-diaforasou v přítomnosti lidského sérového albuminu po extrakci produktů etylacetátem

4.3 METABOLISMUS 3-NBA JATERNÍMI MIKROSOMY POTKANA

V další části diplomové práce bylo sledováno, zda je 3-NBA metabolizován enzymy přítomnými v jaterních mikrosomech potkana.

4.3.1 ZÁVISLOST PŘEMĚNY 3-NBA NA DOBĚ INKUBACE S MIKROSOMY JATER POTKANŮ PREMEDIKOVANÝCH FENOBARBITALEM, β -NAFTOFLAVONEM A POTKANŮ NEPREMEDIKOVANÝCH

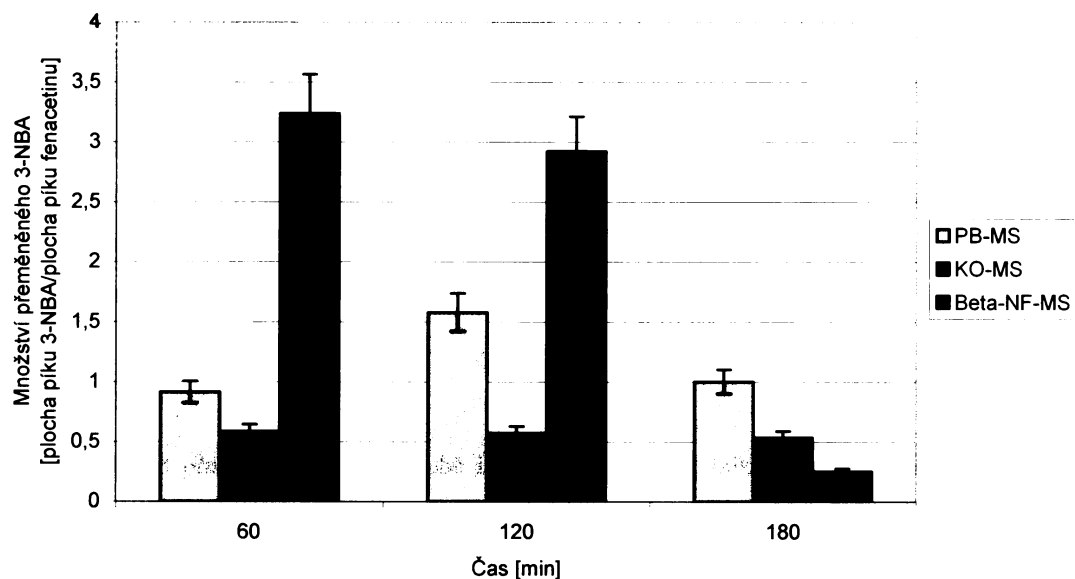
Pro zjištění vlivu doby inkubace na přeměnu 3-NBA jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem, β -naftoflavonem a nepremedikovaných (kontrolních) zvířat byla inkubační směs inkubována po dobu 60, 120 a 180 minut. Výsledky analýz pomocí HPLC jsou uvedeny na **Obr. 32** a na **Obr. 33**.

Všechny typy mikrosomů redukují 3-NBA na 3-ABA. Mikrosomy zvířat premedikovaných β -naftoflavonem jsou v přeměně 3-NBA nejúčinnější. Množství přeměněného 3-NBA je nejvyšší při 60-minutové inkubaci, při 120-minutové inkubaci dochází k mírnému poklesu přeměněného 3-NBA a při inkubaci 180 minut je množství přeměněného 3-NBA více než desetkrát nižší. Mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem vykazují menší účinnost v přeměně 3-NBA než mikrosomy β -naftoflavonové. K nejvyšší přeměně 3-NBA zde dochází při inkubaci trvající 120 minut. Množství přeměněného 3-NBA v čase 60 a 180 minut je zhruba o jednu třetinu nižší a vykazuje podobné hodnoty. Nejmenší efektivitu v přeměně 3-NBA mají mikrosomy nepremedikovaných (kontrolních) zvířat. Zde efektivita s narůstající dobou inkubace postupně klesá.

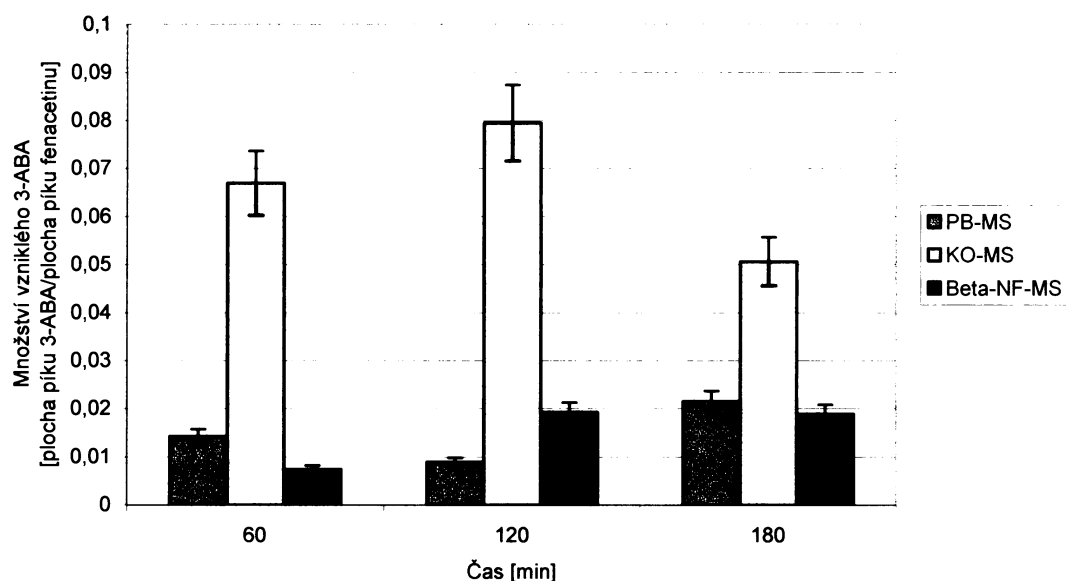
Naopak největší nárůst tvorby 3-ABA byl pozorován v případě mikrosomů nepremedikovaných (kontrolních) zvířat. Množství vzniklého 3-ABA narůstá až do doby inkubace 120 minut, při delší inkubaci dochází opět k poklesu jeho tvorby. Mikrosomy jater potkanů premedikovaných fenobarbitalem či β -naftoflavonem jsou méně účinné v tvorbě 3-ABA než mikrosomy nepremedikovaných zvířat. V případě „fenobarbitalových mikrosomů“ se jako nejúčinnější z hlediska vzniku 3-ABA jeví inkubace trvající 180 minut. U „ β -naftoflavonových mikrosomů“ je množství vzniklého 3-ABA přibližně stejně velké při inkubaci 120 i 180 minut. Při inkubaci trvající 60 minut je množství vzniklého 3-ABA přibližně o dvě třetiny nižší.

Diskrepance mezi přeměnou 3-NBA a tvorbou 3-ABA jednotlivými mikrosomálními systémy lze za současných znalostí obtížně vysvětlit. Zda se jedná o

komplexní redox systém přeměňující 3-NBA a 3-ABA navzájem, bude v naší laboratoři předmětem dalšího studia.



Obr. 32 Závislost přeměny 3-NBA na době inkubace s jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem, β -naftoflavonem a potkanů nepremedikovaných (kontrolních). Sloupce uvedené v obrázku udávají množství přeměněného 3-NBA.

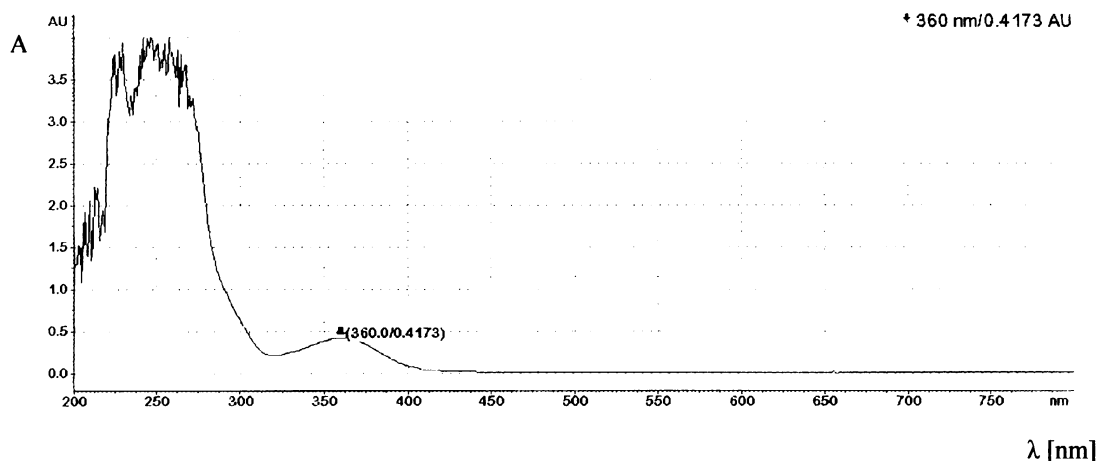


Obr. 33 Závislost přeměny 3-NBA na době inkubace s jaterními mikrosomy potkanů premedikovaných fenobarbitalem, β -naftoflavonem a potkanů nepremedikovaných (kontrolních). Sloupce uvedené v obrázku udávají množství vzniklého 3-ABA.

4.3.1.1 STUDIUM VAZBY 3-NBA AKTIVOVANÉHO JATERNÍM ENZYMOVÝM SYSTÉMEM POTKANA

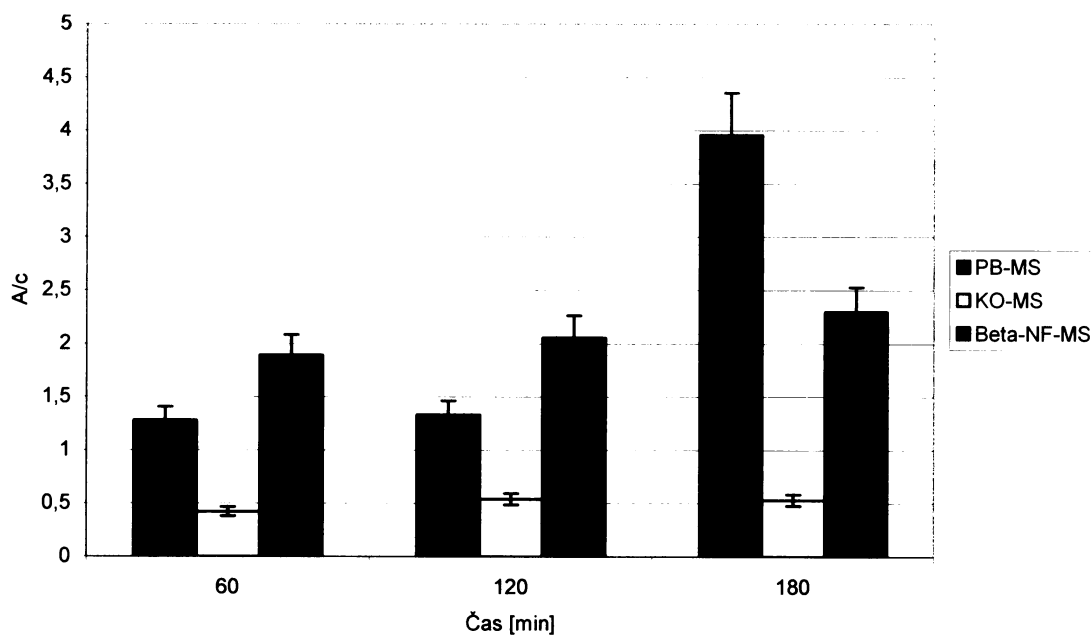
Ke studiu vazby 3-NBA aktivovaného jaterním enzymovým systémem potkana na proteiny byly použity vodné fáze získané z jednotlivých inkubací 3-NBA s mikrosomy jater potkanů premedikovaných fenobarbitalem, β -naftoflavonem a nepremedikovaných (kontrolních) zvířat po extrakci etylacetátem. Výsledek stanovení je uveden na **Obr. 35**.

Vazba byla sledována spektrálně. Lze předpokládat, že v případě reaktivních metabolitů 3-NBA jako je 3-N-hydroxyaminobenzanthron (3-N-OH-ABA) dojde vazbou na protein ke změně spektra modifikovaných proteinů. Skutečně v průběhu metabolismu 3-NBA mikrosomálními systémy dochází ke změně spektrálních vlastností mikrosomálních proteinů. Modifikované proteiny vykazují nový absorpční pás s maximem při 360 nm (**Obr. 34**).



Obr. 34 Absorpční spektrum reakční směsi 3-NBA s mikrosomy jater potkana po extrakci produktů etylacetátem

Vazba aktivovaného 3-NBA na mikrosomální proteiny je nejvyšší u mikrosomů jater potkanů premedikovaných fenobarbitalem při inkubaci trvající 180 minut. U β -naftoflavonových mikrosomů vazba aktivovaného 3-NBA na proteiny narůstá se zvyšující se dobou inkubace. U mikrosomů jater nepremedikovaných (kontrolních) potkanů je tato vazba nejnižší.



Obr. 35 Vazba 3-NBA aktivovaného jaterním enzymovým systémem potkana na proteiny v závislosti na čase. Sloupce uvedené v obrázku udávají absorbanci proteinu při 360 nm vztaženou na koncentraci proteinů.

4.4 URČENÍ METABOLITU KARCINOGENNÍHO 2-NITROANISOLU TVOŘENÉHO JATERNÍMI MIKROSOMY KRÁLÍKA

Cílem této části diplomové práce bylo určit dosud neznámou strukturu metabolitu detoxikační cesty metabolismu 2-nitroanisolu. V dřívějších studiích^[63,64,103] bylo zjištěno, že 2-nitroanisol podléhá oxidační demetylací cytochromy P450 za vzniku 2-nitrofenolu, který je dále opět cytochromy P450 oxidován na dva metabolity – 2,6-dihydroxynitrobenzen a metabolit s neznámou strukturou, jehož hmotnostní spektrum signalizuje, že se jedná o dihydroxynitrobenzen. Pro určení jeho struktury jsme volili přípravu syntetických standardů s předpokládanou strukturou. Za nejpředpokládanější metabolit byl považován 2,5-dihydroxynitrobenzen. Proto byla tato sloučenina nejdříve syntetizována.

4.4.1 PŘÍPRAVA 2,5-DIHYDROXYNITROBENZENU

Byl připraven syntetický 2,5-dihydroxynitrobenzen. 2-nitrofenol byl rozpuštěn v destilované vodě. K roztoku byl přidán persíran sodný a hydroxid sodný (podrobněji viz kapitola 3.3.8). Po dvou dnech inkubace při laboratorní teplotě byla směs okyselena a nezreagovaný 2-nitrofenol byl odstaněn destilací s vodní parou. Zbytky reakční směsi byly extrahovány do éteru, který byl odpařen. Produkt byl rekrystalován z vody a přečištěn přes aktivní uhlí. K jeho identifikaci byla použita metoda NMR. Bod tání byl stanoven v bodotávku (Melting Point B-545, Büchi) a jeho hodnota byla 131 – 132°C.

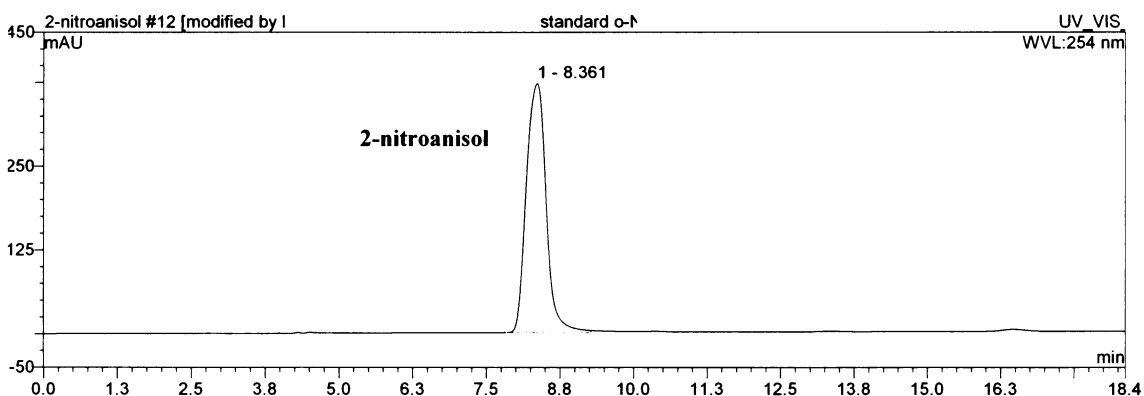
4.4.2 ANALÝZA 2-NITROANISOLU, 2-NITROFENOLU, 2,5-DIHYDROXYNITROBENZENU A 2,6-DIHYDROXYNITROBENZENU POMOCÍ HPLC

2-nitroanisol a jeho deriváty (2-nitrofenol a 2,5-dihydroxynitrobenzen) byly separovány pomocí HPLC. Nejdříve byly charakterizovány chromatografické vlastnosti jednotlivých sloučenin.

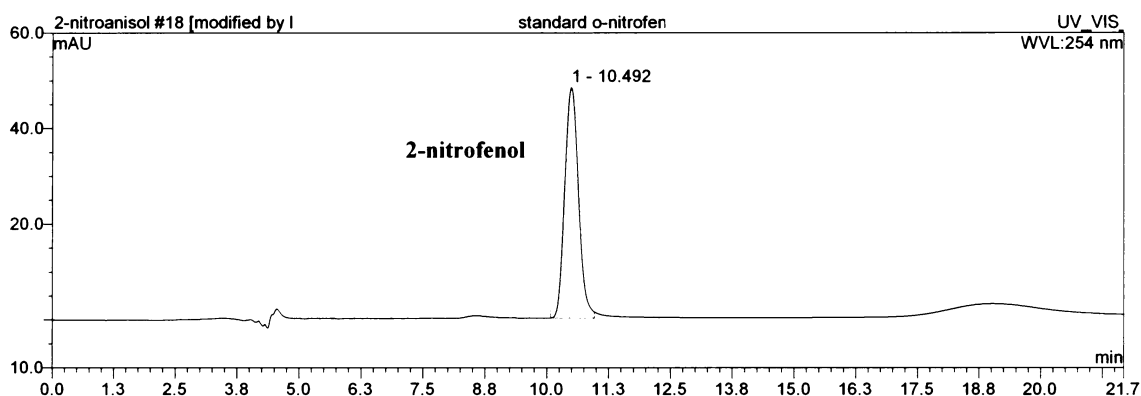
2-nitroanisol je použitým systémem HPLC eluován v retenčním čase 8,36 minut. Podmínky HPLC jsou uvedeny v kapitole 3.3.9. Výsledek analýzy HPLC je uveden na **Obr. 36**.

2-nitrofenol je eluován při HPLC v retenčním čase 10,4 minut. HPLC probíhala za stejných podmínek jako v případě 2-nitroanisolu (kapitola 3.3.9). Výsledek analýzy HPLC je uveden na **Obr. 37**.

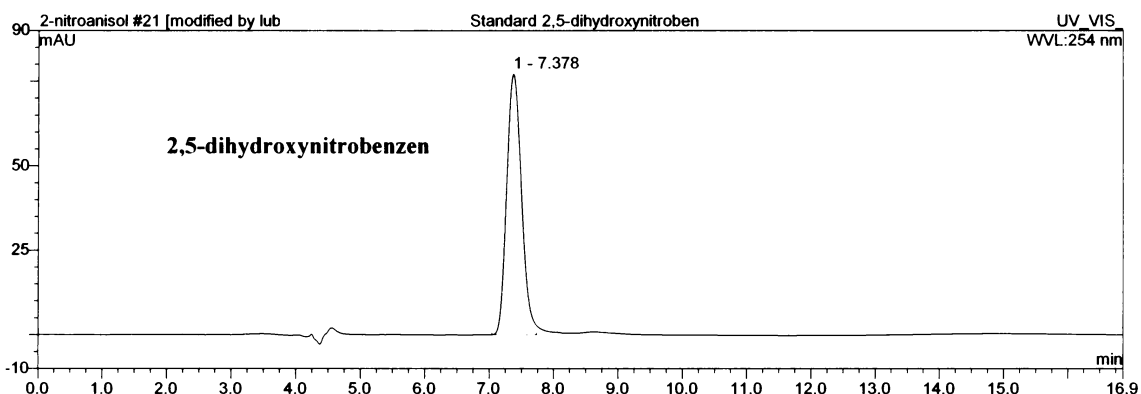
2,5-dihydroxynitrobenzen, který byl v diplomové práci syntetizován, je použitým systémem HPLC eluován v retenčním čase 7,37 minut. HPLC probíhala za stejných podmínek jako u 2-nitroanisolu (kapitola 3.3.9). Výsledek analýzy HPLC je uveden na **Obr. 38**.



Obr. 36 HPLC 2-nitroanisolu. Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 60 % metanol a 40 % citrátový pufr (0,02 M kyselina citronová a 0,02 M citrát sodný, pH 3,0), průtok 0,5 ml/min, kolona Macherey Nagel RP18, teplota 35°C, aplikováno 20 µl vzorku, detekce 254 nm.

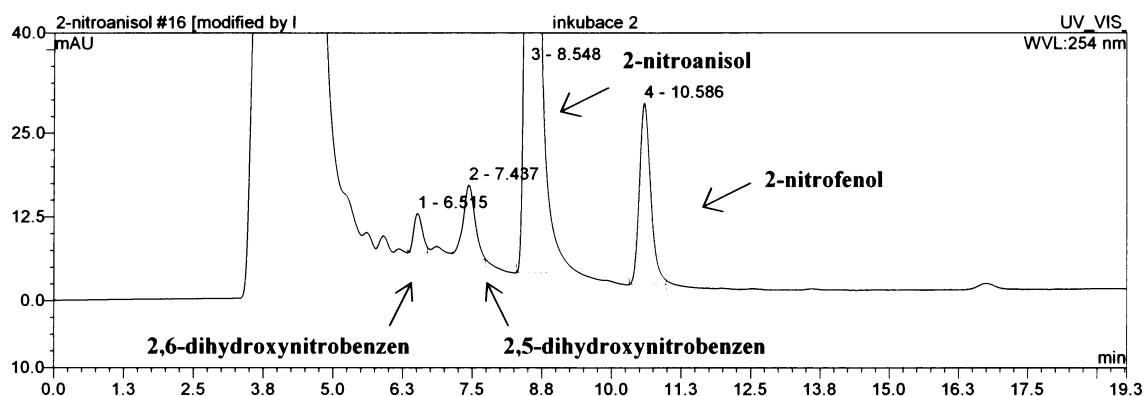


Obr. 37 HPLC 2-nitrofenolu. Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 60 % metanol a 40 % citrátový pufr (0,02 M kyselina citronová a 0,02 M citrát sodný, pH 3,0), průtok 0,5 ml/min, kolona Macherey Nagel RP18, teplota 35°C, aplikováno 20 µl vzorku, detekce 254 nm.



Obr. 38 HPLC 2,5dihydroxynitrobenzenu. Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 60 % metanol a 40 % citrátový pufr (0,02 M kyselina citronová a 0,02 M citrát sodný, pH 3,0), průtok 0,5 ml/min, kolona Macherey Nagel RP18, teplota 35°C, aplikováno 20 µl vzorku, detekce 254 nm.

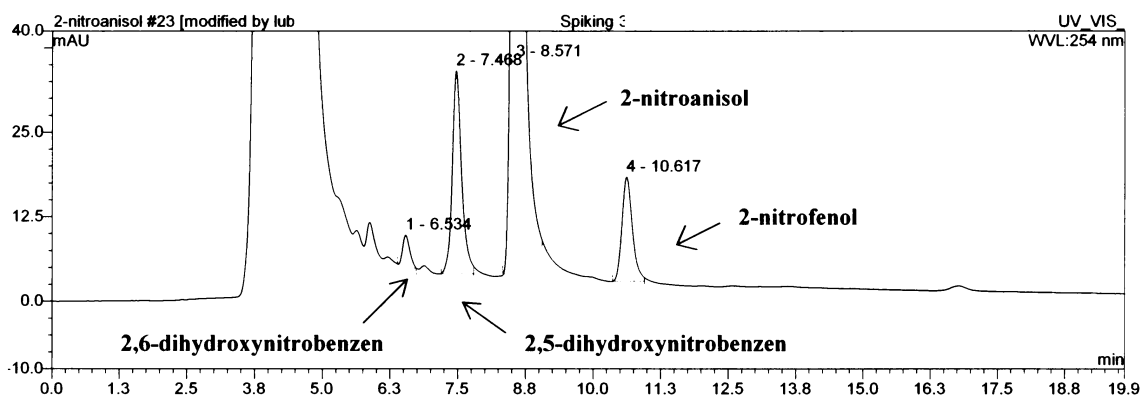
Inkubací 2-nitroanisolu s mikrosomy jater králíka premedikovaného fenobarbitalem vznikají tři metabolity eluované v retenčních časech 6,5; 7,4 a 10,5 minut (**Obr. 39**). Z analogie retenčních časů „píků“ těchto metabolitů lze konstatovat, že se jedná o 2,6-dihydroxynitrobenzen (retenční čas tohoto metabolitu je určen v předchozí studii^[64]), 2,5-dihydroxynitrobenzen a 2-nitrofenol.



Obr. 39 HPLC směsi získané inkubací 2-nitroanisolu s mikrosomy jater králíka premedikovaného fenobarbitalem (složení inkubační směsi je uvedeno v kapitole 3.3.9). Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 60 % metanol a 40 % citrátový pufr (0,02 M kyselina citronová a 0,02 M citrát sodný, pH 3,0), průtok 0,5 ml/min, kolona Macherey Nagel RP18, teplota 35°C, aplikováno 20 µl vzorku, detekce 254 nm.

K potvrzení, že dříve necharakterizovaný metabolit je skutečně syntetizovaný 2,5-dihydroxynitrobenzen, byla použita jeho „ko-chromatografie“ s inkubační směsí 2-nitroanisolu s mikrosomy jater králíka premedikovaného fenobarbitalem. Inkubační směsi byly připraveny dle návodu (kapitola 3.3.9). K 30 µl této inkubační směsi bylo přidáno 5 µl 0,1 mM roztoku 2,5-dihydroxynitrobenzenu. Výsledek analýzy HPLC je uveden na **Obr. 40**.

Po přidání roztoku 2,5-dihydroxynitrobenzenu k inkubační směsi vzrostl „pík“ metabolitu 2,X-dihydroxynitrobenzenu. Tímto metabolitem je tedy 2,5-dihydroxynitrobenzen.



Obr. 40 HPLC směsi získané inkubací 2-nitroanisolu s mikrosomy jater králíka premedikovaného fenobarbitalem (složení inkubační směsi je uvedeno v kapitole 3.3.9) s 5 μ l 0,1 mM roztoku 2,5-dihydroxynitrobenzenu v metanolu. Experimentální podmínky HPLC: mobilní fáze 60 % metanol a 40 % citrátový pufr (0,02 M kyselina citronová a 0,02 M citrát sodný, pH 3,0), průtok 0,5 ml/min, kolona Macherey Nagel RP18, teplota 35°C, aplikováno 20 μ l vzorku, detekce 254 nm.

5 DISKUSE

Cílem diplomové práce bylo rozšířit poznatky o metabolismu dvou aromatických nitrosloučenin, 3-nitrobenzanthronu (3-NBA) a 2-nitroanisolu. 3-NBA je silným mutagenem a karcinogenem pro laboratorní potkany způsobujícím tvorbu nádorů plic po intratracheální aplikaci^[70]. 2-nitroanisol je rovněž znám jako silný karcinogen, způsobující tvorbu nádorů močového měchýře^[106].

Studium 3-NBA je významné z hlediska jeho toxicity a dále i proto, že tato látka je polutantem přítomným v ovzduší. Ohroženi jsou především obyvatelé městských aglomerací a pracovníci některých průmyslových odvětví. Detailní informace o jeho fyziologických účincích na organismy však nejsou doposud přesně známy. 3-NBA je genotoxická sloučenina, schopná kovalentně modifikovat DNA. To bylo prokázáno jak v experimentech *in vivo*, tak *in vitro*^[18, 46]. 3-NBA je v modelovém organismu laboratorního potkana aktivován na reaktivní metabolity generující adukty s DNA detekované v několika tkáních tohoto modelového organismu. Z dosud provedených studií je zřejmé, že klíčovým místem metabolické aktivace této sloučeniny je nitroskupina^[106]. Redukcí nitroskupiny může vznikat hydroxylamin, který je nestabilní a ochotně tvoří nitréniový ion, který sám či přeměněn na ion karbeniový, je schopen atakovat nukleofilní centra molekul DNA a vytvářet adukty. Tento předpoklad reakčního mechanismu 3-NBA byl již prokázán nejnovějšími studiemi^[9].

Bylo prokázáno, že na redukční aktivaci 3-NBA se podílí nejen enzymové systémy jaterních mikrosomů^[12], ale především enzymy přítomné v cytosolární frakci jaterní tkáně modelového organismu laboratorního potkana a jater člověka^[11]. Zjistilo se, že adukty s DNA generované metabolity vzniklými redukční aktivací 3-NBA jsou totožné jak v případě aktivace 3-NBA mikrosomálními enzymovými systémy jater, tak i při aktivaci 3-NBA enzymy cytosolární frakce jaterní tkáně^[11, 12]. Nejefektivnější aktivace 3-NBA v jaterních mikrosomech je zprostředkována enzymem NADPH:cytochrom P450 reduktasou^[12]. Z cytosolárních enzymů jaterní tkáně je v aktivaci 3-NBA nejvíce účinným enzymem DT-diaforasa (NQO1)^[11]. Ukázalo se také, že cytosolárními enzymovými systémy jaterní tkáně je 3-NBA redukčně aktivován mnohem účinněji než enzymovými systémy jaterních mikrosomů^[11, 12]. Proto bylo jedním z cílů předkládané diplomové práce

studium redukce 3-NBA lidskou DT-diaforasou.

Předkládaná diplomová práce se zabývá třemi směry této oblasti. Prvním z nich je studium metabolismu 3-NBA lidskou rekombinantní DT-diaforasou z hlediska poznání kinetiky tohoto procesu. Dále je to studium vlivu lidského sérového albuminu (HSA) na metabolismus 3-NBA tímto enzymem. V další části pak byla sledována přeměna 3-NBA mikrosomálním systémem jater potkana.

Zjistili jsme, že 3-NBA je lidskou rekombinantní DT-diaforasou redukován na 3-aminobenzanthron (3-ABA). Kromě 3-ABA, redukčního metabolitu 3-NBA, nebyly detekovány žádné další metabolity. Se zvyšující se dobou inkubace NQO1 s 3-NBA dochází ke zvýšení přeměny 3-NBA a nárůstu množství vzniklého 3-ABA. Pokles 3-NBA v čase koreluje s přírůstkem jeho redukčního metabolitu, 3-ABA. Redukce 3-NBA lidskou NQO1 vykazuje saturační kinetiku. Z kinetické studie byly určeny Michaelisovy konstanty redukce 3-NBA na 3-ABA pomocí lidské NQO1, jejichž hodnoty jsou 10,3 a 7,6 μM . Redukce 3-NBA lidskou NQO1 je umožněna stéricky výhodnou vazbou této sloučeniny do aktivního centra enzymu. Tuto skutečnost ilustruje i model této vazby (docking 3-NBA) do aktivního centra enzymu (**Obr. 41**).



Obr. 41 Model vazby 3-NBA do aktivního centra NQO1^[11]

pH optimum redukce 3-NBA lidskou DT-diaforasou leží v oblasti pH 7,4 - 8,4. Tvorba 3-ABA DT-diaforasou z 3-NBA je nejvyšší při pH 8,4. Lidská rekombinantní DT-diaforasa má tedy pravděpodobně pH optimum v mírně alkalické oblasti. Překvapivé byly však výsledky získané z hlediska vlivu pH na produkci redukčního metabolitu, 3-ABA. Zde je sice tento metabolit tvořen rovněž nejvíce při pH 8,4, jeho tvorba je však

zvýšena i při pH 5,0 (oproti pH 6,0 a 7,4). Zda se jedná o jeho rychlejší, neenzymovou, redukci, a to jeho intermediátu 3-N-OH-ABA způsobenou změnou pH nebo ovlivněním ionizace aktivního centra enzymu, dosud nelze rozhodnout. Detailní studie neenzymové redukce 3-N-OH-ABA by mohla přinést odpověď na rozluštění mechanismu tohoto jevu.

Vzhledem ke struktuře aduktů aktivovaného 3-NBA s dG a dA^[9] je zřejmé, že v průběhu redukce 3-NBA vzniká, jak již bylo výše uvedeno, 3-N-OH-ABA. Ten však v naší studii jako metabolit detekován nebyl. Tento intermediát tvoří nitréniové či karbéniové ionty, které by se mohly vázat na nukleofilní centra proteinu DT-diaforasy. Tento předpoklad jsme chtěli potvrdit vazbou tohoto intermediátu na další protein, HSA. Získané výsledky však byly překvapující. I když jsme spektrálně nezjistili vazbu aktivovaného 3-NBA na proteiny NQO1 nebo přidaného HSA v inkubačních směsích, které obsahovaly navíc lidský sérový albumin, bylo nalezeno větší množství přeměněného 3-NBA a vzniklého 3-ABA oproti inkubačním směsím, které HSA neobsahovaly. Lidský sérový albumin tedy pravděpodobně nějakým, dosud neznámým, mechanismem ochraňuje DT-diaforasu a zvyšuje tak její účinnost v metabolismu 3-NBA.

V druhé části diplomové práce byl sledován potenciál enzymů mikrosomálního systému jater potkana metabolisovat 3-NBA. Obdobně jako DT-diaforasa mikrosomální enzymy redukuje 3-NBA na 3-ABA. Z hlediska množství přeměněného 3-NBA jsou nejvíce efektivní mikrosomy jater potkanů premedikovaných β -naftoflavonem, následují mikrosomy jater potkanů premedikovaných fenobarbitalem a nejméně efektivní jsou mikrosomy jater z nepremedikovaných (kontrolních) zvířat. Z hlediska efektivity metabolisovat 3-NBA jsou mikrosomální enzymové systémy méně účinné než lidská NQO1. Jaterní mikrosomy potkanů premedikovaných β -naftoflavonem sice přeměnily 3-NBA v prvních 60 minutách inkubace s efektivitou srovnatelnou s NQO1, jejich účinnost však klesala se zvýšenou dobou inkubace. Podstatný rozdíl mezi DT-diaforasou a mikrosomálními enzymy byl zjištěn ve tvorbě 3-ABA, s nižší tvorbou v mikrosomech. Zda je tato skutečnost způsobena nižší efektivitou mikrosomálních enzymů nebo „vychytáváním“ reaktivního metabolitu proteiny této subcelulární frakce bude v naší laboratoři předmětem dalších studií.

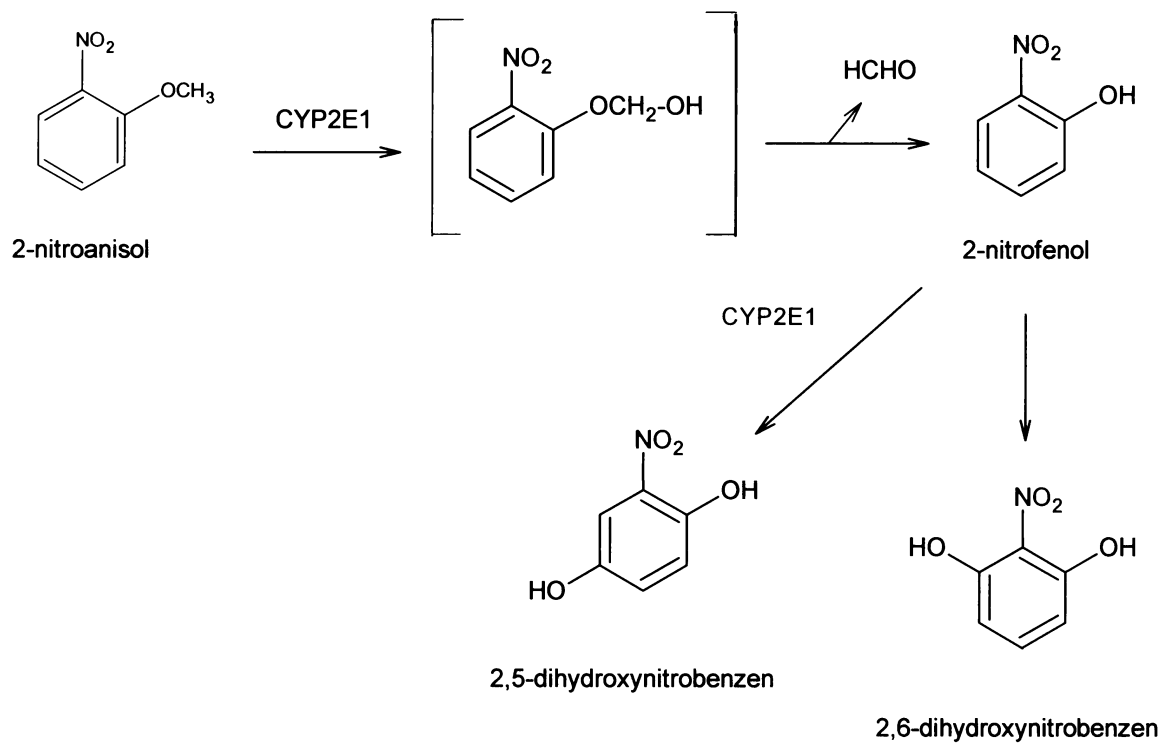
Další část diplomové práce se zabývala rozšířením studie metabolismu 2-nitroanisolu, konkrétně určením neznámé struktury jednoho z oxidačních metabolitů, 2,X-dihydroxynitrobenzenu. Studium metabolismu 2-nitroanisolu je významné nejen z hlediska jeho toxicity a karcinogenity^[29], ale i proto, že se s touto látkou setkáváme jak

v pracovním prostředí, tak v životním prostředí, kde přispívá k lokálnímu a regionálnímu znečištění^[105]. 2-nitroanisol je karcinogen způsobující u myší a potkanů tvorbu nádorů močového měchýře, v menší míře také nádory sleziny, jater a ledvin^[106]. Dosud však není známo, jakým mechanismem se tato látka uplatňuje v procesu kancerogeneze a jaké fáze tohoto procesu se vlastně účastní^[105].

Hlavní cestou metabolismu 2-nitroanisolu je jeho oxidační demethylace na 2-nitrofenol, který je z těla vylučován močí ve formě sulfátového konjugátu vytvořeného reakcí s fosfoadenosinfosulfátem katalyzovanou sulfotransferasou. Může vznikat i konjugát s glukuronátem vzniklý reakcí s UDP-glukuronovou kyselinou katalyzovanou reakcí glukuronáttransferasou. Minoritní cestou metabolismu je redukce na 2-anisidin, která probíhá hlavně v játrech^[96].

V dřívějších studiích byla zjištěna molekulová hmotnost dosud neznámého metabolitu 2-nitroanisolu, doposud však nebyla určena poloha druhé hydroxyskupiny^[64]. Připravením syntetického 2,5-dihydroxynitrobenzenu a porovnáním jeho vlastností při HPLC s neznámým metabolitem bylo prokázáno, že se jedná o tutéž látku. Metabolit doposud označovaný jako 2,X-dihydroxynitrobenzen je tedy 2,5-dihydroxynitrobenzen.

Předkládaná diplomová práce tedy završila studium detoxikačního metabolismu 2-nitroanisolu. Schéma detoxikačního metabolismu 2-nitroanisolu, spolu s lidským enzymem tvořícím metabolity tohoto karcinogenu v lidských játrech, je znázorněno na **Obr. 42**.



Obr. 42 Schéma detoxikační cesty metabolismu 2-nitroanisolu

6 ZÁVĚR

Výsledky získané při řešení diplomové práce ilustrují, že vytčené cíle práce byly splněny. Nejdůležitější poznatky lze shrnout následovně:

- 3-nitrobenzanthron (3-NBA) je lidskou rekombinantní DT-diaforasou (NQO1) přeměňován za tvorby jednoho redukčního metabolitu, 3-aminobenzanthronu (3-ABA).
- Redukce 3-NBA NQO1 je závislá na koncentraci enzymu, době inkubace a koncentraci použitého 3-NBA a pH inkubační směsi.
- Hodnoty Michaelisových konstant redukce 3-NBA na 3-ABA pro lidskou NQO1 jsou 10,3 μM pro 3-NBA a 7,6 μM pro 3-ABA.
- Metabolickou přeměnou 3-NBA jaterním mikrosomálním systémem potkana vzniká jeden metabolit, 3-ABA.
- Z mikrosomálních systémů jater potkanů užitých při experimentech jsou v přeměně 3-NBA nejúčinnější mikrosomy potkanů premedikovaných β -naftoflavonem.
- Metabolit karcinogenního 2-nitroanisolu tvořený jaterními mikrosomy králíka, jehož struktura nebyla doposud určena, byl identifikován jako 2,5-dihydroxynitrobenzen.

Získané výsledky lze považovat za cenné. V případě prvního studovaného karcinogenu, 3-NBA, ilustrují potenciál potkaních a lidských enzymů redukovat tuto sloučeninu na 3-ABA. V případě druhého studovaného karcinogenu, 2-nitroanisolu, přispělo určení neznámé struktury jeho metabolitu k finalizaci poznání jeho detoxikačního

metabolismu. Všechny získané výsledky podtrhují význam studia uvedených nitroaromátů. V další fázi výzkumu těchto sloučenin je nutné sledovat jejich toxické působení na lidskou populaci s předpokladem návrhů vedoucích ke snížení jejich negativních genotoxických účinků.

7 SEZNAM LITERATURY

1. Aimová, D.: *Diplomová práce*, PřF UK, Praha (2001)
2. Anari, M.R., Khan, S., Jatoe, S.D., O'Brein, P.J.: *Eur. J. Drug. Metab. Pharmacokinet.* 22, 305 (1997)
3. Anzenbacher, P., Dawson, J.H., Kitagawa, T.: *J. Mol. Struct.* 214, 149 (1989)
4. Arlt, V.M., Bieler, C.A., Mier, W., Weissler, M., Schmeiser, H.H.: *Int. J. Cancer* 93, 450 (2001)
5. Arlt, V.M., Cole, K.J., Phillips, D.H.: *Mutagenesis* 19, 149 (2004)
6. Arlt, V.M., Glatt, H.R., Muckel, E., Pabel, U., Sorg, B.L., Seidel, A., Frank, H., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H.: *Int. J. Cancer* 105, 583 (2003)
7. Arlt, V.M., Glatt, H.R., Muckel, E., Pabel, U., Sorg, B.L., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H.: *Carcinogenesis* 23, 1937 (2002)
8. Arlt, V.M., Hewer, A., Sorg, B.L., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H., Stiborová, M.: *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1092 (2004)
9. Arlt, V.M., Schmeiser, H.H., Osborne M.R., Kawanishi M., Kanno, T., Yagi T., Phillips D.H., Takamura-Enya, T.: *Int. J. Cancer* 118, 2139 (2006)
10. Arlt, V.M., Sorg, B.L., Osborne, M., Hewer, A., Seidel, A., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 300, 107 (2003)
11. Arlt, V.M., Stiborová, M., Henderson, C.J., Osborne, M.R., Bieler, C.A., Frei, E., Martínek, V., Sopko, B., Wolf, C.R., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H.: *Cancer Res.* 65, 2644 (2005)
12. Arlt, V.M., Stiborová, M., Hewer, A., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H.: *Cancer Res.* 63, 2752 (2003)
13. Arlt, V.M.: *Mutagenesis* 20, 399 (2005)
14. Astle, M. J., Stephenson S. P.: *J. Am. Chem. Soc.* 65, 2399 (1943)

15. Bednář, B.: *Patologie*, Avicenum, Praha (1982)
16. Bend, J.R., Foureman, C.L.: *Mar. Environ. res.* 14, 405 (1984)
17. Benson, A.M., Hunkeler, M.J., Talalay, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 5216 (1980)
18. Bieler, C.A., Arlt, V.M., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Cancer Lett.* 200, 9 (2003)
19. Bieler, C.A., Cornelius, M.G., Klein, R., Arlt, V.M., Wiessler, M., Phillips, D.H., Schmeiser, H.H.: *Int. J. Cancer* 116, 833 (2005)
20. Bieler, C.A., Wiessler, M., Erdinger, L., Suzuki, H., Enya, T., Schmeiser, H.H.: *Mutat. Res.* 439, 307 (1999)
21. Borlak, J., Hansen, T., Yuan, Z., Sikka, H.C., Kumar, S., Schmidbauer, S., Frank, H., Jacob, J., Seidel, A.: *Polycyclic Aromat. Compds.* 21, 73 (2000)
22. Coon, M.J., Ding, X.X., Pernecky, S.J., Vaz, A.D.: *FASEB J.* 6, 669 (1992)
23. Coon, M.J., Persson, A.V.: *Enzymatic Basis of Detoxification I*, Academic Press, New York (1980)
24. Dahl, A.R., Hadley, W.M.: *Toxicol. Appl. Pharm.* 67, 200 (1983)
25. Dee, A., Carlson, G., Smith, C., Masters, B.S., Waterman, M.R.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128, 650 (1985)
26. De Long, M.J., Prochaska, H.J., Talalay, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 787 (1986)
27. De Long, M.J., Santamaria, A.B., Talalay, P.: *Carcinogenesis* 8, 1549 (1987)
28. Djuric, Z., Fifer, E.K., Yamazoe, Y., Beland, F.A.: *Carcinogenesis* 9, 357 (1988)
29. Doll, R., Peto, R.: *J. Natl. Cancer Inst.* 66, 1191 (1981)
30. Edwards, R.J., Murray, B.P., Singleton, A.M., Boobis, A.R.: *Biochemistry* 30, 71 (1991)
31. Elbs, K., *J. Prakt. Chem* 48, 179 (1893)
32. Enya, T., Kawanishi, M., Suzuki, H., Matsui, S.T., Hisamatsu, Y.: *Chem. Res. Toxicol.* 11, 1460 (1998)

33. Enya, T., Suzuki, T., Watanabe, T., Hirayama, T., Hisamatsu, Y.: *Environ. Sci. Technol* 31, 2772 (1997)
34. Ertl, R.P., Winston, G.W.: *Comp. Biochem. Physiol. C*, 121, 85 (1998)
35. Felsted, R.L., Chu, A.E., Chaykin, S.: *J. Biol. Chem.* 7, 2580 (1973)
36. Garfinkel, D.: *Arch. Biochem. Biophys.* 77, 493 (1958)
37. Gut, I., Souček, P., Hodek, P.: *Pracovní lékařství* 1, 15 (1992)
38. Hájek, M.: *Diplomová práce*, PŘF UK Praha (2000)
39. Heineman, F.S., Ozols, J.: *J. Biol. Chem.* 258, 4195 (1983)
40. Hengstler, J.G., Fuchs, J., Bolmandorff, U., Meyer, S., Oechs, F.: *Scand. J. Work Environ. Health* 21, 36 (1995)
41. Hollander, P.M., Ernster, L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 169, 560 (1975)
42. Hořejší, V., Bartůňková, J.: *Základy imunologie*, Triton, Praha (1998)
43. Howard, P.C., Beland, F.A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 104, 727 (1982)
44. Hudeček, J.: *Hemoproteiny a metaloproteiny*, přednáška na PŘF UK, Praha, katedra biochemie (2004)
45. Hudeček, J., Baumruk, V., Anzenbacher, P., Munro, A.W.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 811 (1998)
46. Chen, H., Lum, A., Seifried, A., Wilkens, L.R., Le Marchand, L.: *Cancer Res.* 59, 3045 (1999)
47. *IARC. Monograph on the Evaluation of the Carcinogenic Risks to Humans. Diesel Exhausts and Some Nitroarenes* 46, IARC, Lyon (1989)
48. *IARC: Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Overall Evaluations of Carcinogenicity. Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42, suppl. 7*, IARC, Lyon, (1987)
49. Joseph, P., Xie, T., Xu, Y., Jaiswal, A.K.: *Oncol. Res.* 6, 525 (1994)
50. Kasper, C.B., Henton, D.C., Foureman, G.L., Curtis, J.F. a Hughes, M.F.: *Enzymatic Basis of Detoxification II.*, Academic Press, New York (1980)
51. Kasper, C.B.: *J. Biol. Chem.* 246, 577 (1971)

52. Kawanishi, M., Enya, T., Suzuki, H., Takebe, H., Matsui, S., Yagi, T.: *Mutat. Res.* 470, 133 (2002)
53. Kenser, T.W., Taffer, B.G.: *Adv. Free Radical Biol. Med.* 2, 347 (1986)
54. Klingenberg, M.: *Arch. Biochem. Biophys.* 75, 376 (1958)
55. Kotrbová, V.: *Diplomová práce*, PšF UK, Praha (2005)
56. Lamy E., Kassie, F., Gminski, R., Schmeiser, H.H., Mersch-Sunderman, V.: *Toxico. Lett* 146, 103 (2003)
57. Li, R., Bianchet, M.A., Talalay, P., Amzel, L.M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92, 8846 (1995)
58. Lind, C., Vadi, H., Ernster, L.: *Arch. Biochem. Biophys.* 190, 97 (1978)
59. Lindström-Seppä, P., Koivusaari, U., Hänninen, O.: *Aquatic. Toxicol.* 3, 35 (1983)
60. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: *J. Biol. Chem.* 193, 267 (1951)
61. Mansuy, D.: *Comp. Biochem. Physiol. C* 121, 5 (1998)
62. Menn, J.J.: *Environ. Health Persp.* 27, 113 (1978)
63. Mikšanová, M., Novák, P., Frei, E., Stiborová, M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 69, 589 (2004)
64. Mikšanová, M., Šulc, M., Rýdlová, H., Schmeiser, H.H., Frei, E., Stiborová, M.: *Chem. Res. Toxicol.* 17, 663 (2004)
65. Miller, M.J., Sipes, I.G., Perry, D.F., Crarter, D.E.: *Drug. Metab. Dispos.* 13, 527 (1985)
66. Montano, M.M., Katzenellenbogen, B.S.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 2581 (1997)
67. Murahashi, T., Iwanaga, E., Watanabe, T., Hirayama, T.: *Health Sci.* 49, 386 (2003)
68. Murahashi, T., Watanabe, T., Otake, S., Hattori, Y., Takamura, T., Wakabayashi, K., Hirayana, T.: *J. Chromatogr. A* 992, 101 (2003)
69. Nadler, S.G., Strobel, H.W.: *Arch. Biochem. Biophys.* 261, 418 (1988)

70. Nagy, E., Zeisig, M., Kawamura, K., Hisamatsu, Y., Sugeta, A., Adachi, S., Moller, L.: *Carcinogenesis* 26, 1821 (2005)
71. Nebert, D.W., Nelson, D.R., Feyereisen, R.: *Xenobiotica* 19, 1149 (1989)
72. Nelson, D.R., Kamataki, T., Waxman, D.J., Guengerich, F.P., Estabrook, R.W., Feyereisen, R., Gonzales, F.J., Coon, M.J., Gunsalus, I.C., Gotoh, O., Okada, K., Nebert, D.W.: *DNA Cell Biol.* 12, 1 (1993)
73. Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C., Nebert, D.W.: *Pharmacogenetics* 6, 1 (1996)
74. Němečková, A.: *Lékařská chemie a biochemie*, Avicenum, Praha (1991)
75. O'Leary, K.A., Li, H.C., Ram, P.A., McQuiddy, P., Waxman, D.J., Kasper, C.B.: *Mol. Pharmacol.* 1, 46 (1997)
76. Omura, T., Sato, R.: *J. Biol. Chem.* 239, 2370 (1964)
77. Oprian, D.D., Coon, M.J.: *J. Biol. Chem.* 257, 8935 (1982)
78. Patterson, A.V., Saunders, M.P., Chinje, E.C., Patterson, L.H., Stratford, I.J.: *Anticancer Drug Des.* 13, 541 (1998)
79. Phousongphouang, P.T., Grosovsky, A.J., Eastmond, D.A., Covarrubias, M., Arey, J.: *Mutat. Res.* 472, 93 (2000)
80. Pritsos, C.A.: *Chem. Biol. Interactions* 129, 195 (2000)
81. Ram, P.A., Waxman, D.J.: *J. Biol. Chem.* 267, 3294 (1992)
82. Reid, T.M., Morton, K.C., Wang, C.Y., King, C.M.: *Environ. Mutagen.* 6, 705 (1984)
83. Rendic, S., DiCarlo, F.J.: *Drug Metab. Rev.* 29, 413 (1997)
84. Robertson, J.A., Chen, H.C., Nebert, D.W.: *J. Biol. Chem.* 261, 15794 (1986)
85. Ross, D., Beall, H.D., Siegel, D., Traver, R.D., Gustafson, D.L.: *British J. Cancer* 74, 27 (1996)
86. Rosvold, E.A., McGlynn, K.A., Lustbader, E.D., Buetow, K.H.: *Pharmacogenetics* 5, 199 (1995)

87. Segura-Aguilar, J., Kaiser, R., Lind, C.: *Biochem. Biophys. Acta* 1120, 33 (1992)
88. Seidel, A., Dahman, D., Krekeler, H., Jacob, J.: *Int. J. Hyg. Environ. Health* 204, 333 (2002)
89. Shen, A.L., Kasper, C.B.: *Handbook of Experimental Pharmacology*, 35 (1993)
90. Schacter, B.A., Nelson E.B., Marver, H.S., Masters, B.S.: *J. Biol. Chem.* 247, 3601 (1972)
91. Schlager, J.J., Powis, G.: *Int. J. Cancer.* 45, 403 (1990)
92. Schulz, W.A., Krummeck, A., Rosinger, I., Eickelmann, P., Neuhaus, C., Ebert, T., Schmitz-Drager, B.J., Sies, H.: *Pharmacogenetics* 7, 235 (1997)
93. Slaga, T.J.: *Mechanism of Tumor Promotion 1-4*, CRC Press, Boca Raton (1984)
94. Stiborová M.: *Biochemie chemické karcinogeneze*, přednáška na PřF UK, Praha, katedra biochemie (2005)
95. Stiborová, M., Frei, E., Hodek, P., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Int. J. Cancer* 113, 189 (2005)
96. Stiborová, M., Frei, E., Schmeiser, H.H., Anzenbacher, P.: *Drug Metab. Drug Interact* 9, 177 (1991)
97. Stiborová, M., Frei, E., Sopko, B., Sopková, K., Marková, V., Lanková, M., Kumstýrová, T., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Carcinogenesis* 24, 1695 (2003)
98. Stiborová, M., Frei, E., Sopko, B., Wiessler, M., Schmeiser, H.H.: *Carcinogenesis* 23, 617 (2002)
99. Stiborová, M., Hájek, M., Frei, E., Schmeiser, H.H.: *Gen. Physiol. Biophys.* 20, 375 (2001)
100. Stiborová, M., Hudeček, J., Hodek, P., Frei, E.: *Chem. Listy* 93, 229 (1999)
101. Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J. Jr., Martínek, V., Páca, J.: *Chem. Listy* 98, 876 (2004)
102. Stiborová, M., Hudeček, J., Páca, J.: *Bull. Čs. Spol. Biochem. Mol. Biol.* 28, 57 (2000)
103. Stiborová, M., Mikšanová, M., Smrček, S., Bieler, C.A., Breuer, A., Klokow, K.A., Schmeiser, H.H., Frei, E.: *Carcinogenesis* 25, 833 (2004)

104. Stiborová, M., Mikšanová, M.: *Živa* 4, 146 (1999)
105. Stiborová, M.: *Bull. Čs. Spol. Biochem. Mol. Biol.* 27 (2), 82 (1999)
106. Stiborová, M.: *Chem. Listy* 96, 784 (2002)
107. Stiborová, M.: *Xenobiochemie*, přednáška na PřF UK, Praha, katedra biochemie (2005)
108. Tamburini, P.P., Schenkman, J.B.: *Mol. Pharmacol.* 30, 178 (1986)
109. Taniguchi, H., Imai, Y., Sato, R.: *Arch. Biochem. Biophys.* 232, 585 (1984)
110. Tomatis, L., Aitio, A., Wilbourn, J., Shuker, L.: *Jpn. J. Cancer Res.* 80, 795 (1989)
111. Trush, M.A., Kensler, T.W.: *Free Radical. Biol. Med.* 10, 201 (1991)
112. Turek, B., Hrubý, S., Černý, M.: *Nutriční toxikologie*, Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví, Brno (1994)
113. Vermilion, J.L., Ballou, D.P., Massey, V., Coon, M.J.: *J. Biol. Chem.* 256, 266 (1981)
114. Voet, D., Voet, J.G.: *Biochemie*, Victoria Publishing, Praha (1995)
115. Vokurka, M.: *Praktický slovník medicíny*, Maxdorf, Praha (1994)
116. Wang, M., Roberts, L.D., Paschke, R., Shea, T. M., Masters, B.S., Kim, J.J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 8411 (1997)
117. Watanabe, T., Hasei, T., Takahashi, T., Otake, S., Murahashi, T., Takamura, T., Hirayama, T., Wakabayashi, K.: *Mutat. Res.* 538, 121 (2003)
118. Weinberg R. A.: *Jediná odrodilá buňka: Jak vzniká rakovina*, Academia, Praha (2003)
119. Ziegler, D.M., Petti, F.H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 15, 188 (1964)
120. <http://bioinf.leeds.ac.uk/promise> (6.4.2006)
121. <http://drnelson.utmem.edu/CytochromeP450.html> (6.4.2006)
122. <http://www.anaesthetist.com/physiol./basics/matabol/cyp/cyp.htm> (6.4.2006)
123. <http://www.expasy.ch> (6.4.2006)
124. http://www.farmakologie.net/interakce_cytochrom.php (6.4.2006)

125. <http://www.p450.klv.dk/gallery/#Reduc> (6.4.2006)
126. <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=2BDM> (6.4.2006)
127. <http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR.htm> (6.4.2006)
128. http://www.uky.edu/Pharmacy/ps/porter/CPR_enzymology.htm (6.4.2006)

