

METABOLISMUS KARCINOGENNÍCH UHLOVODÍKŮ*

OTOMAR PIHAR

Endokrinologické oddělení polykliniky a III. interní klinika Karlovy university v Praze

V současné době je známo několik set chemicky definovaných sloučenin, které vyvolávají u pokusných zvířat zhoubné bujení. Tyto látky patří chemicky do velmi různých tříd a přes vynaložení velikého úsilí a přes důvtipné metody se nepodařilo nalézt jasný vztah konstituce sloučenin a jejich karcinogenní schopnosti. Mezi těmito sloučeninami se vyznačují karcinogenní polynukleární aromatické uhlovodíky a jejich deriváty tím, že jsou účinné v nepatrných množstvích, že doba mezi jejich aplikací a vznikem nádoru je poměrně krátká, a konečně že jsou přítomny v životním prostředí člověka v množstvích dostatečných, aby byl oprávněn jejich výzkum se zřetelem k jejich možnému významu pro karcinogenesu u člověka.

Podnětem k objevu a studiu karcinogenních uhlovodíků bylo pozorování, že u pracovníků v průmyslových odvětvích, která se zabývají zpracováním uhelného dehtu, se vyskytují ve zvýšené míře jisté typy nádorů proti ostatním třídám obyvatelstva. Trvalo velmi dlouho, než se po prvé podařilo vyvolat u pokusných zvířat karcinom působením dehtu [42], protože koncentrace účinné látky, t. j. benzpyrenu, je v surovém materiálu nízká (zlomek procenta). Pokus, který vedl k průkazu karcinogenity uhelného dehtu, je nejenom v jistém smyslu mezníkem v experimentální onkologii, ale též vzácným příkladem trpělivosti japonských pracovníků, neboť po tři roky bylo nutno potírat ucho králíka dehtem, než se dostavil výsledek.

Objev japonských autorů poskytl metodický předpoklad k izolaci účinné součásti uhelného dehtu, protože byl umožněn biologický test karcinogenity na zvířatech. Brzy bylo zjištěno, že také myš je vhodným indikátorem karcinogenity, a vhodným způsobem aplikace účinných frakcí dehtu, totiž potírání kůže benzenovým roztokem, byla inkubační doba snížena z let na měsíce a týdny. Brzy bylo rozvinuto úsilí o izolaci účinné látky, provázené řadou syntheses v řadě polynukleárních aromatických uhlovodíků jednak v londýnské pracovní skupině kolem Kennawaye, Cooka a Hiegera, později souběžně v USA u Sheara, Fiesera, Andervonta a j. Po osmnácti letech od průkazu karcinogenity dehtu byla izolována účinná látka 3,4-benzpyren a její konstituce potvrzena synthesesou [11]. Benzpyren je zodpovědný za největší část karcinogenního účinku dehtu, i když nemusí být jediným karcinogenem v surovině přítomným.

Když bylo zřejmé, že účinná látka kamenouhelného dehtu obsahuje kostru polynukleárního aromatického uhlovodíku, byla synteticky získána řada

* Prednesené na sjazde chemikov v Banskej Štiavnici v júli 1954.

sloučenin tohoto typu, které se v dehtu nevyskytují, ale mají více méně silnou karcinogenní aktivitu. Od anthracenu je odvozen na př. 1,2,5,6-dibenzanthracen, od fenanthrenu 2-methyl-3,4-benzfenanthren a 1,4-dimethyl-2,3-benzfenanthren, od chrysenu 1,2-dimethylchrysen, který lze odvodit též od fenanthrenového jádra jako 3,4-dimethyl-1,2-benzfenanthren. Od fluorenu, který obsahuje pětičlenné jádro, se odvozují karcinogeny 1,2,5,6-dibenzfluoren nebo 2-acetamidofluoren, zajímavý tím, že jeho karcinogenita zůstává zachována, je-li methylenová skupina nahrazena sírou nebo kyslíkem. Jako příklad heterocyklických karcinogenních uhlovodíků uvádím 3,4,5,6-dibenzkarbazol a 1,2,5,6-dibenzakridin. Rozsáhlejší výčet syntetických karcinogenů je mimo rámec této přednášky, protože v roce 1949 bylo známo již asi 300 sloučenin toho druhu [16]. Zvláštní pozornost vzbudila syntéza silného karcinogenního uhlovodíku 20-methylcholanthrenu vztahem ke struktuře steroidů i výchozím materiálem, kterým byla kyselina desoxycholová [41, 10], tedy sloučenina, která je normální součástí organismu, což vyvolalo četné diskuse o existenci endogenního karcinogenu.

Je samozřejmé, že byly četné pokusy o nalezení vztahu konstituce chemických karcinogenů ke karcinogenní účinnosti. Z počátku bylo možno pouze srovnávat sílu karcinogenní účinnosti různě substituovaných základních účinných uhlovodíků. Z posledních let se datuje pokus o kvantitativní vystižení molekulárních vlastností karcinogenních uhlovodíků. Bylo vypočteno metodami moderní teoretické chemie, že v molekule karcinogenů se vyskytuje oblast o vyšší hustotě elektronů, která z počátku byla považována za charakteristickou pro karcinogenní účinek sloučeniny (Pullman, Daudel a j.) a byla označena jako zona K (Krebs, Cancer). S přibývajícím materiálem se ukázalo, že jsou karcinogeny, kde se hypothesis o zoně K nedá použít. Zdá se však, že u karcinogenních uhlovodíků je existence zony K pravidlem, i když korelace mezi účinkem a nenasyčeností fenanthrenoidní dvojně vazby 9,10 není vždy těsná.

Vztah konstituce karcinogenů k jejich účinnosti je problém, který nelze řešit pouze po chemické stránce. Je dobře známo, že karcinogenita není univerzální v tom smyslu, že by kterýmkoliv karcinogenem bylo možno dosáhnout maligního bujení kterékoliv tkáni u kteréhokoliv organismu. Karcinogeny jeví význačnou specifitu ke tkáni; jsou známy karcinogeny specifické pro játra, pro močový měchýř, pro kůži, plíce atd. V mnohých případech se projevuje význačná druhová specifita, jejímž příkladem je arsenitan, karcinogenní pro člověka, avšak bez stejného účinku pro laboratorní zvířata, pokud byla zkoušena [23]. I v mezích druhu se projevuje různá susceptibilita ke karcinogennímu účinku téhož karcinogenu, jak bylo podrobně studováno na různých homozygotních kmenech myšek. Karcinogenita je hluboce ovlivňována způsobem aplikace, dietou a řadou vedlejších podmínek. Tyto průvodní okolnosti

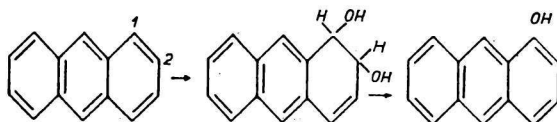
jsou s hlediska onkologického stejně důležité, jako chemické vlastnosti karcinogenů. Vedou k otázce, jakým způsobem zasahují karcinogeny do normálních životních pochodů organismu nebo tkáně, s níž přijdou ve styk. Ke vzniku nádoru je třeba kombinace jistých vlastností karcinogenní sloučeniny s jistými, dosud neznámými vlastnostmi tkáně, které se projevují jako její citlivost ke karcinogenu.

Příčina karcinogenního účinku není známa. V posledním desetiletí se však nahromadilo sdostatek pokusného i spekulativního materiálu, aby bylo možno shrnout výsledky a odhadnout další cesty výzkumu, které by vedly k řešení problému chemické karcinogeny. To platí zvláště o aromatických karcinogenech, u nichž studium pokročilo k izolaci alespoň některých konečných metabolických zplodin. Podrobně byl studován metabolismus benzpyrenu, dibenzanthracenu a methylcholanthrenu.

Karcinogenní uhlovodík, pokud je v organismu nezměněn, může působit pouze fyzikálně chemicky, na př. rozpustností v lipidech nebo adsorpcí na bílkoviny tkání. Může též působit schopností adice. Benzpyren tvoří rozpustné komplexy s puriny [39], žlučovými kyselinami a s nukleovými kyselinami; tvorba těchto posledních kyselin byla uváděna v souvislost s karcinogenním účinkem [3]. Chybějí však experimentální podklady pro odhad, do jaké míry tyto vlastnosti mohou souviset s karcinogenním účinkem. Pokud jde o rozpustné komplexy, zdá se, že jejich tvorba snižuje karcinogenitu uhlovodíku, protože je rychleji oběhem odstraňován z místa aplikace.

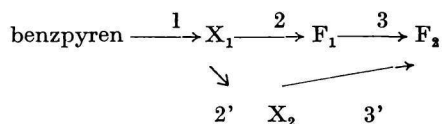
Během oxidačního metabolismu karcinogenních uhlovodíků dochází na-proti tomu k tvorbě intermediárních zplodin, u nichž je reakce s tkáňovými součástmi nejen pravděpodobná, ale zčásti i pokusně prokázána. Tím ovšem není řečeno, že je již zřejmý vztah těchto reakcí ke karcinogenezi.

Pro diskusi o biologické oxidaci karcinogenních uhlovodíků je nezbytné pojednat též o metabolismu vícejaderných uhlovodíků postrádajících karcinogenní vlastnosti. Organismus detoxifikuje aromatické a některé heterocyklické uhlovodíky nebo jejich deriváty tak, že je převádí ve fenoly a vylučuje je v konjugované formě jako glukuronové nebo merkapturové kyseliny. V některých případech byly mimo fenolické deriváty izolovány též dialkoholy. Na příkladě metabolismu anthracenu bylo ukázáno [4], že se močí vylučuje 1,2-dihydro-1,2-dihydroxyanthracen, který lze snadno převést in vitro v 1-hydroxyanthracen odštěpením vody za obnovení původní dvojné vazby:



Dioly byly izolovány jako metabolity též u naftalenu [43] a fenanthrenu [6]. Snadnost převodu diolů v aromatické fenoly působením kyseliny vyvolala domněnku, že dioly jsou prekursori fenolických derivátů. Tato představa silně ovlivnila interpretaci výsledků, když byly izolovány zplodiny metabolismu benzpyrenu a jiných karcinogenních uhlovodíků.

Weigert a Mottram [38] obsírně shrnují a doplňují do té doby získané výsledky o izolaci a identifikaci sloučenin, které vznikají u pokusných zvířat z podaného benzpyrenu. Na základě rozpustnosti, chování při sloupcové chromatografii s různými adsorbenty a fluorescenčních spekter byly rozlišeny čtyři deriváty, které vznikají z benzpyrenu v různých tkáních, a označeny X_1 , X_2 , F_1 a F_2 . Z nich pouze F_2 mohl být identifikován jako 8-benzpyrenol, pravděpodobně znečištěný 10-benzpyrenolem, jak ukázaly pozdější pokusy. Schema, jak je u těchto autorů uvedeno, je pokusem o vysvětlení sledu reakcí při metabolismu benzpyrenu a pravděpodobné konstituce metabolitů:



Oba metabolity X jsou pevně vázány na tkáňové součásti a způsob jejich izolace zahrnuje hydrolysu silným KOH v prostředí zředěného methanolu. Žádný z obou nemá vlastnosti slabé kyseliny, jak je tomu u derivátů F. Reakce 2' je proveditelná in vitro působením zředěné kyseliny — z X_1 vzniká F_1 . Derivát X_2 je za obdobných podmínek stálý vůči kyselině, ale zahřát s kyselinou na 150 °C v zatavené trubici poskytuje F_2 čili benzpyrenol. Podle názoru Weigerta a Mottrama vyhovuje pozorovaným vztahům představa, že benzpyren v první reakci biologické přeměny přijme peroxyd vodíku v poloze 8,9, vzniklý diol se spojí s některou součástí tkáně na derivát X_1 8-OR₁-9-OH-8,9-dihydrobenzpyren a v derivát X_2 8-OR₁-9-OR₂-8,9-dihydroxybenzpyren. Derivátu F_1 pak připisují konstituci 8-OR₁-benzpyrenu.

Jak vidět, je schema přeměny benzpyrenu do velké míry závislé na předpokladu, že dioly jsou prekursori fenolů též u karcinogenních uhlovodíků. Z uvedených metabolitů je zajištěna pouze povaha derivátu F_2 . Tato sloučenina byla izolována též z feces krysu po injekcích benzpyrenu jako methoxyderivát [2], identifikována s 8-methoxybenzpyrenem, získaným úplnou syntesou [12]. Ve feces se vyskytuje s isomerním 10-benzpyrenolem, jehož konstituce byla rovněž potvrzena syntesou. Oba benzpyrenoly přecházejí in vivo i in vitro snadno v 5,8-, resp. v 5,10-dihydroxybenzpyren a při oxydaci v příslušné chinony, získané již dříve při oxydaci benzpyrenu kyslíčnickem chromovým [37].

Konečné stadium biologické oxydace benzpyrenu je tedy dokonale zajištěno. Předpoklad Weigerta a Mottrama o výskytu 8,9-dihydroxybenzpyrenu, resp.

jeho konjugátů jako obligátních mezizplodin tvorby fenolů, je velmi závažný nejen pro metabolismus benzpyrenu, ale i jiných karcinogenních uhlovodíků, protože fenoly byly izolovány jako metabolické zplodiny též z 1,2,5,6-dibenzanthracenu. Otázka obligátní intermediární tvorby benzpyrendiolu zůstala nedořešena, ačkoliv je rozhodující pro mechanismus chemických pochodů, které mohou nastat v tkáni během přeměny uhlovodíku. Přesto lze uvést řadu okolností, které nasvědčují, že tvorba diolů — která je u karcinogenních uhlovodíků ryze hypotetická — nemusí být nutným mezistupněm vzniku fenolů. Tak bližší studium přeměny naftalenu ukázalo, že tvorba fenolů a diolů jsou pochody na sobě nezávislé [5]. Při studiu oxydace příbuzných uhlovodíků peroxydem vodíku za katalysy kysličníkem osmičelým bylo zjištěno, že se sice tvoří dioly, ale na jiných místech, než odpovídalo metabolickým fenolům [9]. Pokusné podmínky, které vedou k izolaci derivátů X pevně vázaných na tkáňové součásti, t. j. hydrolysa silným methanolickým roztokem louhu, se dosti těsně přibližují podmínkám, užitým později k izolaci frakce benzpyrenu, pevně vázaného na proteiny tkání [20]. Přítomnost peroxydu vodíku v tkáních, která je předpokladem adice na uhlovodík, je sama o sobě problémem, právě tak jako přítomnost peroxydásy v ssavčích tkáních. Domnívám se, že pokusný materiál, uvedený u obou autorů, nepostačuje k závěru, že benzpyrendiol, resp. jeho konjugáty jsou metabolickou cestou tvorby fenolu. Stejně oprávněně by bylo vysvětlení, že tvorba konjugátů je jinou metabolickou cestou, která zabraňuje tvorbě fenolů z benzpyrenu. Je tedy zřejmé, že tato otázka potřebuje dalšího pokusného zpracování.

Autorům, kteří se zabývali izolací a identifikací benzpyrenolu z feces, bylo nápadné, že sice byly nalezeny monofenoly, substituované v poloze 8 a 10, nikoliv však v poloze 5, která je při jiných substitucích, na př. při chloraci, nejreaktivnější. Pozorovaný úkaz byl vysvětlován tak, že v organismu probíhá oxydace jinak než při oxydaci ryze chemické in vitro. Byla vyslovena domněnka, že se benzpyren kombinuje s některou součástí tkání a pro sterickou zábranu takto vzniklou nemůže být oxydován v poloze 5. Také tento názor vyžaduje dalšího experimentálního potvrzení. Ve feces jsou současně s monofenoly přítomny 5,8- a 5,10-difenoly. Oba monofenoly, 8- i 10-, snadno již autooxydací přecházejí v difenoly. Není důvodu se domnívat, že 5-hydroxybenzpyren by rovněž nebyl snadno oxydovatelný v biologickém prostředí, které je pro oba druhé monofenoly oxydační. 5-benzpyrenol by nebylo možno ve feces dokázat také tehdy, kdyby jeho oxydační metabolismus byl poměrně rychlý. V tom případě by ovšem 5,8- a 5,10-dihydroxybenzpyreny vzniklé z 5-benzpyrenolu byly tytéž, které vznikají z obou druhých monofenolů. Evidence o nepřítomnosti 5-benzpyrenolu ostatně není úplná. 8-benzpyrenol a 10-benzpyrenol byly izolovány jako methoxyderiváty dělením na sloupci kysličníku hlinitého [2] se značnými ztrátami materiálu, které byly způsobeny neúplným

dělením. Proto zbývá možnost, že 5-benzopyrenol mohl být přehlédnut. Tato domněnka je podložena vlastními pokusy (Spálený a O. P., nepubl.), které ukázaly, že se při šetrné oxydaci benzopyrenu manganistanem tvoří mimo jiné nejméně tři sloučeniny, jejichž chromatografické chování a spektra v ultrafialové oblasti svědčí pro konstituci monofenolů. Reaktivita různých poloh benzopyrenové molekuly se podle toho sice liší, ne však řádově. K rozhodnutí celé otázky je třeba proměřit zdánlivé oxydační potenciály u všech tří isomerních benzopyrenolů a z nich posoudit možnost výskytu 5-benzopyrenolu při oxydačním metabolismu uhlovodíku, i když by přímý důkaz jeho přítomnosti v tkáních selhal.*

Mezi látky vznikající při biologické přeměně karcinogenů je nutno počítat též sloučeniny benzopyrenu, dibenzanthracenu a methylcholanthrenu s proteiny myši epidermis. Synthesa uhlovodíků poznačených radioaktivním isotopem uhlíku umožnila sledovat jejich osud až do vyvinutí nádoru. Již za několik hodin po potření kůže roztokem benzopyrenu nastává jeho čilá přeměna a jsou prokazatelné jak kyselé deriváty (pravděpodobně fenoly), tak frakce uhlovodíku chemicky vázaná na bílkoviny v místě působení. Obě frakce dosahují maxima asi po jednom až po dvou dnech, kdy množství karcinogenu vázaného chemicky na bílkoviny dosahuje asi jednoho procenta celkové dávky (50 μ g). Jeho množství pak poněkud klesne a zůstává poměrně konstantní po čtyři týdny, kdy začíná postupný pokles [15]. Výsledky jsou potvrzením o několik měsíců starší práce [20], v níž je uvedena řada dalších zajímavých podrobností. Nebyla nalezena frakce benzopyrenu, chemicky vázaného na nukleové kyseliny. Frakce vázaná na proteiny po aplikaci na kůži byla obsažena pouze v epidermis, nikoliv v dermální části ani v jiných orgánech. Vlivy, které působí anti-karcinogenně, jako ozařování kůže potřené benzopyrenem nebo současná aplikace methylcholanthrenu, snižují zároveň množství benzopyrenu chemicky vázaného na bílkoviny. Zvláště zajímavé je pro tento typ přeměny benzopyrenu, že neprobíhá v přežívající kůži čerstvě usmrčené myši (!). Obdobných výsledků bylo dosaženo při podávání radioaktivního dibenzanthracenu [15] a methylcholanthrenu [13]. 2-Acetaminofluoren, který produkuje nádory převážně v játrech, tvoří chemicky vázané proteidy s jaterními bílkovinami [40].

Uvedené výsledky s karcinogenními uhlovodíky jsou obdobou vztahů, které byly mnohem podrobněji prostudovány s azobarvivou [21]. Velmi stručně shrnuto: bylo prokázáno, že pouze ta barviva (typu dimethylaminoazobenzenu), která vyvolávají tvorbu hepatomů, tvořila chemicky vázané proteidy. Veškeré vlivy, které působily na karcinogenitu barviva, ovlivňovaly souhlasně tvorbu konjugátů a jaterní bílkovinou. Podařilo se též elektroforeticky izolovat

* V době tisku tohoto referátu byl izolován ve zdejších laboratořích (O. Pihar a J. Spálený) z krysích feces 5-hydroxybenzopyren a po methyloací identifikován srovnáním se syntetickým 5-methoxybenzopyrenem. Práce vyjde v Chem. listech.

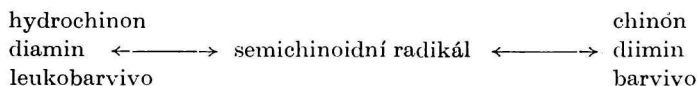
bílkovinu, na niž je většina barviva vázána. Je to pomalu se pohybuující komponenta *h* jaterních bílkovin.

U dvou chemicky různých skupin karcinogenních látek byl tedy prokázán vztah mezi karcinogenitou, modifikujícími vlivy a mezi tvorbou chemických sloučenin karcinogenu s bílkoviny v místě působení. Význam tohoto zjištění je zřejmý bez komentáře.

Zůstává otázkou, jakým způsobem může aromatický uhlovodík reagovat s bílkoviny. Táž otázka se vyskytuje v těch nečetných případech, kdy byl pozorován účinek benzpyrenu na enzymy *in vitro*. Při sledování otázky mechanismu působení benzpyrenu na bílkoviny je třeba věnovat pozornost jeho účinku na ten typ enzymů, které potřebují k aktivitě volné thiolové skupiny. Důvodem pro to je, že karcinogenesa byla spekulativně již dávno spojována s ovlivněním thiolů v tkáni přítomných, protože thiolové sloučeniny zasahují do regulace základních životních funkcí živé hmoty, jako je permeabilita, mitosa, oxydativní fosforylace, a j. Na druhé straně jsou thiolové skupiny bílkovin jejich nejreaktivnější funkční skupinou. Ačkoliv benzpyren nereaguje obecně s thiolovými skupinami toho typu, který je obsažen v cysteinu, jsou jím brzděny proteolytické enzymy papain, kathepsin [31] a sukcinodehydrogenáza [27]. Bližší studium inhibice sukcinodehydrogenázy ukázalo, že nepatrná část thiolových skupin v užitém preparátu se stává nedokazatelnou za přítomnosti benzpyrenu [24].

Podrobněji než u karcinogenních uhlovodíků byl sledován vztah mezi karcinogenitou a inhibicí thiolových enzymových systémů u štěpných zplodin karcinogenního barviva N-dimethyl-*p*-aminoazobenzenu [28]. Bylo zjištěno, že pouze sloučeniny s chinonoidní strukturou jsou vysoce toxické pro sukcinodehydrogenázu, která byla studována jako typický zástupce thiolových soustav. Pokud metabolické zplodiny azobarviva, jako *p*-aminofenol, N-dimethyl-*p*-fenyldiamin, nebyly cytochromovou soustavou částečně zoxydovány, neměly inhibiční účinek.

V této souvislosti je třeba zmínit se o novějších názorech na průběh reversibilních oxydačních pochodů. Michaelis [17, 18] dokázal, že u četných organických oxydoredukčních soustav lze v průběhu oxydoredukčního pochodu prokázat existenci semichinoidního radikálu podle schématu:

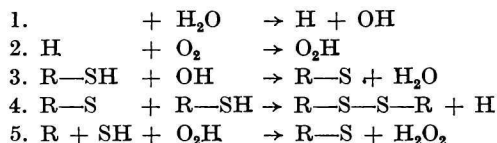


Úplná oxydace dihydroformy oxydoredukčního systému zahrnuje ztrátu dvou elektronů. Semichinoidní mezistupeň je pouze o jeden elektron chudší než redukovaná forma, obsahuje tedy nepárový elektron, a má proto povahu radikálu. V souvislosti s tím je semichinoidní forma zpravidla nestálá a elektro-

chemickými metodami prokazatelná jen ve vhodných případech, kdy je radikál v důsledku vlastností organické molekuly stabilisován. Pro mechanismus inhibice thiolových enzymů je zajímavé, že některé methylované deriváty *p*-fenylendiaminu — který během oxydace inhibuje sukcinodehydrogenázu — mají poměrně stálé semichinoidní mezistupně oxydace [19]. Proto je zcela opodstatněná Potterova domněnka, že inhibice sukcinodehydrogenázy je způsobována kombinací radikálu, na př. *p*-fenylendiaminu s thiolovou skupinou sukcinodehydrogenázy. S tím je v souhlasu též pozorování, že toxický vliv dimethyl-*p*-fenylendiaminu na tkáňové kultury přísluší pouze růžovému semichinoidnímu radikálu, nikoliv vyšším oxydovaným formám [8].

Je ještě další vztah volných radikálů jednak k inaktivaci thiolových soustav, jednak ke karcinogenezi. Je obecně známo, že ionisující záření je vysloveně karcinogenní. Účinek záření na živou hmotu, resp. její komponenty, je komplexní. V rámci této diskuse je však zvláště zajímavá tvorba kyslíkových radikálů v ozařovaných vodných roztocích. Tyto radikály O_2H a OH jsou silně oxydačně účinné, a proto inaktivují též thiolové soustavy.

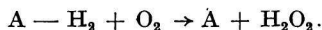
Oxydace cysteinu zářením gama byla formulována [33] jako řetězový pochod, v němž nositelem řetězu jsou atomy vodíku, pocházející v iniciační reakci z molekuly vody, rozštěpené absorbovaným kvantem:



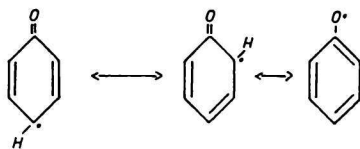
V uvedeném schematu je obecně zajímavá reakce 3 a 4, protože vysvětluje řadu pozorování o oxydaci aromatických látek, která probíhá za současné autooxydace thiolových sloučenin. K oxydaci thiolu $R-SH$ může dojít též mnoha jinými způsoby, na př. těžkým kovem, ferricytocychem a jinými monovalentními oxydačními činidly. Jako oxydační zplodina vzniká radikál $R-S$, který oxyduje další molekulu thiolu na disulfid, a při tom vzniká atomový vodík, s molekulárním kyslíkem poskytující kyslíkový radikál. I když je toto schema do značné míry hypotetické a jsou možné též jiné formulace, je v něm zachycen charakteristický rys autooxydačního pochodu, který je založen na vzniku volných kyslíkových radikálů se silným oxydačním účinkem. Podobným způsobem lze formulovat též autooxydaci jiných autooxydabilních látek, na př. kyseliny askorbové. Je třeba zdůraznit, že kyslíkové radikály mají mnohem silnější oxydační schopnost než peroxyd vodíku, jehož vznik vlastně znamená inaktivaci oxydačně účinných radikálů. Je-li v autooxydační soustavě přítomna aromatická nebo heterocyklická sloučenina, schopná oxydace, je oxydována kyslíkovými radikály. Z četných příkladů

uvádím pouze oxydaci tyraminu na oxytyramin, chinolinu na oxychinolin, acetanilidu na *p*-oxyacetanilid v roztoku, kde probíhá autooxydace askorbátu, eventuálně katalysovaná stopami kovů [36].

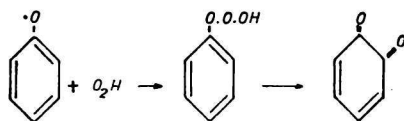
Pro naši diskusi je nejdůležitější, že mezi aromatické látky, které jsou schopny oxydace za přítomnosti autooxydujících látek, patří karcinogenní uhlovodíky. Zasahují jak prooxydačně, tak antioxydačně do katalytických pochodů samých a v některých případech byly izolovány tytéž fenoly, které vznikají metabolickou přeměnou. Z roztoků solubilisovaného benzpyrenu, v nichž současně probíhala oxydace thiolů [7], nebo askorbátu [22] byly izolovány 5,8-, resp. 5,10-benzpyrenchinony, které jsou konečným stadiem oxydace benzpyrenu přes fenoly. Při pokusech o interpretaci oxydace aromatických látek při autooxydaci se v literatuře opětovně setkáváme se zakořeněnou starší představou, že kooxydační reakce vychází z peroxydu vodíku, který se tvoří během autooxydace podle jednoduché reakce:



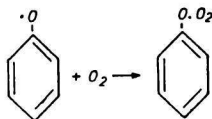
Formulace autooxydačního pochodu jako radikálové řetězové reakce a rozsáhlá, avšak neuspořádaná experimentální evidence svědčí pro výskyt kyslíkových radikálů při autooxydačních pochodech. Pro mechanismus oxydace aromatických látek je správná formulace autooxydačního pochodu rozhodujícího významu. Je-li považován peroxyd vodíku za výchozí oxydační činidlo, směřují výklady kooxydačního pochodu k adici peroxydu a odštěpení vody na fenol (viz výše) a k postulátu přítomnosti peroxydásy v živočišných tkáních. Peroxydása v nich dosud spolehlivě prokázána nebyla. Jestliže se však během autooxydačního pochodu tvoří kyslíkové radikály, působí redukující látka (na př. kyselina askorbová a thioly) v kombinaci s molekulárním kyslíkem stejně, jako by působila peroxydása v kombinaci s peroxydem. Z organické preparativní chemie je známo mnoho reakcí, které vedou k oxydaci aromatických sloučenin radikálovým mechanismem. S hlediska diskuse o mechanismu oxydace aromatických karcinogenních uhlovodíků je charakteristická oxydace fenolu v isomerní dioxibenzeny, která probíhá jednak Fentonovým činidlem, jednak působením paprsků X. Fentonovo činidlo je, jak známo, směs peroxydu vodíku s dvojmocným železem, která je generátorem kyslíkových radikálů O_2H a OH . Tytéž radikály vznikají při ozařování vodných roztoků ionisujícím zářením. Při oxydaci fenolu se primárně tvoří volný radikál [32], který lze psát v mezních vzorcích:



Fenolový radikál pak reaguje buď s dalším radikálem kyslíku:



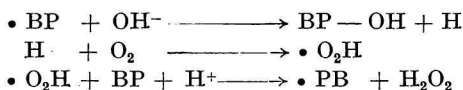
nebo s kyslíkem samotným:



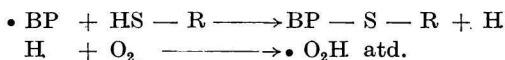
Jako konečná zplodina se v tomto případě tvoří převážně *o*-chinon.

Kooxydace benzpyrenu při autooxydaci kyseliny askorbové nebo jiných sloučenin, při níž se vyskytují volné radikály kyslíku, nás opravňuje k závěru, že karcinogenní uhlovodíky se při tomto pochodu oxydují rovněž radikálovým mechanismem.

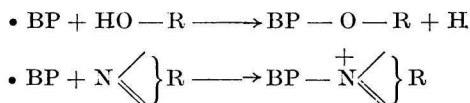
Oxydaci ve vlastním slova smyslu je podle definice vždy ztráta elektronu. Stabilisace molekuly v konečnou sloučeninu je pouze důsledkem reakce molekul přítomných v roztoku s vysoce reaktivním radikálem. Proto konečné sloučeniny vznikající z benzpyrenu mohou být různé povahy; jsou-li přítomny pouze molekuly rozpouštědla, na př. vody, ionisované v ionty H^+ a OH^- (v roztocích solubilisovaného benzpyrenu), vede reakce k fenolu a získáváme schema pro autokatalysu oxydace benzpyrenu (radikály jsou označeny tečkou před symbolem):



Je-li přítomna thiolová skupina, na př. náležející bílkovině, je odůvodněné podobné reakční schema:



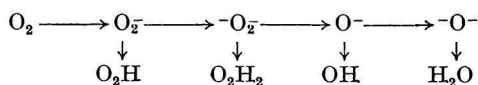
Obdobně si lze představit reakce s jinými volnými skupinami, které jsou obsaženy v bílkovinných molekulách, s hydroxylem tyrosinu nebo s heterocyklickým dusíkem histidinu:



Je zřejmé, že vazba benzpyrenu na bílkoviny je snadno vysvětlitelná reakcí radikálu benzpyrenu s volnými funkčními skupinami bílkoviny. Nesnáze je

v tom, že existence BP radikálu je opodstatněná za přítomnosti autooxydabilních látek, že pokusný materiál pochází z poměrně jednoduchých, snadno kontrolovatelných soustav, kdežto v tkáních, kde probíhá vazba benzpyrenu na bílkoviny, je existence volných kyslíkových radikálů problematická.

V našich laboratořích jsme se poněkud přiblížili řešení otázky o možném výskytu volných kyslíkových radikálů při respiračním pochodu. Zjistili jsme, že dávno známá sloučenina, 7-jod-8-oxychinolin-5-sulfonová kyselina, známá pod názvem *ferron* nebo *yatren*, má význačné katalytické vlastnosti. Katalyzuje autooxydaci askorbátu a rozklad peroxydu vodíku. Rozsáhlé pokusy, o nichž nelze v podrobnostech v rámci této přednášky referovat, vedly k závěru, že katalytický účinek ferronu spočívá v tvorbě volného radikálu z fenolátového aniontu ferronové molekuly. Radikál vzniká oxydací kyslíkovými radikály, pravděpodobně radikálem O_2H [25]. Studie o vlivu ferronu na cytochromovou soustavu pak ukázaly, že ferron podobným způsobem aktivuje oxydaci cytochromu s cytochromoxydásou [26]. Cytochromoxydása je tím enzymem, který během respiračního pochodu redukuje kyslík na vodu. Jak známo, je hemoproteidem se železem v prostetické skupině. Sama cytochromoxydása je v průběhu respiračního pochodu redukována soupravou cytochromů, které jsou rovněž hemoproteidy. Při reakci prostetické skupiny cytochromoxydásy se mění valence železa z ferro na ferri, což znamená, že kyslík přijme jeden elektron. Je těžko představitelné, že by v jedné simultánní reakci molekula kyslíku O_2 přijala 4 elektrony nezbytné ke vzniku vody $2H_2O$. Pravděpodobnější je, že kyslík přijímá elektrony, poskytované cytochromovou soustavou, postupně, jak je obvyklé u jiných oxydoredukčních soustav. Z toho vyplývá, že v průběhu redukce kyslíku dochází k tvorbě nestálých aniontů kyslíku, které se ihned slučují s protony, přítomnými v roztoku, v příslušné konjugované kyseliny:

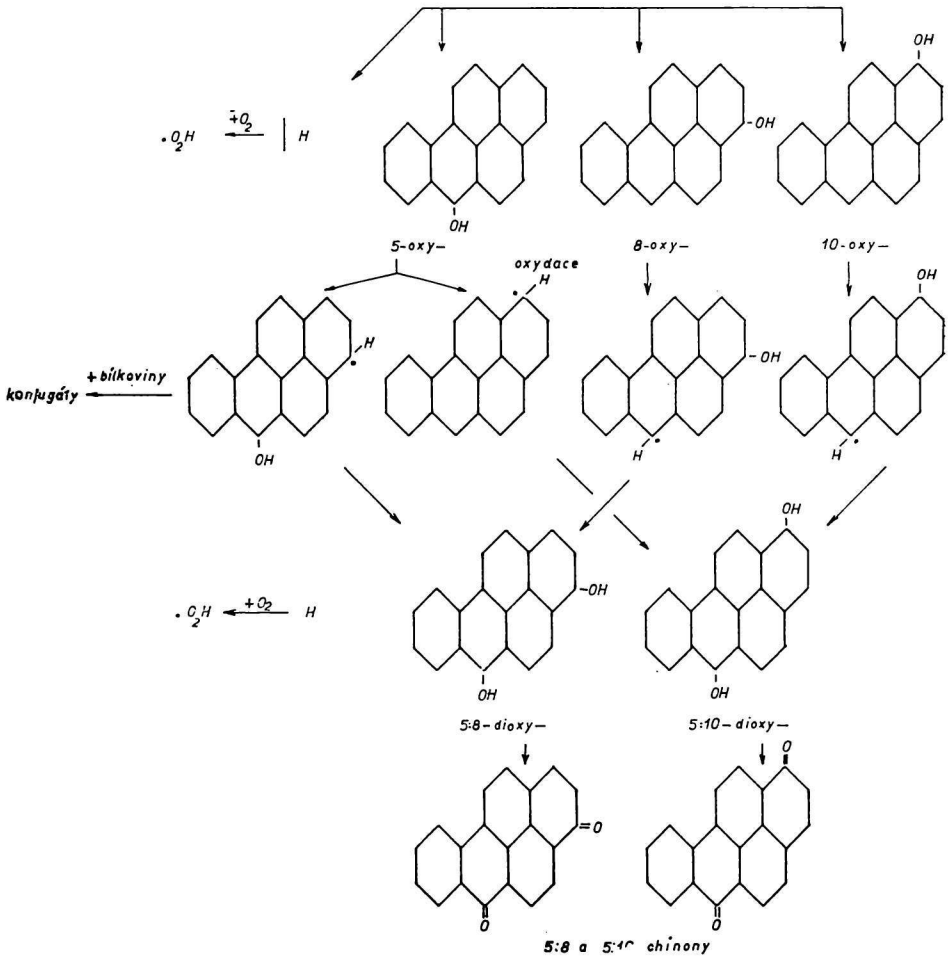
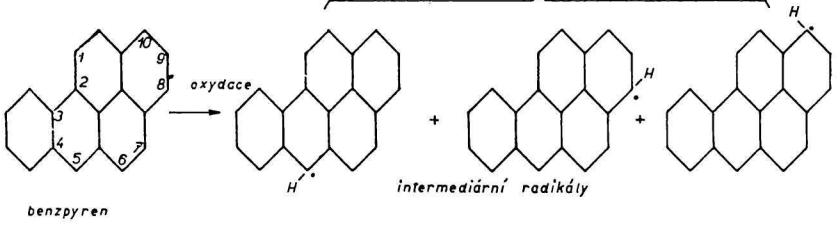


Teoreticky je tedy podložen názor, že cytochromoxydása může být za jistých podmínek generátorem kyslíkových radikálů O_2H a OH . Za normálních podmínek jsou kyslíkové radikály nepochybně redukovány postačující rychlostí cytochromovou soustavou samou. Podmínky a priori nutné k udržení radikálu jsou buď velmi pomalá redukce cytochromoxydásy cytochromovou soustavou, nebo přítomnost sloučenin, které jsou schopny vytvořit oxydaci intermediárně vznikajícími kyslíkovými radikály vlastní radikálovou formu a tak přenést oxydační řetěz z povrchu cytochromoxydásy do roztoku.

Náš příspěvek o způsobu postupné redukce kyslíku cytochromoxydásou je zčásti hypotetické povahy a bez dalšího experimentálního podložení nelze odhadnout, do jaké míry se tento pochod uplatňuje in vivo. Pro metabolismus

(BPX, BPF₁ ?)

nízkomolekulární konjugáty
↑
hydrolyza
vysokomolekulární konjugáty
+ bílkoviny



karcinogenních uhlovodíků se tím otvírá nová cesta studia podmínek jejich oxydace in vivo a pokusy v tom směru jsou u nás rozpracovány.

Jako doplněk k této kapitole lze shrnout známý pokusný materiál a jeho interpretaci o metabolismu karcinogenních uhlovodíků na příkladě benzpyrenu ve schematu (na str. 274).

Ze schematu biooxydace benzpyrenu lze snadno odhadnout typy účinku benzpyrenu na metabolismus tkání, kde probíhá jeho přeměna. V prvním stupni oxydace vznikají volné radikály benzpyrenu, které jsou schopny chemické reakce s volnými funkčními skupinami bílkovin. Jediná volnost, kterou si zde autor dovolil, je předpoklad, že radikály jsou dostatečně stálé, aby měly čas k reakci, než zaniknou jiným způsobem. Pokusy Millerové [20] a jiných dokazují, že k reakci s bílkovinami dochází v míře dobře prokazatelné. Mimo chinony není v oxydační řadě metabolitů jiných derivátů, které by byly schopny bezprostřední reakce s bílkovinami a enzymy, než radikály benzpyrenu a monohydroxybenzpyrenu.

Jiná část radikálů je převedena v monofenoly. Přitom vzniká atomový vodík (viz výše), poskytující známou reakci s molekulárním kyslíkem radikál O_2H . V této souvislosti je třeba zmínky o tom, že biologické reakce karcinogenních látek se velmi podobají účinku ionisujícího záření, takže se v literatuře užívá pojmu „radiomimetický účinek“ pro biologické vlivy karcinogenů [3]. Jak známo, část účinku ionisujícího záření spočívá v tvorbě kyslíkových volných radikálů. Zde v případě benzpyrenu se zdá být tato souvislost pochopitelná, protože tvorba radikálu O_2H je vedlejší reakcí při převodu radikálu benzpyrenu v jiné sloučeniny.

Ve smyslu definice oxydačního pochodu jsou pro úplnost uvedeny též radikály, vyskytující se při oxydaci monohydroxybenzpyrenů v dihydroxyderiváty. Protože dosud nemáme experimentálních měřítek pro stálost těch či oněch, jsou uvedeny jako mezistupně oxydace, rovněž schopné konjugace s bílkovinami a s enzymy.

Chinony vznikají oxydačí dihydroxyderivátů již vzdušným kyslíkem. V živé tkáni zůstávají pravděpodobně v redukované formě a střídáním oxydované a redukované formy budou účinné jako oxydoredukční přenašeče. Protože není znám redoxpotenciál této hydrochinoidní soustavy, nelze zatím odhadnout, na které soustavy dehydrogenás se předpokládaný účinek může vztahovat.

V této přednášce jsem se pokusil o souhrn dnešních znalostí o metabolismu karcinogenních uhlovodíků spíše přehledně a se zřetelem ke směru jejich dalšího výzkumu po stránce biochemické, než úplně. V četných případech nebylo možno podat veškeré experimentálně podložené důvody, které vedly k závěrům zde podaným. Ze souhrnu vyplývá, že alespoň jedna cesta metabolismu benzpyrenu se dá sledovat až do stadia chinonů. Většina stálých mezuproduktů oxydace byla identifikována srovnáním se syntetickými sloučeninami.

Je velkým pokrokem že otázku o působení benzpyrenu na metabolismus tkání a na biologické funkce tkání můžeme dnes řešit způsobem výběru jednotlivých definovaných reakcí, které mohou způsobit metabolity tohoto uhlovodíku.

V období latence mezi aplikací benzpyrenu a vznikem nádoru probíhá v postižené tkáni sled změn, jehož zákonitosti dosud neznáme. Bylo by zbytečné, aby tato přednáška obsahovala domněnky o mechanismu, kterým vzniká po týdnech latence nádor na místě, kde byl aplikován benzpyren. Vše, co bylo možno o karcinogeneze spekulativně odhadnout z experimentálního, dnes dostupného materiálu, bylo řečeno na mnoha jiných místech v pojmech, jež nutně zůstaly všeobecné, jako na př.: deviace proteinosynthesy, porucha chromosomů, posun v rovnováze enzymových soustav a pod. Význam výzkumu karcinogenních uhlovodíků vidím v tom, že jsou již dány podklady pro to, aby všeobecné otázky byly řešeny konkrétně. Je snadnější připravit obdobné konjugáty s bílkovinami jako ty, které byly izolovány, a studovat vlastnosti bílkovin takto změněných, než pátrat po odchylkách, jejichž povahu nelze napřed odhadnout. Výzkum karcinogenních uhlovodíků je indikován nejen s hlediska metodologického. Benzpyren je zcela obecně rozšířeným vnějším karcinogenem, je obsažen v ovzduší, které dýcháme, i v potravě, kterou požíváme. Proto problém benzpyrenové karcinogenesy není omezen pouze na skupiny povolání přicházející do styku se sazí a dehtem [34], ale týká se veškerého obyvatelstva. Prof. Šula první prokázal chemickou cestou, že benzpyren je deponován v lidském organismu; isoloval jej z anthrakotických plicních uzlin a identifikoval po chromatografickém dělení nezmýdelnitelného podílu fluorescenční spektrografii. Nevíme sice, která reakce benzpyrenu je prvním článkem ve sledu biochemicky prokazatelných reakcí, které nakonec vedou ke vzniku nádoru, ale lze soudit, že je to jedna z těch, o nichž jsme diskutovali. Až nám bude známa, bude možno uvažovat o prevenci maligního růstu, zahájeného aplikací benzpyrenu.

LITERATURA

1. Berenblum J. et al., *Cancer Res.* 3, 151 (1943).
2. Berenblum J., Schoental R., *Cancer Res.* 6, 699 (1946).
3. Boyland E., *Cancer Res.* 12, 77 (1952).
4. Boyland E., Levi A., *Biochem. J.* 29, 2679 (1935).
5. Boyland E., Wiltshire G. H., *Biochem. J.* 51, Proc. XXX (1952).
6. Boyland E., Wolf G., *Biochem. J.* 47, 64 (1950).
7. Calcutt G., *Brit. J. Cancer* 4, 254 (1950).
8. Cameron G. et al., *Cancer Res.* 3, 281 (1943).
9. Cook J. W., *J. chem. Soc.* 1950, 1210.
10. Cook J. W., Haslewood D., *J. chem. Soc.* 1934, 248.
11. Cook J. W., Hewett C. L., Hieger J., *J. chem. Soc.* 1933, 395.
12. Cook J. W., Ludvíczak R. S., Schoental R., *J. chem. Soc.* 1950, 1112.
13. Dauben W. G., Mabec D., *Cancer Res.* 11, 216 (1951).
14. Daudel R., *Rev. Sci.* 84, 37 (1946).
15. Heidelberger C., Weiss S. M., *Cancer Res.* 11, 885 (1951).
16. Hieger S., *Brit. J. Cancer* 3, 123 (1949).
17. Michaelis L., *Chem. Rev.* 16, 243 (1935).
18. Michaelis L., Schubert M. P., *Chem. Rev.* 22, 437 (1937).
19. Michaelis L., Schubert M. P., Granick S., *J. am. chem. Soc.* 61, 1981 (1939).
20. Miller E. C., *Cancer Res.* 11, 100 (1951).
21. Miller E. C., Miller J. A., *Cancer Res.* 12, 542 (1952).
22. Mueller G. C., Miller J. A., *Cancer Res.* 5, 401 (1945).
23. Neubauer O., *Brit. J. Cancer* 1, 192 (1947).
24. Pihar O., *Čs. Onkologie* 1, 97 (1954).
25. Pihar O., *Chem. Listy* (1955) v tisku.
26. Pihar O., Čihař M., *Chem. Listy* (1955) v tisku.
27. Pihar O., Krawczynski J., *Chem. Listy* 47, 259 (1952).
28. Potter V. J., *Advances in Enzymol.* 6, 248 (1946).
29. Pullman A., Pullman B., *Rev. Sci.* 84 145 (1946).
30. Rondoni P., *Pontifica Acad. Sci. Acta* 2, 1 (1948).
31. Rondoni P., *Ricerca Sci.* 20, 671 (1948, 1950).
32. Stein G., Weiss J., *J. chem. Soc.* 1951, 3265.
33. Swalov A. J., *J. chem. Soc.* 1952, 1334.
34. Šula J., *Čas. lék. českých* 88, 706 (1949).
35. Šula J., *Čas. lék. českých* 91, 1029 (1952).
36. Udenfriend et al., *Federat. Proc.* 11, 300 (1952).
37. Vollmann H. et al., *Ann.* 331, 1 (1937).
38. Weigert F., Mottram M. B., *Cancer Res.* 6, 97, 109 (1946).
39. Weil—Malherbe H., *Biochem. J.* 40, 351 (1946).
40. Weissburger J. H. et al., *Cancer Res.* 12, 305 (1952).
41. Wieland C., Dane E., *Z. physiol. Chem.* 219, 240 (1933).
42. Yamagiva K., Ichikawa K., *Tokyo Igakkai Zassi* 15, 295 (1915); *J. Cancer Res.* 3, 1 (1918).
43. Young L., *Biochem. J.* 41, 417 (1947).