

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

**Vztah mezi strukturou a aktivitou při hodnocení karcinogenity
nitrosaminů kontaminujících farmakologicky účinné látky**

Bakalářská práce

2023

Tereza Nechvílová

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Tereza Nechvílová**
Osobní číslo: **C20033**
Studijní program: **B0531A130012 Farmakochemie a medicínální materiály**
Téma práce: **Vztah mezi strukturou a aktivitou při hodnocení karcinogenity nitrosaminů kontaminujících farmakologicky účinné látky**
Téma práce anglicky: **Structure-activity relationship (SAR) in the carcinogenicity assessment of nitrosamines contaminating active pharmacological substances (APIs)**
Zadávací katedra: **Ústav organické chemie a technologie**

Zásady pro vypracování

1. Popište odborná východiska na základě, kterých jednotlivé regulační agentury (EMA, EFSA apod.) stanovily expoziční limity pro N-nitrosaminy. Zhodnoťte, jak tyto agentury zohlednily problematiku vztahu mezi strukturou a aktivitou vybraných skupin nitrosaminů.
2. Shrňte dosavadní poznatky o vztahu mezi strukturou a aktivitou N-nitrosaminů, zaměřte se zejména na strukturní prvky, které výrazně zvyšují či naopak redukuje riziko karcinogenního účinku daného N-nitrosaminu a vysvětlete mechanismus jejich působení.
3. U konkrétních zástupců N-nitrosaminů, jejichž přítomnost byla zjištěna ve farmakologicky účinných látkách, se s využitím získaných poznatků o vztahu mezi strukturou a aktivitou pokuste vyhodnotit potenciál karcinogenního účinku a diskutujte přiměřenost příslušného expozičního limitu.
4. Výsledky zpracujte formou závěrečné práce v souladu se Směrnicí UPCE č. 7/2019 "Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací" v platném znění.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **prof. Ing. Miloslav Pouzar, Ph.D.**
Ústav environmentálního a chemického inženýrství

Datum zadání bakalářské práce: **28. února 2023**
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. června 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

prof. Ing. Miloš Sedlák, DrSc. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem: Vztah mezi strukturou a aktivitou při hodnocení karcinogenity nitrosaminů kontaminujících farmakologicky účinné látky jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne

Tereza Nechvílová

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce prof. Ing. Miloslavu Pouzarovi, Ph.D. za odborné vedení a za cenné rady, které mi pomohly při zpracování této práce. Děkuji také mé rodině a nejbližším za jejich podporu v průběhu studia.

ANOTACE

Tato bakalářská práce se zaměřuje na vztah mezi strukturou a aktivitou N-nitrosaminů, které byly nalezeny ve farmakologicky účinných látkách v rámci procesů kontroly kvality a bezpečnosti léčiv. Následující část práce přináší komplexní přehled o vztahu mezi strukturou a aktivitou N-nitrosaminů. Jsou identifikovány konkrétní strukturní prvky, které výrazně ovlivňují genotoxický potenciál daného N-nitrosaminu a je diskutován mechanismus jejich působení. V praktické části práce jsou vybráni zástupci N-nitrosaminů, jejichž přítomnost byla zjištěna ve farmakologicky účinných látkách. S využitím získaných poznatků o vztahu mezi strukturou a aktivitou těchto látek je provedeno vyhodnocení jejich akceptovatelného denního příjmu.

KLÍČOVÁ SLOVA

N-nitrosaminy, farmakologicky účinné látky, expoziční limity, struktura, Amesův test, karcinogenní potenciál, regulační agentury, mechanismus působení

ANGLICKÝ NÁZEV

Structure-activity relationship (SAR) in the carcinogenicity assessment of nitrosamines contaminating active pharmacological substances (APIs).

ANNOTATION

This bachelor thesis focuses on the relationship between the structure and activity of N-nitrosamines, which have been found in pharmacologically active substances during the processes of quality and safety control of drugs. The following section provides an overview of the relationship between the structure and activity of N-nitrosamines. Specific structural elements are identified that significantly influence the genotoxic potential of a given N-nitrosamine and the mechanism of their action is discussed. In the practical part of the thesis were selected examples of N-nitrosamines, whose presence has been detected in pharmacologically active substances. Using the knowledge gained about the relationship between the structure and activity of these substances, calculation of their acceptable daily intake in was realized.

KEYWORDS

N-nitrosamines, pharmacologically active substances, exposure limits, structure, Ames test, carcinogenic potential, regulatory agencies, mechanism of action

Obsah

SEZNAM OBRÁZKŮ	8
SEZNAM TABULEK	9
SEZNAM ZKRATEK	10
ÚVOD	11
1. KLASIFIKACE N-NITROSAMINŮ	12
2. HODNOCENÍ ÚČINKŮ NITROSAMINŮ NA ČLOVĚKA	15
3. VLIV VYBRANÝCH FUNKČNÍCH SKUPIN NA MUTAGENITU N-NITROSAMINŮ	18
3.1 SKUPINY TEORETICKY ZVYŠUJÍCÍ MUTAGENNÍ ÚČINKY N-NITROSAMINŮ	19
3.1.1 <i>Skupina methylová a ethylová</i>	19
3.1.2 <i>Heterocyklické N-nitrosaminy</i>	22
3.1.3 <i>Allylová a propargylová skupina</i>	23
3.1.4 <i>Sloučeniny se skupinou slabě přitahující elektrony v β-poloze</i>	24
3.2 SKUPINY TEORETICKY SNIŽUJÍCÍ MUTAGENNÍ ÚČINKY N-NITROSAMINŮ	25
3.2.1 <i>Stericky bránící skupiny (isopropylová, tercbutylová a aromatická)</i>	25
3.2.2 <i>Sloučeniny s karboxylovou kyselinou</i>	26
3.2.3 <i>Sloučeniny se skupinou silně přitahující elektrony v β-poloze</i>	26
4. HODNOCENÍ AKCEPTOVATELNÉHO DENNÍHO PŘÍJMU NITROSAMINŮ V LÉČIVECH	27
4.1 POSTUP VÝPOČTU AKCEPTOVATELNÉHO DENNÍHO PŘÍJMU PRO VYBRANÉ DERIVÁTY N-NITROSOPIPERIDINU	27
4.2 VLIV STRUKTURNÍCH VARIACÍ PIPERIDINOVÝCH NITROSAMINŮ NA HODNOTY AI	30
4.2 ODHAD AKCEPTOVATELNÉHO DENNÍHO PŘÍJMU PRO VYBRANÉ DERIVÁTY N-NITROSOPIPERIDINU	32
4.2.1 <i>N-nitrosopiperidin</i>	32
4.2.2 <i>Nitrosopiperidinol</i>	37
4.2.3 <i>2-methyl-1-nitrosopiperidin</i>	40
4.3 SOUHRN	44
ZÁVĚR	46
SEZNAM LITERATURY:	48

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Obecná struktura <i>N</i> -nitrosaminu.....	11
Obrázek 2: Karcinogeny kategorie 1: (a) 4-(methylnitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanon.....	12
Obrázek 3: Karcinogeny kategorie 2A: (a) <i>N</i> -nitrosodimethylamin (b) <i>N</i> -nitrosodiethylamin	13
Obrázek 4: Karcinogeny kategorie 2B: (a) <i>N</i> -nitrososarkosin (b) <i>N</i> -nitrosomethylethylamin	13
Obrázek 5: Karcinogeny kategorie 3: (a) <i>N</i> -nitrosodifenylamin (b) <i>N</i> -nitrosoprolin.....	14
Obrázek 6: Grafické srovnání výsledků Amesova testu a karcinogenity.....	17
Obrázek 8: <i>N</i> -nitrosaminy s krátkým uhlíkovým řetězcem (a) NDMA (b) NDEA (c) NMEA...	19
Obrázek 7: α -hydroxylace <i>N</i> -nitrosodimethylnitrosaminu.....	20
Obrázek 9: Metabolismus NDMA	20
Obrázek 10: Methylace guaninu reakcí s diazoniovým iontem.....	21
Obrázek 11: alkylované adukty guaninu (a) <i>N</i> ⁷ -alkyl-Gua (b) <i>O</i> ⁶ -alkyl-Gua.....	22
Obrázek 12: Heterocyklické <i>N</i> -nitrosaminy (a) NNN (b) NNK.....	22
Obrázek 13: Speciální systémy násobných vazeb: (a) benzylová skupina (b) allylová skupina	24
Obrázek 14: NOPPA	24
Obrázek 15: Bioaktivace NOPPA.....	25
Obrázek 16: Stericky bránící skupiny (a) isopropylová sk. (b) tercbutylová sk.....	26
Obrázek 17: <i>N</i> -nitrosopiperidin	32
Obrázek 18: 1-nitrosopiperidin-4-ol	37
Obrázek 19: 2-methyl-1-nitrosopiperidin.....	40

SEZNAM TABULEK

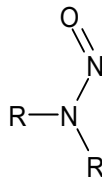
Tabulka 1: Přehled výsledných odhadů AI pro 13 strukturních skupin N-nitrosaminů dle Dobo K. L. a kol., 2022.....	29
Tabulka 2: Fyzikálně chemické parametry N-nitrosopiperidinu.....	32
Tabulka 3: Souhrn údajů pro NPIP z databáze LCDB.....	33
Tabulka 4: Klíčové informace o Nitrosopiperidinu z LCDB – studie provedená na potkanovi – 1. studie.....	35
Tabulka 5: Klíčové informace o Nitrosopiperidinu z LCDB – studie provedená na potkanovi – 2. studie.....	35
Tabulka 6: Fyzikálně chemické parametry 1-nitrosopiperidin-4-olu.....	37
Tabulka 7: Přehled hodnot TD ₅₀ pro strukturní analogy N-nitrosopiperidinu dle Dobo K. L. a kol., 2022.....	38
Tabulka 8: Fyzikálně chemické parametry 2-methyl-1-nitrosopiperidinu.....	40
Tabulka 9: Souhrn údajů pro R a S izomer 2-Methylnitrosopiperidinu z databáze LCDB.....	41
Tabulka 10: Klíčové informace o R a S izomeru 2-Methylnitrosopiperidinu z LCDB.....	42
Tabulka 11: Hodnocení metod použitých pro odhad AI u N-nitrosaminů.....	44
Tabulka 12: Souhrn hodnot AI pro deriváty N-nitrosopiperidinu.....	45

SEZNAM ZKRATEK

AI	akceptovatelný denní příjem látky (Acceptable intake)
API	aktivní farmaceutická látka (Active Pharmaceutical Ingredients)
CPDB	Carcinogenic potency database
CYP 450	Cytochrom P450
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EMA	Evropská léková agentura (European Medicines Agency)
IARC	Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer)
K_{ow}	Rozdělovací koeficient oktanol-voda
LCDB	Lhasa Carcinogenicity Database
NDBA	N-nitrosodi-n-butylamin
NDEA	N-nitrosodiethylamin
NDMA	N-nitrosodimethylamin
NDPhA	N-nitrosodifenylamin
NMEA	N-nitrosomethylethylamin
NMOR	N-nitrosomorfolin
NNAL	4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol
NNK	4-(N-nitrosomethylamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
NNN	Nitrosonornikotin
NOPPA	N-(2-Oxopropyl)-N-nitrosopropylamin
NPIP	N-nitrosopiperidin
NPRO	N-nitrosoprolin
NPYR	N-nitrosopyrrolidin
NSAR	N-nitrososarkosin
PHB	pyridylhydroxybutyl
POB	pyridyloxobutyl
QSAR	Kvantitativní vztah mezi strukturou a aktivitou (Quantitative structure–activity relationship)
SAR	vztah mezi strukturou a aktivitou (structure–activity relationship)
SMILES	stručný vzorec chemických vzorců (Simplified Molecular Input Line Entry Specification)
TD50	denní dávka vyvolávající toxické účinky u 50 % zvířat v průběhu celoživotního užívání

Úvod

N – nitrosaminy jsou organické sloučeniny, které obsahují strukturální jednotku N–N=O. Jedná se o reakční produkty dusitanů s aminy, vznikající za vysokých teplot.



Obrázek 1: Obecná struktura N-nitrosaminu

Existuje teoretický předpoklad, že existuje vztah mezi strukturou a aktivitou N-nitrosaminů. Daná struktura může ovlivňovat různé metabolické děje, které vedou buď ke vzniku velmi toxických reaktivních metabolitů, nebo produktů, které naopak nepředstavují pro organismus výraznější riziko. Reaktivní metabolity, které vznikají při metabolických přeměnách N-nitrosaminů katalyzovaných enzymy ze skupiny cytochrom P450 (CYP 450) [1], se mohou vázat na dusíkaté báze DNA. Některé N-nitrosaminy lze tedy zařadit mezi potenciálně mutagenní látky.

S N-nitrosaminy se setkáváme v běžném životě poměrně často. Mohou se vyskytovat v průmyslově zpracovaných potravinách a nápojích, cigaretovém kouři a podzemní i pitné vodě [2]. V posledních letech však zaznamenáváme problém s N-nitrosaminy i ve farmaceutickém průmyslu.

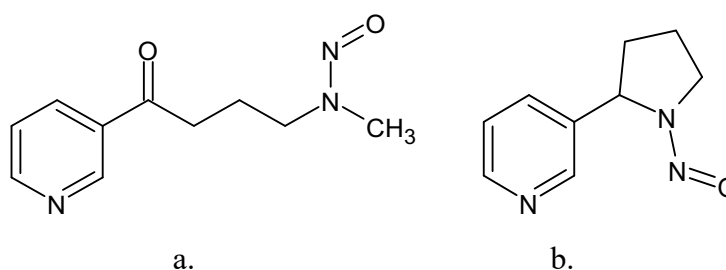
V červenci roku 2018 byl zveřejněn nález zdravotně rizikových koncentrací N-nitrosodimethylaminu (NDMA) v léčivech obsahujících jako účinnou látku antagonistu angiotensinu II valsartan [3]. Tato léčiva se používají zejména k léčbě hypertenze a srdečního selhání.

K nejvýznamnější příčinám kontaminace léčiv N-nitrosaminy patří jejich skladování za nevhodných podmínek, znečištěné či špatně zvolené výchozí produkty či chybně nastavený technologický proces. Výskyt NDMA v léku valsartan způsobily změny ve výrobním procesu tohoto léku. Poprvé byl NDMA nalezen v šaržích, které pocházely z výroby čínské společnosti Zhejiang Huahai Pharmaceutical. V následujících týdnech byla zjištěna přítomnost NDMA v šaržích od jiných výrobců (Zhejiang Tianyu Pharmaceutical nebo také Hetero Labs, Indie) [4]. Dále byla přítomnost N-nitrosaminů zjištěna v lécích obsahujících jiné farmaceuticky účinné látky (API), jako například metformin, ranitidin, nizatidin a další [5–7].

1. Klasifikace N-nitrosaminů

Tato kapitola bude zaměřena na klasifikaci N-nitrosaminů provedenou Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (IARC – International Agency for Research on Cancer). IARC je významnou autoritou v oblasti hodnocení karcinogenního potenciálu různých látek a jejich klasifikace do kategorií poskytuje důležité informace o zdravotních rizicích. V rámci této kapitoly budou představena kritéria, která IARC používá při klasifikaci N-nitrosaminů, a budou diskutovány různé skupiny těchto látek a jejich zařazení do jednotlivých kategorií karcinogenity.

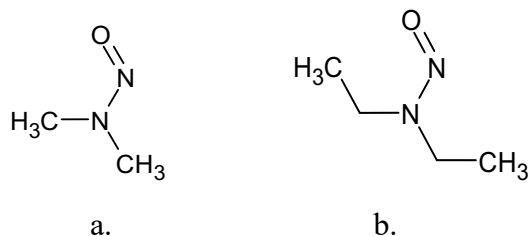
Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny označila sloučeniny NNK (4-(methylnitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanon) i NNN (Nitrosornikotin) za prokázané lidské karcinogeny, jsou tedy zařazeny do kategorie 1 [8]. Jedná se o jediné dva zástupce N-nitrosaminů, které byly zařazeny do této kategorie. Do této skupiny látek se řadí takové, pro něž vedle pozitivních výsledků z *in vivo* testů karcinogenity na zvířatech existuje i dostatek epidemiologických dat prokazujících zvýšený výskyt nádorů v exponovaných lidských populacích.



Obrázek 2: Karcinogeny kategorie 1: (a) 4-(methylnitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanon
(b) Nitrosornikotin

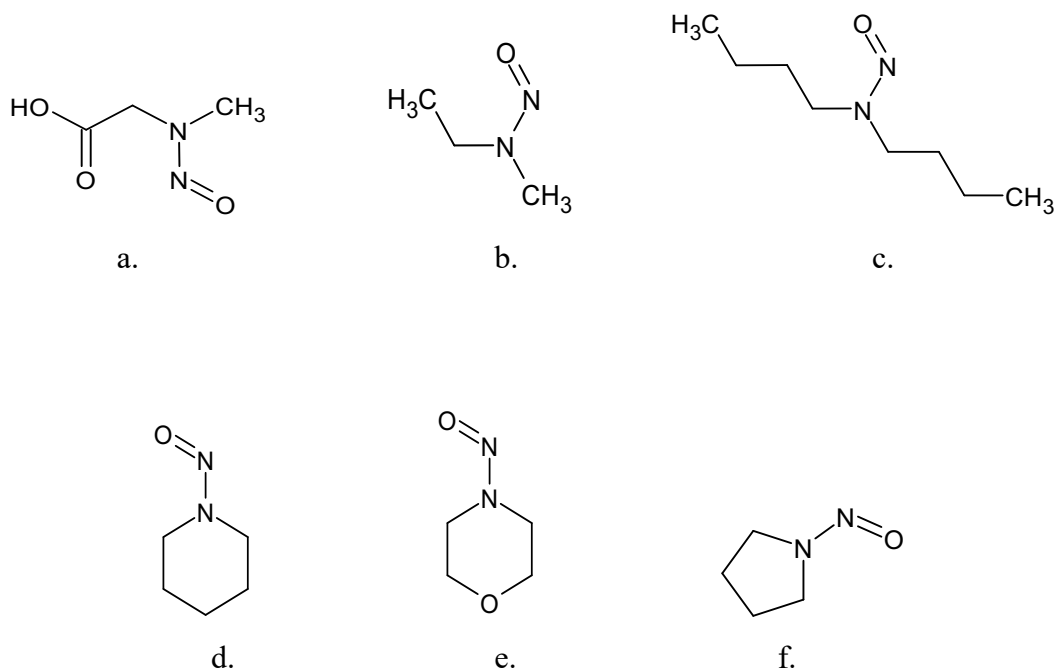
IARC klasifikovala NDMA jako látku, která je pro člověka pravděpodobně karcinogenní, tedy do kategorie 2A [8]. Do kategorie 2A se zařazují látky nebo směsi, pokud existují jen omezené důkazy o jejich karcinogenitě pro lidi, ale zároveň jsou k dispozici dostatečně přesvědčivé údaje o jejich karcinogenitě pro laboratorní zvířata. Látka (či směs) může být někdy zařazena do této kategorie také pokud neexistují adekvátní důkazy o její karcinogenitě pro lidi, ale existují dostatečné důkazy o její karcinogenitě pro laboratorní zvířata a dále silné důkazy, že karcinogeneze je zprostředkována u lidí i zvířat podobným

biochemickým mechanismem. Výjimečně může být látka, směs nebo okolnost expozice zařazena do této kategorie pouze na základě omezených důkazů o její karcinogenitě pro lidi. Mezi látky v kategorii 2A se řadí také N-nitrosodiethylamin (NDEA) [8].



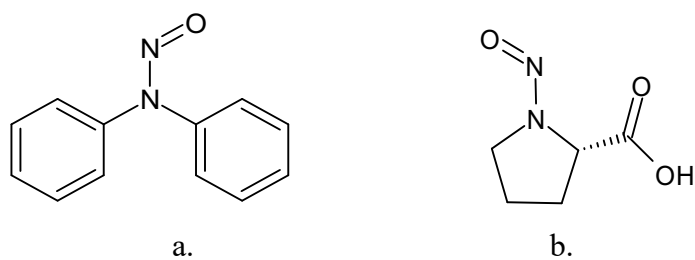
Obrázek 3: Karcinogeny kategorie 2A: (a) N-nitrosodimethylamin (b) N-nitrosodiethylamin

Kategorie 2B zahrnuje ty sloučeniny, u kterých existují určité důkazy, že mohou způsobit rakovinu u lidí, ale závěry jednotlivých epidemiologických studií jsou nejednoznačné či rozporuplné. Jedná se o možné lidské karcinogeny. Do této kategorie agentura IARC zařadila N-nitrososarkosin (NSAR) [8], N-nitrosomethylethylamin (NMEA), N-nitrosodi-n-butylamin (NDBA), N-nitrosopiperidin (NPIP), N-nitrosomorfolin (NMOR), N-nitrosopyrrolidin (NPYR) [8],



Obrázek 4: Karcinogeny kategorie 2B: (a) N-nitrososarkosin (b) N-nitrosomethylethylamin (c) N-nitrosodi-n-butylamin (d) N-nitrosopiperidin (e) N-nitrosomorfolin (f) N-nitrosopyrrolidin

N-nitrosodifenylamin (NDPhA) je vysoce lipofilní sloučenina, která neobsahuje alfa vodík. Agenturou IARC je zařazena do kategorie 3 spolu s N-nitrosoprolinem NPRO [8]. Do této kategorie se řadí látky, které nelze klasifikovat z hlediska karcinogenity pro člověka, protože důkazy o karcinogenitě u lidí jsou nedostatečné a u zvířat omezené či nedostatečné.



Obrázek 5: Karcinogeny kategorie 3: (a) N-nitrosodifenylamin (b) N-nitrosoprolin

2. Hodnocení účinků nitrosaminů na člověka

Pro hodnocení mutagenity látek můžeme využít celé řady *in vitro* i *in vivo* testů. V případě N-nitrosaminů se velmi osvědčily bakteriální testy reverzních mutací, jako je např. Amesův test [9].

Přehledová práce *Threser, A. a kol., 2020* se zabývá možností predikovat (tedy předpovědět) karcinogenitu N-nitrosaminů v případě, že nemáme k dispozici výsledky vhodného *in vivo* testu karcinogenity na hlodavcích. Autoři došli k závěru, že díky významné korelaci mezi výsledky reverzních testů mutagenity na bakteriích (Amesův test) a *in vivo* testů karcinogenity na hlodavcích je možné případnou karcinogenitu predikovat právě s využitím Amesova testu. Tento výsledek rozhodně neumožňuje kategorizaci, ale je vhodný pro prioritizaci – tedy pro výběr látek, u nichž je potřeba přednostně provést drahý *in vivo* test, případně se na ně výrazněji soustředit v rámci regulačního procesu (nastavení limitů, kontrola apod.).

Amesův test patří do skupiny bakteriálních testů reverzních mutací. Tyto testy jsou založeny na sledování frekvence zpětných mutací záměrně pozměněných genů, které kódují proteiny účastníci se syntézy nějaké esenciální aminokyseliny. Auxotrofní kmen bakterie použité v testu si tuto aminokyselinu neumí sám syntetizovat a musí přežívat na živné půdě, která určité množství dané aminokyseliny obsahuje. Pokud testovaná látka vyvolá v genomu bakterie změnu, která zvrátí účinek původní mutace, začne si daná bakterie klíčovou aminokyselinu sama syntetizovat. Rozvoj kolonií původně auxotrofních bakterií na živné půdě, v níž byla zásoba příslušné esenciální aminokyseliny vyčerpána, signalizuje vznik reverzní mutace a vede k předpokladu o mutagenitě testované látky.

Test využívá druhu *Salmonella typhimurium* a *Esherichia coli*. Příslušné kmeny těchto bakterií jsou speciálně upravené pro tento test, a to tak, že jsou nositelé bodové mutace, které posouvají čtecí rámeček. Různé kmeny těchto bakterií se liší právě v místě bodové mutace. Jsou označeny kódy, které odpovídají umístění příslušné bodové mutace v histidinovém operonu (*S. typhimurium*) či v genu pro protein *uvrA* (*E. coli*). U *S. typhimurium* to jsou TA98; TA100; TA1535; TA97; TA1537; TA102 atd. a u *E. Coli* se nejčastěji používají WP2 *uvrA*; WP2 *uvrA* pKM101.

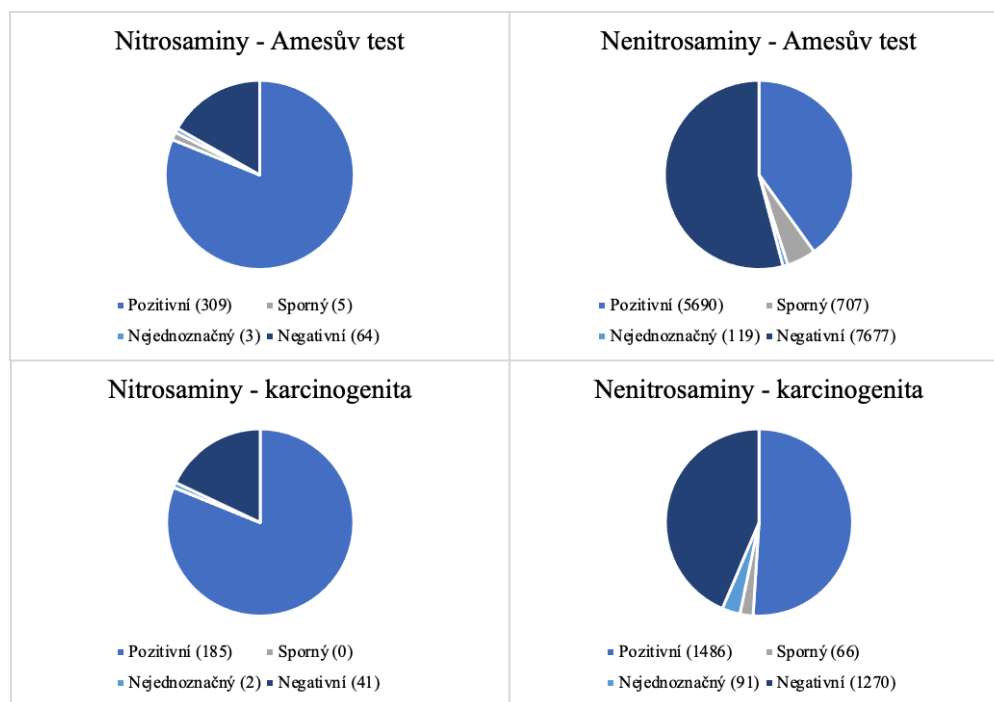
Salmonella typhimurium používaná v Amesově testu nese bodovou mutaci v oblasti zvané histidinový operon, což je klastr 9 genů kódujících enzymy zodpovědné za tvorbu histidinu, jejichž exprese je zpětnovazebně řízena hladinou histidinu v intracelulárním prostoru. Mutace některého z genů v daném operonu vede k neschopnosti buňky tvořit histidin a přežít v prostředí, z něhož nelze histidin čerpat. V případě *E. coli* jde o mutaci genu pro protein *uvrA*, který je klíčový pro opravy zlomů v DNA způsobených UV zářením.

V bakteriálním testu reverzní mutace se pozoruje, jak takto upravená bakterie reaguje na hodnocenou látku. Pokud by došlo k odblokování mutace, která způsobuje neschopnost bakterie tvořit si histidin (případně *uvrA*) a bakterie tak znovu získala schopnost klíčové látky si tvořit sama a přežít v prostředí bez jejich vnějšího zdroje (reverzní mutace), považujeme výsledek Amesova testu dané látky za pozitivní.

Databáze toxikologických informací Vitic společnosti Lhasa limited obsahuje záznamy o vlastnostech a toxicitě 479 N-nitrosaminů, v případě 381 z nich jsou zde uvedena data o výsledcích Amesova testu a u 228 z nich výsledky *in vivo* testů karcinogenity na hlodavcích. Oba typy údajů jsou zde obsaženy v případě 178 zástupců N-nitrosaminů.

Při porovnání těchto údajů bylo zjištěno, že nitrosaminy vykazovaly téměř identický podíl pozitivních a negativních odezev v Amesově testu a testech karcinogenity na hlodavcích.

Výsledky Amesova testu a testů karcinogenity na hlodavcích v případě látek, které nepatří do skupiny N-nitrosaminů, korelují mnohem méně (viz obrázek 6). Z uvedených dat je zřejmé že predikci karcinogenity na základě výsledků reverzních testů mutagenity je s dostatečnou mírou spolehlivost možné provádět právě pouze u N-nitrosaminů, u ostatních typů látek by tato predikce byla mnohem méně spolehlivá [9].



Obrázek 6: Grafické srovnání výsledků Amesova testu a karcinogenity

3. Vliv vybraných funkčních skupin na mutagenitu N-nitrosaminů

Structure–Activity Relationship (SAR) je metoda popisující vztah mezi strukturou a aktivitou, která se používá v chemii a farmakologii k predikci aktivity, toxicity a dalších vlastností molekuly na základě její chemické struktury. Studie QSAR posouvají tuto analýzu o krok dále tím, že používají matematické modely ke kvantitativnímu předpovídání aktivity molekuly na základě její chemické struktury.

Studie SAR zahrnují analýzu vztahu mezi chemickou strukturou molekuly a její biologickou nebo farmakologickou aktivitou. Cílem je identifikovat strukturní znaky, které jsou zodpovědné za pozorovanou aktivitu, a použít tyto informace k návrhu účinnějších nebo selektivnějších sloučenin. SAR model využívá molekulárních deskriptorů (například velikost, tvar, polarita a vlastnosti elektronového obalu) k reprezentaci chemické struktury N-nitrosaminů a statistické metody k identifikaci korelací mezi deskriptory a jejich karcinogenitou.

Thomas, R. a kol., 2022 publikoval práci, kde popisuje vývoj a validaci expertně odvozených vztahů mezi strukturou a aktivitou (SAR) pro predikci účinnosti nitrosaminů na základě jejich chemické struktury. Tento model byl odvozen ze znalostí a zkušeností toxikologických expertů, kteří identifikovali specifické strukturální rysy, které jsou spojeny s karcinogenitou nitrosaminů.

Je obecně známo, že průběh metabolických dějů v organismu závisí na struktuře látky. Také v případě N-nitrosaminů tedy musí existovat nějaký vztah mezi jejich strukturou a biologickou aktivitou spojenou s průběhem biotransformace. Výsledky epidemiologických studií nejsou dostatečně komplexní a v současnosti nedokáží jednoznačně zodpovědět otázky ohledně karcinogenity jednotlivých analogů pro člověka. Většina těchto studií se totiž zabývá N-nitrosaminy jako skupinou. Také testy na laboratorních zvířatech jsou omezeny jen na několik konkrétních zástupců, u mnohých však klíčová data chybí.

Predikci ohledně genotoxického potenciálu těchto látek by však teoreticky mohlo být možné učinit na základě dostupných údajů o reaktivitě strukturních jednotek obsažených v molekule N-nitrosaminu. Existují skupiny, které teoreticky zvyšují genotoxický potenciál N-

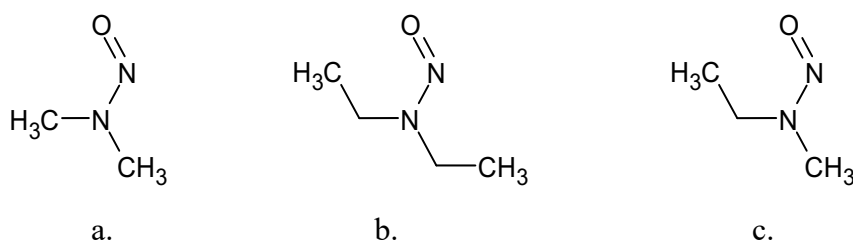
nitrosaminů, a naopak byly popsány i takové strukturní jednotky, které by teoreticky měly genotoxický potenciál ovlivňovat minimálně či ho dokonce snižovat [9].

Popis funkčních skupin může sloužit zejména k odhadu možnosti vzniku reaktivních metabolitů schopných interakce s DNA v průběhu biotransformace neboli metabolické aktivace. Metabolická aktivace je děj, který probíhá v játrech za katalýzy jaterních enzymů, konkrétně cytochromu P450. Produktem enzymaticky katalyzovaných metabolických reakcí jsou elektrofilní molekulové fragmenty, které mají schopnost reagovat s DNA za vzniku aduktů. Pokud tento zásah do nukleové kyseliny není korigován příslušnými opravnými mechanismy, může docházet k expresi poškozených genů a v kritických případech následně k transformaci fyziologicky normálně funkčních buněk na buňky nádorové.

3.1 Skupiny teoreticky zvyšující mutagenní účinky N-nitrosaminů

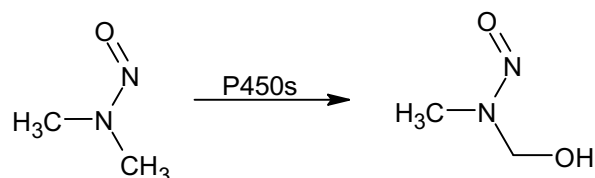
3.1.1 Skupina methylová a ethylová

NDMA, NDEA a NMEA mají společný rys, a to krátký uhlíkový řetězec ve své struktuře. Jedná se o methylový a ethylový zbytek. U obou těchto strukturních rysů dochází k metabolické aktivaci pomocí CYP 2E1 v případě ethylové skupiny také pomocí CYP 2A6 [1].



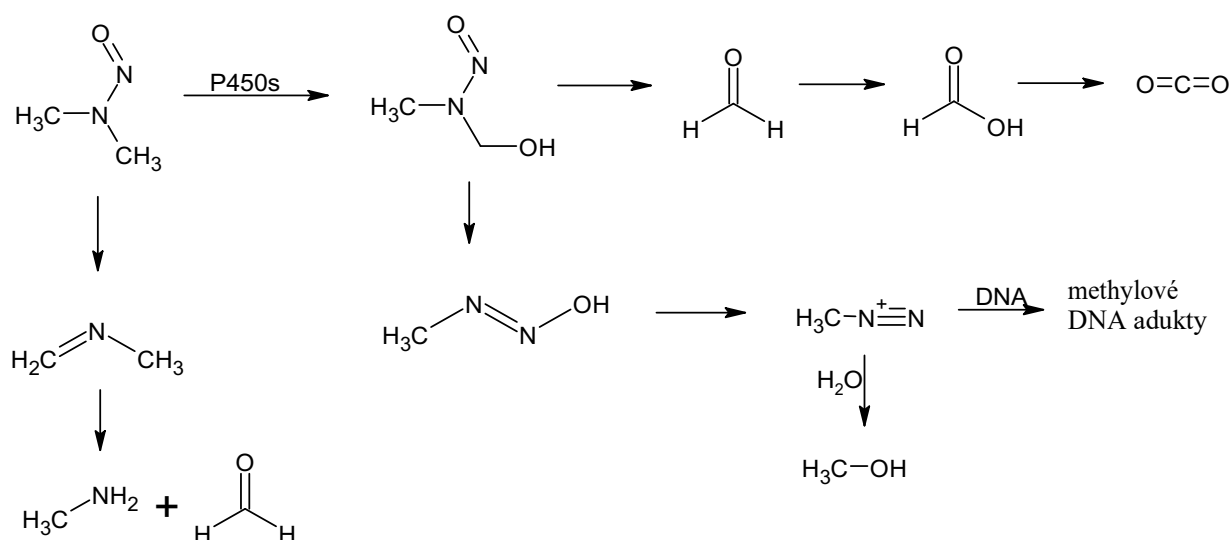
Obrázek 7: N-nitrosaminy s krátkým uhlíkovým řetězcem (a) NDMA (b) NDEA (c) NMEA

V případě N-nitrosaminů, které ve své struktuře obsahují ethylovou či methylovou skupinu je reaktivním místem první uhlík v řetězci, na kterém se vyskytuje kyselý alfa vodík. Sloučenina pak podléhá α -hydroxylaci vedoucí ke vzniku reaktivního metabolitu, a to methyldiazoniového iontu (respektive ethyldiazoniového), který reaguje s DNA za vzniku aduktů.



Obrázek 8: α -hydroxylace *N*-nitrosodimethylnitrosaminu

Oxidace α uhlíku methylové nebo ethylové skupiny neboli α -hydroxylace je klíčovou reakcí, která vede právě ke vzniku reaktivního metabolitu. Vzniká reaktivní metabolit α -hydroxyNDMA, respektive α -hydroxyNDEA [1, 10]. Tyto sloučeniny jsou velmi nestabilní a téměř okamžitě se spontánně rozpadají. α -hydroxyNDMA se rozkládá na formaldehyd a methyldiazoniový iont, který vzniká z nestabilního intermediátu – methyldiazohydroxidu. Formaldehyd se dále oxiduje na kyselinu mravenčí a následně na oxid uhličitý (tuto reakci katalyzuje opět CYP 450) [11]. Methyldiazoniový iont je velice elektrofilní a schopný alkylovat DNA a tím s ní vytvářet adukty [12].



Obrázek 9: *Metabolismus NDMA*

Obdobně probíhá rozklad α -hydroxyNDEA, a to na acetaldehyd a ethyldiazoniový iont, který vzniká z intermediátu ethyldiazohydroxidu. U NDEA dochází mimo jiné i k β -hydroxylaci, která je následovaná α -hydroxylací a vzniká 2-hydroxyethyldiazoniový iont. Tato sloučenina je také schopná reakce s DNA.

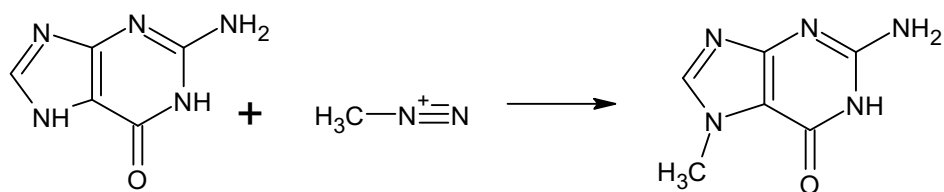
To však platí pouze v případě, kdy *N*-nitrosamin obsahuje na obou postranních řetězcích methylovou nebo ethylovou skupinu. Pokud *N*-nitrosamin má ve své struktuře pouze jednu

z těchto dvou skupin a jako druhý substituent je jiná větší skupina, pak se genotoxický potenciál snižuje [13].

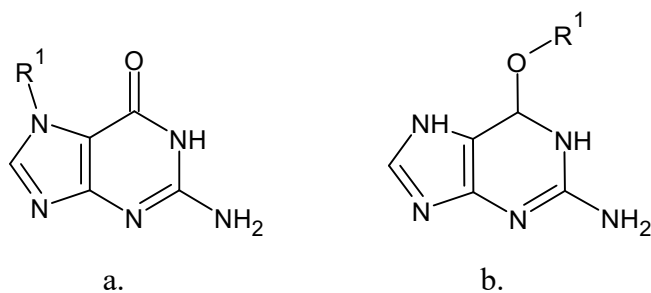
V případě třetího zástupce této skupiny – NMEA probíhají nejčastěji dva typy α -hydroxylace, a to na methylové či ethylové skupině. Pokud reakce probíhá na ethylové skupině, vzniká methyldiazoniový ion a acetaldehyd. Reakce, která probíhá na druhé straně molekuly, tedy na methylové skupině, vede ke vzniku ethyldiazoniového iontu a formaldehydu. Oba tyto diazoniové ionty reagují s DNA a tvoří tak methylové, respektive ethylové adukty DNA [14].

CYP 450 hraje v metabolismu těchto N-nitrosaminů dvojí roli. Může totiž katalyzovat α -hydroxylaci vedoucí ke vzniku reaktivních metabolitů a ke tvorbě DNA aduktů, či katalyzuje reakci nazývanou denitrosace. Tato reakce představuje 15-30 % metabolismu NDMA a předpokládá se, že je to potenciální inaktivující metabolická cesta [15]. Hlavními produkty denitrosace NDMA je methyliminový iont a formaldehyd [2].

Tvorba aduktů s DNA vlivem expozice N-nitrosaminům obsahujícím ve své molekule ethylovou či methylovou skupinu byla prokázána v rámci řady testů na laboratorních zvířatech. Např. ve studii prováděné na laboratorním potkanovi, kterému byly podávány 2 miligramy NDMA denně po dobu 24 dnů, se v játrech nejčastěji objevovaly adukty N⁷-Me-Gua a O⁶-Me-Gua [16]. Zajímavé je, že v případě NMEA vzniká více methylových DNA aduktů než ethylových [17]. Ethylové adukty, které byly nalezeny v jaterních buňkách laboratorních potkanů, byly například N⁷-Et-Gua a O⁶-Et-Gua [18]. Příklady vzorců aduktů DNA je znázorněn na obrázku číslo 11, kdy R¹ představuje buď methylový nebo ethylový zbytek.



Obrázek 10: Metylace guaninu reakcí s diazoniovým iontem

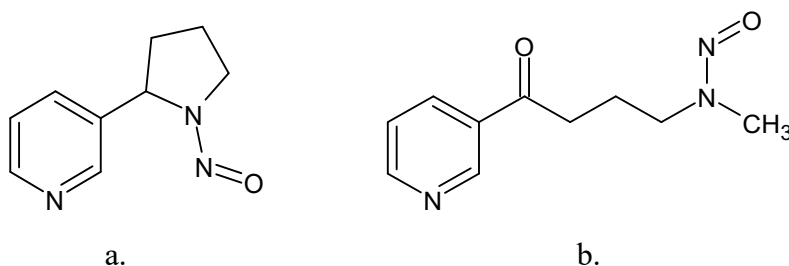


Obrázek 11: alkylované adukty guaninu (a) N^7 -alkyl-Gua (b) O^6 -alkyl-Gua

Na základě těchto poznatků lze formulovat obecné pravidlo, že pokud N-nitrosamin obsahuje ve své struktuře ethylovou nebo metylovou skupinu, bude jeho genotoxický potenciál vyšší než v případě těch N-nitrosaminů, které tyto funkční skupiny neobsahují [19].

3.1.2 Heterocyklické N-nitrosaminy

Další skupinou látek, pro které vychází *in vitro* testy genotoxicity pozitivně, jsou N-nitrosaminy obsahující ve své molekule heterocyklus. Konkrétním příkladem takových látek je například (N-nitrosomethylamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanon (NNK) a N'-nitrosornikotin (NNN) [20].



Obrázek 12: Heterocyklické N-nitrosaminy (a) NNN (b) NNK

Jedná se o n-nitrosaminy vyskytující se v tabáku. Vzhledem k tomu, že zejména v minulosti byla expozice rozsáhlých subpopulací tabákovému dýmu velmi běžná, byla studiu toxických účinků této skupiny N-nitrosaminů věnována velká pozornost.

I přes sterické bránění [19] zvyšuje přítomnost heterocyklu genotoxický potenciál N-nitrosaminu. Metabolismus takového N-nitrosaminu probíhá snáz v důsledku přítomnosti konjugovaného systému dvojných vazeb v aromatické části molekuly [21].

Bioaktivace NNK může probíhat různými způsoby, avšak nejčastěji dochází k α -hydroxylaci (katalyzovanou CYP 2A13) či ke karbonylové redukci. Karbonylová redukce,

katalyzovaná různými enzymy jako jsou například karbonylreduktázy a aldo-ketoreduktázy, vede ke vzniku NNAL (4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanol) a je následovaná α -hydroxylací.

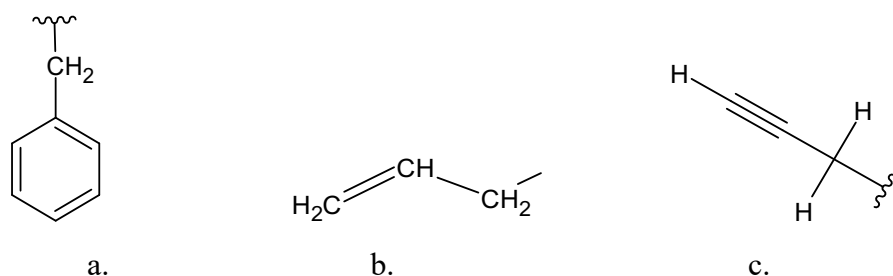
α -methylhydroxylací NNK vzniká meziprodukt α -hydroxymethyl NNK, ze kterého se tvoří dva meziprodukty – formaldehyd a diazohydroxid. Formaldehyd se dále mění na kyselinu mravenčí, a nakonec na oxid uhličitý. Diazohydroxid může tvořit vysoce reaktivní pyridyloxobutyl (POB) diazoniový ion, který vytváří konjugát s DNA. Podobně α -methylhydroxylace NNAL vede ke vzniku formaldehydu a pyridylhydroxybutyl (PHB) diazoniového iontu, který tvoří adukty DNA. Vzniklé DNA-reaktivní elektrofilny jsou považovány za příčinu mutagenity a karcinogenity NNK [20].

Existuje souvislost mezi velikostí heterocyklu a genotoxickými účinky daného N-nitrosaminu. Na základě údajů uvedených v databázi LCDB [22–26] se hodnoty TD₅₀ zmenšují v závislosti na zvětšování velikosti kruhu heterocyklu v řadě nitrosoazetidinu, nitrosopyrrolidinu, nitrosopiperidinu, nitrosohexamethyliminu a nitrosoheptamethyliminu, byť u jiných heterocyklických nitrosaminů není tato závislost jednoznačně prokázána. Z literatury však vyplývá pravidlo, že přítomnost heterocyklu v molekule N-nitrosaminu zvyšuje genotoxický potenciál [19].

3.1.3 Allylová a propargylová skupina

Benzylové a další skupiny, které odpovídají substruktuře aryl-C-N-N=O-nitrosaminové sloučeniny (potažmo i allylové a propargylové nitrosaminy, u kterých vycházíme z předpokladu, že budou reagovat podobně jako allylové) jsou spojené se zvyšováním genotoxických účinků, což bylo zjištěno na základě *in vitro* testů genotoxicity [19].

Benzylový/allylový či propargylový uhlík má nižší disociační energii [27], takže snadno dochází k aktivaci vazby mezi vodíkem a uhlíkem. Důsledkem této skutečnosti je pak metabolická α -hydroxylace.



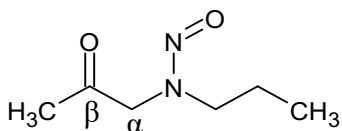
Obrázek 13: Speciální systémy násobných vazeb: (a) benzylová skupina (b) allylová skupina (c) propargylový uhlík

Obecně nám z těchto poznatků vyplývá pravidlo, že sloučeniny obsahující ve své struktuře benzylovou skupinu či allylový či propargylový uhlík budou díky své reaktivitě vykazovat zvýšený genotoxický potenciál.

3.1.4 Sloučeniny se skupinou slabě přitahující elektrony v β -poloze

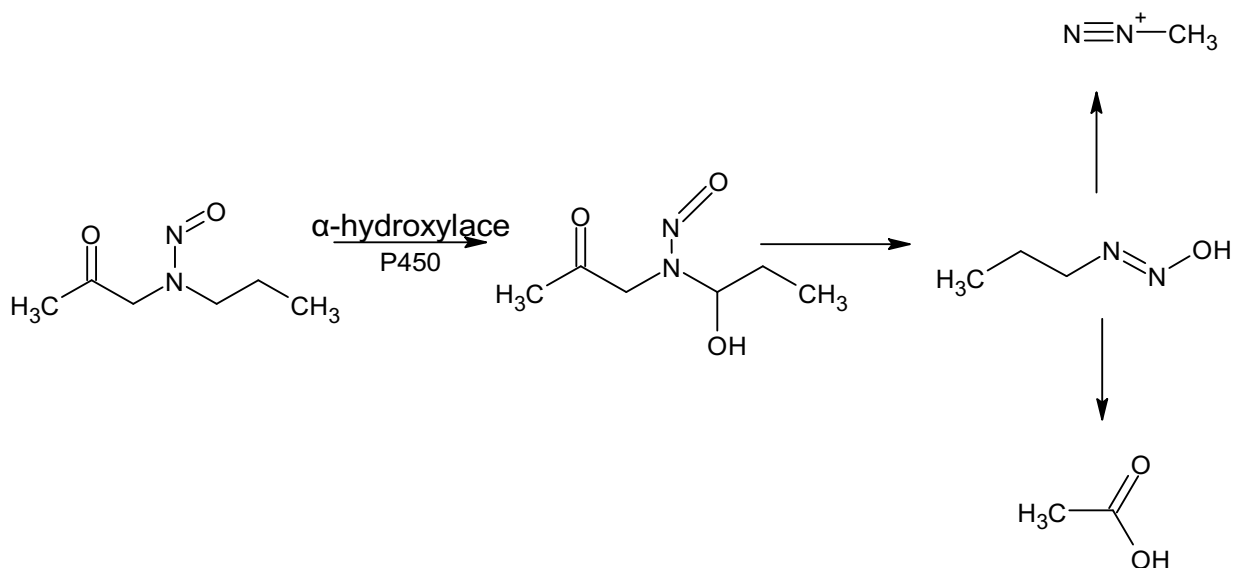
Testy genotoxicity ukázaly, že pokud je ve struktuře N-nitrosaminu v β -poloze přítomná skupina slabě přitahující elektrony, dochází ke zvyšování genotoxických účinků. Příkladem takové struktury jsou ketony [28]. Ketony podléhají α -hydroxylaci, vedoucí ke vzniku kyselého, a tedy snadno odštěpitelného α -vodíku. Polohy α a β jsou znázorněny níže na příkladu sloučeniny substituované skupinou slabě přitahující elektrony.

Při metabolismu 2-oxopropylové skupiny dochází k intramolekulárnímu přesmyku, který je následován α -hydroxylací a dochází tak ke vzniku methylového aduktu. Obdobně může reagovat 2-oxobutyl a další 2-oxosloučeniny s delším uhlíkatým řetězcem [14]. Příkladem N-nitrosaminu, který obsahuje 2-oxopropylovou skupinu je NOPPA (N-(2-oxopropyl)-N-nitrosopropylamin).



Obrázek 14: NOPPA

Na obrázku č. 15 je znázorněné schéma bioaktivace této skupiny se znázorněným přesmykem hydroxylové skupiny.



Obrázek 15: Bioaktivace NOPPA

3.2 Skupiny teoreticky snižující mutagenní účinky N-nitrosaminů

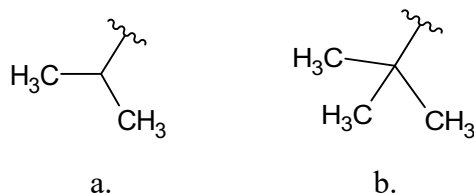
V případě N-nitrosaminů s určitými strukturálními prvky či funkčními skupinami byla pomocí testů genotoxicity prokázána jejich snížená aktivita. Příkladem jsou stericky bránící skupiny, karboxylová kyselina ve struktuře N-nitrosaminů nebo strukturální jednotka, která silně přitahuje elektrony v β -pozici N-nitrosaminu.

3.2.1 Stericky bránící skupiny (isopropyllová, tercbutylová a aromatická)

Stericky objemné skupiny (isopropyllová, tercbutylová a aromatická) snižují genotoxický potenciál příslušného N-nitrosaminu. To je způsobeno změnou povahy alkylového diazoniového iontu, který se tvoří během bioaktivace v jiné části molekuly N-nitrosaminu [19].

Isopropyllová skupina je taková, která má na α uhlíku dva substituenty, tercbutylová má na α uhlíku tři substituenty. Přítomnost i jedné takové skupiny vede v důsledku absence α vodíků ke snížení genotoxického potenciálu příslušné molekuly. V případě žádného N-nitrosaminu s tercbutylovou skupinou nebyla pomocí příslušných *in vitro* a *in vivo* testů prokázána jejich genotoxicita [19].

Na základě uvedených skutečností lze formulovat pravidlo, že absence vodíku na α uhlíku vede ke snížení genotoxického potenciálu.



Obrázek 16: Stericky bránící skupiny (a) isopropylová sk. (b) tercbutylová sk.

Vliv aromatického substituentu na genotoxické účinky příslušného N-nitrosaminu je méně jednoznačný. Přítomnost takového substituentu (který neobsahuje α uhlík) nemusí znamenat, že sloučenina nebude karcinogenní, ale do určité míry se snižuje pravděpodobnost genotoxického účinku sloučeniny. Jak již bylo zmíněno, absencí vodíku na α -uhlíku se předchází α -hydroxylaci. V případě, že jsou ve struktuře N-nitrosaminu přítomné dvě aromatické skupiny, pravděpodobnost genotoxicity je velmi nízká [19].

3.2.2 Sloučeniny s karboxylovou kyselinou

Negativní výsledky v testech genotoxicity nejsou v případě N-nitroso sloučenin s karboxylovou skupinou důsledkem ovlivnění reaktivity této skupiny, ale důsledkem toho, že karboxylová skupina ovlivňuje farmakokinetické vlastnosti celé molekuly [19].

3.2.3 Sloučeniny se skupinou silně přitahující elektrony v β -poloze

Přítomnost skupin v β -poloze N-nitrosaminů, které silně přitahují elektrony, snižuje genotoxický potenciál příslušných molekul, což bylo potvrzeno výsledky *in vitro* testů genotoxicity. Příčinou daného jevu může být fakt, že silná β -pozice posiluje vazbu mezi uhlíkem a vodíkem, a tak znemožňuje α -hydroxylaci [19].

4. Hodnocení akceptovatelného denního příjmu nitrosaminů v léčivech

Tato část bakalářské práce je zaměřena na problematiku výpočtu akceptovatelného denního příjmu látky (AI, z angl. „acceptable intake“). AI je denní příjem potenciálně genotoxické nečistoty přítomné v léčivu, který v případě celoživotní expozice nezvýší výskyt nádorového onemocnění v léčené populaci o více než 1×10^{-5} oproti populaci, která daným léčivem léčena není [29].

4.1 Postup výpočtu akceptovatelného denního příjmu pro vybrané deriváty N-nitrosopiperidinu

Nejběžněji používaný postup výpočtu AI je popsán v regulativním dokumentu ICH M7 R1 vydaném Evropskou lékovou agenturou. Pro tento typ výpočtu je nutné mít k dispozici výsledky dostatečného počtu skutečně kvalitních a věrohodných studií karcinogenity na zvířatech [30]. K výpočtu lze např. použít hodnoty TD_{50} z databáze LCDB (Lhasa Carcinogenicity Database), ale pouze za předpokladu, že byly testy prováděny na dostatečném počtu dávkových úrovní (minimálně tři) a dostatečném počtu jedinců v jednotlivých dávkových úrovních (minimálně padesát). Pokud studie nesplňují tyto požadavky, jejich robustnost je třeba posuzovat individuálně. Například větší počet dávkových skupin může vyvážit menší počet zvířat v jedné dávkové skupině. Pokud by bylo k dispozici více takových studií, bylo by důležité přistoupit konzervativně a zvolit nejnižší z dostupných hodnot TD_{50} .

V dokumentu EMA/369136/2020 „*Nitrosamine impurities in human medicinal products*“ je jako výchozí postup pro určení AI doporučen výpočet vycházející z hodnoty TD_{50} , což je dávka, která vyvolá v exponované skupině nárůst incidence určitého typu nádoru o 50 % oproti kontrolní skupině (poměr incidence nádorů v exponované a kontrolní skupině je tedy 1:2)

Jak je uvedeno v dokumentu ICH M7 R1, pro regulaci genotoxických látek v léčivech se využívá bezpečnostní faktor 50 000 k extrapolaci hodnot získaných z experimentů na zvířatech na lidskou populaci. Když se dávka, která způsobí tumory u 50 % populace (TD_{50}), podělí hodnotou 50 000, vypočítáme tak dávku, která by teoreticky způsobila tumory u 1 z 100 000 jedinců. Pokud vynásobíme tuto dávku vyjádřenou v jednotkách ng/kg/den průměrnou tělesnou

hmotností (50 kg), získáme hodnotu akceptovatelného příjmu příslušné genotoxické nečistoty v jednotkách ng/den.

$$AI = \frac{TD_{50} \cdot 50}{50\,000}$$

Rovnice 1: Odhad AI dle směrnice ICH M7 M1

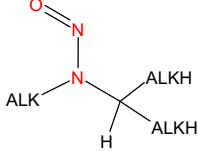
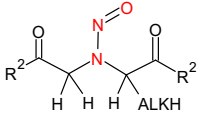
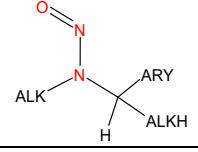
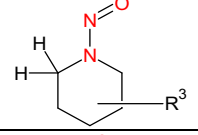
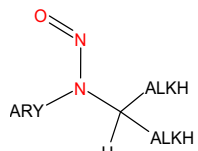
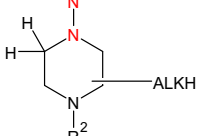
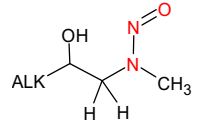
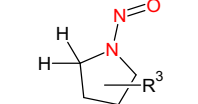
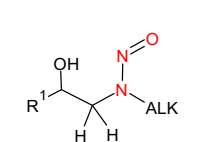
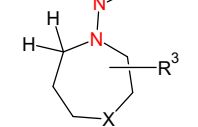
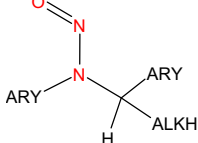
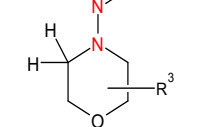
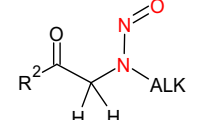
Pro látky, u kterých jsou k dispozici dostatečné údaje z kvalitních toxikologických studií splňujících dříve popsaná kritéria, bude hodnota AI vypočítána výhradně tímto přístupem.

U řady molekul ze skupiny N-nitrosaminů ovšem není k dispozici dostatek validních údajů umožňujících určení hodnoty AI dle výše zmíněné metodiky. Pro takové případy byly v rámci této bakalářské práce navrženy tři alternativní postupy, které umožňují provést odhad hodnoty AI s použitím méně kvalitních či méně komplexních dat o příslušné látce.

V případě, že nejsou v databázi LCDB k dispozici hodnoty TD_{50} získané ze studií splňujících kvalitativní požadavky pokynu ICH M7 R1, bude odhad AI proveden s využitím hodnot TD_{50} , které pocházejí z méně kvalitních studií a jsou uvedeny v LCDB či v jiném typu dostatečně kvalitního literárního zdroje (oponované vědecké publikace).

Druhý alternativní postup odhadu AI, který je detailně popsán ve vědeckém článku od autorů *Dobo, K. L. a kol., 2022*, se zabývá odhadem hodnot AI pro velké množství komplexních N-nitrosaminů, pro něž není k dispozici dostatek relevantních údajů. Toxikologická data, o něž se zmíněný odhad AI opírá, pocházejí z databáze Pfizer Carcinogenicity Explorer, ve kterém jsou sloučené údaje o nitrosaminech z databází Lhasa Carcinogenicity Database (LCDB) a Lhasa Vitic. Jednotlivé N-nitrosaminy byly na základě typických strukturních znaků rozděleny do 13 skupin, pro každou skupinu bylo shromážděno maximum dostupných toxikologických dat, z nichž byla pak pro každého zástupce ve skupině vypočtena hodnota AI. Výsledná hodnota odhadu AI byla stejná pro všechny N-nitrosaminy v dané skupině a odpovídala minimální hodnotě, která se v rámci skupiny vyskytovala. V tabulce číslo 1 je souhrn všech skupin, které jsou v této studii a přehled AI pro všechny skupiny [31].

Tabulka 1: Přehled výsledných odhadů AI pro 13 strukturních skupin N-nitrosaminů dle Dobo K. L. a kol., 2022

Struktur. skupina	Strukturální vzorec	Počet nitrosaminů ve sk.	Sk. AI	Struktur. skupina	Strukturální vzorec	Počet nitrosaminů ve sk.	Sk. AI
			(ng/den)				(ng/den)
1		7	26,5	8		5	18
2		7	18	9		2	499
3		12	106	10		3	153
4		6	26,5	11		3	43,4
5		14	440	12		1	242
6		3	18	13		1	129
7		2	17				

* ALK – alkylový řetězec, který může být substituován či obsahovat heteroatomy a/nebo násobné vazby; ALKH – alkylový řetězec, který může obsahovat heteroatomy a/nebo násobné vazby či vodík; ARY – kruhy: substituované/nesubstituované mono/polyarylové/heteroarylové; R¹ – vodík/substituent (cyklická struktura); R² – jakýkoli substituent kromě vodíku; R³ – jakýkoli substituent (včetně vodíku) nebo více substituentů; X – nitrosamin nebo uhlík s libovolným substituentem.

Poslední přístup k odhadu hodnoty AI pro N-nitrosaminy s nedostatkem validních toxikologických dat, který bude v této bakalářské práci použit, je inspirován studií *Chakravartih S., 2023*. Tato práce se týkala odhadu genotoxického potenciálu jednotlivých N-nitrosaminů na základě koeficientu pravděpodobnosti α -hydroxylace.

V rámci této bakalářské práce byly využity tabelované hodnoty koeficientu pravděpodobnosti α -hydroxylace (P- α CH₂) v případech, kdy byl k hodnocené látce s nedostatečnou kvalitou toxikologických dat k dispozici analog s kvalitními daty a tabelovanou hodnotou P- α CH₂. Tento postup sice není podložen konkrétní směrnicí, ale umožňuje využití znalostí o vlivu funkčních skupin na pravděpodobnost α -hydroxylace [32].

Logika tohoto přístupu spočívá v předpokladu, že vyšší pravděpodobnost α -hydroxylace vede k vyšší pravděpodobnosti genotoxického a následně karcinogenního účinku. Tudíž čím je hodnota P- α CH₂ vyšší, tím je hodnota AI nižší. Tato metoda však bude poskytovat věrohodné odhady AI pouze v případech, kdy je hlavním mechanismem vzniku genotoxického metabolitu právě α -hydroxylace. Výpočet bude proveden dle rovnice 2.

$$AI_{látka_A} = \frac{\alpha-CH_2 \text{ pravděpodobnost hydroxylace}_{látka_B}}{\alpha-CH_2 \text{ pravděpodobnost hydroxylace}_{látka_A}} \times AI_{látka_B}$$

Rovnice 2: Výpočet AI pomocí hodnot pravděpodobnosti α -CH₂ hydroxylace

Látka A je hodnocená látka, pro kterou je nedostatek kvalitních toxikologických údajů a látka B je strukturální analog s dostatečně kvalitními toxikologickými údaji.

4.2 Vliv strukturálních variací piperidinových nitrosaminů na hodnoty AI

V této bakalářské práci bude proveden odhad hodnoty AI pro tři konkrétní sloučeniny: N-nitrosopiperidin, 1-nitrosopiperidin-4-ol a 2-methyl-1-nitrosopiperidin. Tyto sloučeniny byly zvoleny na základě požadavku externího výrobce API a liší se v dostupnosti informací potřebných pro výpočet AI. Všechny tyto sloučeniny mají společný základní strukturální znak – piperidinové jádro, avšak se liší v jeho substituentech.

Nejprve je důležité všechny tři sloučeniny, které budou hodnoceny, rozebrat z hlediska jejich struktury. Jak bylo uvedeno v kapitolách výše, strukturální jednotky mají velký vliv na

genotoxický potenciál těchto látek. N-nitrosopiperidin je chemická sloučenina, která se strukturně skládá z hexagonálního řetězce o pěti methylenových jednotkách a jednoho atomu dusíku (tzv. piperidinový kruh). Na dusíku je navázána nitrososkupina ($-N=O$), jedná se o základní strukturní jednotku.

Jak se uvádí v kapitole 3.1.2., přítomnost heterocyklu v molekule N-nitrosaminu vede ke zvyšování pravděpodobnosti genotoxicity. Je nutné se zaměřit i na ostatní substituenty, které pravděpodobnost genotoxicity mohou dále zvýšit či naopak snížit.

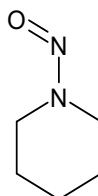
Ve studii od *Rao, T. K. a kol., 1977* byl proveden Amesův test na N-nitrosopiperidin a dalších substituovaných nitrosopiperidinech. Test byl proveden na pěti kmenech *Salmonella typhimurium* (TA1535, TA100, TA1537, TA1538 a TA98) [33].

Hlavním závěrem studie je, že nitrosopiperidin projevuje mutagenní aktivitu po metabolické aktivaci mikrozomálními jaterními enzymy. Bylo také zjištěno, že nitrosopiperidiny s methylovou skupinou v poloze 4 mají vyšší mutagenní aktivitu než ty s methylovou skupinou v poloze 2. Dál bylo zjištěno, že nitroso-4-piperidinol je mutagenní a rovněž vyžaduje pro maximální aktivitu aktivaci mikrozomálními jaterními enzymy [33].

4.2 Odhad akceptovatelného denního příjmu pro vybrané deriváty N-nitrosopiperidinu

4.2.1 N-nitrosopiperidin

Chemická struktura a vlastnosti:



Obrázek 17: N-nitrosopiperidin

Jiný název: Nitrosopiperidin
CAS číslo: 100-75-4
Zkratka: NPIP
SMILES: C1CCN(CC1)N=O

Tabulka 2: Fyzikálně chemické parametry N-nitrosopiperidinu

Veličina	Hodnota	zdroj	citace
Molekulární hmotnost	114,15 g/mol	PubChem 2.1	[34]
Log K_{ow}	0,36 – 0,72	KOWWIN v1.67	[35]
Rozpustnost ve vodě	4,55 mol/l (25°C)	KOWWIN v1.67	[35]
pKA	-3,18 ± 0,2	předpoklad	[36]
P- α CH ₂	0,56		[32]

Nitrosopiperidin je organická sloučenina, jejíž struktura je založená na piperidinovém jádru, kdy na dusíku je navázána nitrososkupina. Tato struktura vykazuje určité chemické a fyzikální vlastnosti, které mají vliv na její metabolismus. Při hodnocení „kritických bodů“ struktury je nejprve provedena analýza uhlíku v α poloze, což je místo, kde dochází k α -hydroxylaci, a to vede, jak bylo zmíněno výše, ke vzniku reaktivních metabolitů. V případě N-nitrosopiperidinu nejsou α uhlíky ničím substituovány. V této molekule se tedy nachází 2 kyselé vodíky na α uhlících, a to vede k předpokladu zvýšené pravděpodobnosti α -hydroxylace na této poloze.

4.2.1.1 Odhad AI z TD₅₀

LCDB (Lhasa Carcinogenicity Database) je databáze poskytovaná společností Lhasa Limited, která obsahuje informace o karcinogenezi chemických látek. V následující tabulce jsou shrnuty klíčové informace o N-nitrosopiperidinu získané z Lhasa Carcinogenicity Database (LCDB) [24]. Uvedeny jsou údaje získané ze studií provedených na pěti druzích zvířat: myš, potkan, křeček, opice makak (*Cynomolgus*, *Rhesus*). Pro každý druh zvířete jsou prezentovány hodnoty TD₅₀ dle Lhasa a Gold databáze, pohlaví zvířete, výsledky studie a místo nádoru. Je důležité poznamenat, že hodnoty Lhasa TD₅₀ nejsou dostupné pro všechny zvířecí druhy kvůli nedostatku údajů potřebných pro jejich výpočet. Hodnoty Gold TD₅₀ jsou na druhou stranu dostupné pro všechny zvířecí druhy, protože Gold databáze využívá jiných zdrojů dat a výpočetních modelů než Lhasa databáze.

Tabulka 3: Souhrn údajů pro NPIP z databáze LCDB

Druh	Lhasa TD ₅₀ (mg/kg/den)	Gold TD ₅₀ (mg/kg/den)	Pohlaví	Výsledek	Místo nádoru
Myš	-	1,3	samec	pozitivní	žaludek, játra, plíce
Potkan	1,12	1,43	nespecifik.	pozitivní	játra, nosohltan, jícen, více míst
Křeček	29,1	83,3	samice	pozitivní	vícenásobný výskyt
			samec	pozitivní	vícenásobný výskyt
Opice Cynomolgus	-	12,1	nespecifik	pozitivní	játra
Opice Rhesus	-	2,76	nespecifik.	pozitivní	játra

Pro odhad hodnoty akceptovatelného denního příjmu nitrosopiperidinu je nutné se v tomto případě zaměřit na studie, které byly provedeny na křečcích a potkanech, a to z důvodu dostupnosti jejich hodnot Lhasa TD₅₀. V případě křečka byly čtyři dávkové skupiny po 30 až 50 zvířatech. U potkana proběhla studie na 13 dávkových skupinách, ale na menším počtu zvířat, a to po 12 na skupinu. Jak již bylo zmíněno výše, v dokumentu „Assessment report“ vydaným Evropskou lékovou agenturou v roce 2020 se uvádí, že studie, které nesplňují požadavky na počet dávkových skupin či na počet zvířat na skupinu, se mohou posoudit

z hlediska robustnosti případ od případu. To je případ studie na nitrosopiperidinu, kde vyšší počet dávkových skupin kompenzuje menší počet zvířat v každé skupině.

Data získaná na křečkovi a potkanovy jsou z hlediska požadavků ICH M7 R1 pro odhad AI v podstatě stejně vhodná. V souladu s pravidly konzervativního přístupu byla nakonec pro odhad AI zvolena data získaná v rámci experimentů na potkanech, jelikož jejich použití ve výsledku povede k nižší hodnotě příslušného parametru.

Následuje detailní pohled na dvě laboratorní studie, které byly provedeny na potkanech. Výhodou těchto studií je, že zahrnují větší počet dávkových skupin s menším počtem zvířat, nevýhodou je, že samice a samci potkana byli zařazeni do dávkových skupin jako jedna smíšená skupina. První studie byla provedena na velkém počtu dávkových skupin (celkem třináct) po menším počtu zvířat na skupinu. Tato studie určila nejnižší hodnotu TD_{50} pro nitrosopiperidin na 1,33 mg/kg/den [37]. Druhá studie, má dostačující pět dávkových skupin po větším počtu zvířat na skupinu. V této studii dosáhla nejnižší hodnota TD_{50} 0,974 mg/kg/den [38].

Tabulka 4: Klíčové informace o Nitrosopiperidinu z LCDB – studie provedená na potkanovi – 1. studie

Potkan	Místo nádoru	Lhasa TD ₅₀ [mg/kg/den]	Dávka [µg/kg/den] výskyt tumoru					
			0	11	22	174	1050	2790
Studie 1	tlusté střevo	226	0	11	22	174	1050	2790
		(36,882 - 3608,567)	0/246	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12
	játra (karcinom-hepatocelulární)	1,52	0	11	22	174	1050	2790
		(1,128 - 2,109)	2/246	0/12	1/12	2/12	10/12	9/12
	játra (nádor - hepatocelulární)	1,43	0	11	22	174	1050	2790
		(1,055 - 1,996)	8/246	0/12	1/12	3/12	11/12	9/12
	dutina nosní - více typů nádorů	27,8	0	11	22	174	1050	2790
		(12,29 - 89,568)	0/246	0/12	1/12	0/12	1/12	0/12
	dutina nosní - maligní nádor	78,4	0	11	22	174	1050	2790
		(22,315 - 1254,461)	0/246	0/12	1/12	0/12	0/12	0/12
	jícen- více typů nádorů	1,33	0	11	22	174	1050	2790
		(0,981 - 1,838)	0/246	0/12	0/12	1/12	10/12	12/12
	jícen - maligní nádor	10,4	0	11	22	174	1050	2790
		(6,137 - 19,669)	0/246	0/12	0/12	1/12	3/12	3/12
kůže - nádor maligní	222	0	11	22	174	1050	2790	
	(36,679 - 3554,152)	0/246	0/12	0/12	0/12	0/12	1/12	

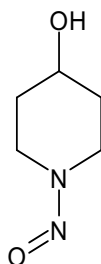
Tabulka 5: Klíčové informace o Nitrosopiperidinu z LCDB – studie provedená na potkanovi – 2. studie

Potkan	Místo nádoru	Lhasa TD ₅₀ [mg/kg/den]	Dávka [µg/kg/den] výskyt tumoru				
			0	17,1	85,7	429	2140
Studie 2	játra	0,974	0	17,1	85,7	429	2140
		(0,597 - 1,74)	0/40	3/78	5/75	16/34	11/34
	vícenásobný výskyt - více typů nádorů	1,526	0	17,1	85,7	429	2140
		(1,526 - 3,842)	0/40	0/78	2/75	8/34	24/34
	vícenásobný výskyt - maligní nádor	1,025	0	17,1	85,7	429	2140
		(1,025 - 2,62)	4/40	7/78	7/75	14/34	28/34

V souladu s pravidly konzervativního přístupu byla tedy pro odhad výsledného AI použita hodnota TD_{50} z druhé studie na potkanovi. Výsledné AI bylo odhadnuto dle rovnice 1 a mělo hodnotu **AI = 974 ng/den**.

4.2.2 Nitrosopiperidinol

Chemická struktura a vlastnosti:



Obrázek 18: 1-nitrosopiperidin-4-ol

Jiný název: 1-nitrosopiperidin-4-ol

CAS číslo: 55556-93-9

SMILES: C1CN(CCC1O)N=O

Tabulka 6: Fyzikálně chemické parametry 1-nitrosopiperidin-4-olu

Veličina	Hodnota	zdroj	citace
Molekulární hmotnost	130,15 g/mol	PubChem 2.1	[39]
Log K _{ow}	-0.82– -0,89	KOWWIN v1.67	[40]
Rozpustnost ve vodě	40,6 mol/l (25°C)	WSKOW v1.47	[40]
pKA	14.38±0.2	předpoklad	[41]
P-αCH ₂	0,61		[32]

1-nitrosopiperidin-4-ol je derivátem nitrosopiperidinu, kde na piperidinovém jádru je hydroxylová skupina ve 4. poloze. To ovlivňuje polaritu a možné interakce sloučeniny s biologickými systémy a také může mít vliv na rozpustnost molekuly, stabilitu a reaktivitu. Vliv hydroxylové skupiny zvyšuje pravděpodobnost α -hydroxylace.

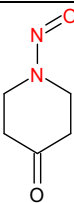
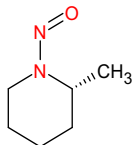
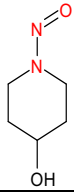
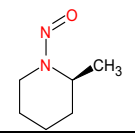
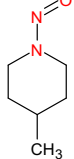
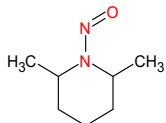
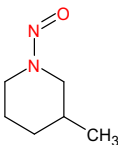
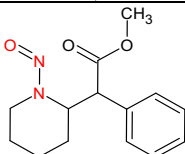
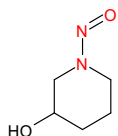
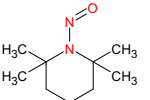
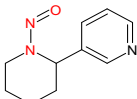
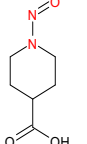
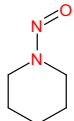
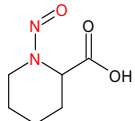
4.2.2.1 Odhad AI z TD₅₀

Pro sloučeninu 1-nitrosopiperidin-4-ol nejsou k dispozici data v databázi LCBD, jak tomu bylo u N-nitrosopiperidinu. Byly ovšem nalezeny hodnoty TD₅₀ pro různé molekuly N-nitrosaminů ve studii od autorů *Dobo K. L. a kol., 2022*. Tyto hodnoty jsou získány buď přímo z databáze LCDB, nebo jsou vypočítány. Konkrétně pro nitrosopiperidinol je výpočtem zjištěna hodnota TD₅₀ 0,596 mg/kg/den. Po přepočítání dle rovnice 1 je možné odhadnout hodnotu akceptovatelného příjmu AI = **596 ng/den**.

4.2.2.2 Metoda dle skupinového AI

Ve studii od autorů *Dobo K. L. a kol., 2022* je nitrosopiperidinol zařazen do skupiny 9, což je kategorie zahrnující deriváty N-nitrosopiperidinu (NPIP), která obsahuje 14 nitrosaminů, z toho 5 poskytovalo v rámci *in vivo* testů karcinogenity negativní výsledky. Hodnoty TD₅₀ se u zbývajících derivátů N-nitrosopiperidinu pohybují v rozmezí od 0,499 do 49,4 mg/kg/den. Tyto specifické nitrosaminy, včetně jejich konkrétních hodnot TD₅₀, jsou detailně prezentovány v tabulce č. 7.

Tabulka 7: Přehled hodnot TD₅₀ pro strukturální analogy N-nitrosopiperidinu dle *Dobo K. L. a kol., 2022*

Nitrosamin	CAS číslo	TD ₅₀ (mg/kg /den)	Nitrosamin	CAS číslo	TD ₅₀ (mg/kg /den)
	55556-91-7	0,499		14026-03-0	22,1
	55556-93-9	0,596		36702-44-0	49,4
	15104-03-7	0,665		17721-95-8	nekar.
	13603-07-1	0,665		55557-03-4	nekar.
	55556-85-9	0,819		6130-93-4	nekar.
	100-75-4	0,974		6238-69-3	nekar.
	37620-20-5	4,14		4515-18-8	nekar.

Porovnáním těchto hodnot TD_{50} můžeme určit, že 1-nitrosopiperidin-4-on má v rámci skupiny nejnižší hodnotu TD_{50} . Na základě toho byla pro strukturální analogy N-nitrosopiperidinu určena hodnota AI na úrovni 499 ng/den. Protože námi hodnocená látka 1-nitrosopiperidin-4-ol patří do této strukturální skupiny, bude hodnota AI = **499 ng/den**.

Odhady AI získané na základě hodnoty TD_{50} z nedostatečně relevantního zdroje a na základě skupinové příslušnosti hodnoceného N-nitrosaminu jsou si velmi blízké, což může být považováno za potvrzení věrohodnosti hodnoty AI.

4.2.2.3 Metoda zohledňující pravděpodobnost α -hydroxylace

Poslední přístup, který bude využit pro určení hodnoty AI, je založen na metodě pravděpodobnosti α -hydroxylace N-nitrosaminů, inspirovanou ze studie od autora *Chakravartih, S., 2023*. Jako strukturální analog pro odvození hodnoty AI bude využit NPIP. Výpočtem dle rovnice 2 se získá odhad hodnoty AI pro nitrosopiperidinol **894,16 ng/den**.

$$AI_A = \frac{\alpha-CH_2 \text{ pravděpodobnost hydroxylace}_{NPIP}}{\alpha-CH_2 \text{ pravděpodobnost hydroxylace}_A} \times AI_{NPIP}$$

$$AI_A \equiv \frac{0,56}{0,61} \times 974$$

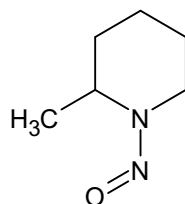
$$AI_A = \mathbf{894,16 \text{ ng/den}}$$

4.2.2.4 Souhrn

Hodnota AI odhadnutá pro nitrosopiperidin (974 ng/den) je zhruba dvakrát vyšší, než nejnižší hodnota AI pro 1-nitrosopiperidin-4-ol (499 ng/den). Toto zjištění odpovídá informacím prezentovaným v kapitole 3, kde je uvedeno, že přítomnost hydroxylové skupiny zvyšuje genotoxický potenciál látky. Tímto se potvrzuje, že závěry jsou v souladu s očekáváním založeným na strukturálních vlastnostech daných sloučenin a jejich předpokládaném vlivu na genotoxický potenciál.

4.2.3 2-methyl-1-nitrosopiperidin

Chemická struktura a vlastnosti:



Obrázek 19: 2-methyl-1-nitrosopiperidin

Jiné názvy: 2-methylnitrosopiperidin
CAS číslo: 7247-89-4
SMILES: CC1CCCCN1N=O

Tabulka 8: Fyzikálně chemické parametry 2-methyl-1-nitrosopiperidinu

Veličina	Hodnota	zdroj	citace
Molekulární hmotnost	128.17 g/mol	PubChem 2.1	[42]
Log K_{ow}	0,71–1,14	KOWWIN v1.67	[43]
Rozpustnost ve vodě	18,1 mol/l (25°C)	WSKOW v1.47	[43]
pKA	-3.11±0.40	předpoklad	[44]
P- α CH ₂	0,232		[32]

2-methylnitrosopiperidin představuje další derivát nitrosopiperidinu (NPIP). Tato sloučenina obsahuje methylovou skupinu v druhé poloze na piperidinovém jádře. Přítomnost methylové skupiny může ovlivnit fyzikálně-chemické vlastnosti sloučeniny, a to například rozpustnost, stabilitu a lipofilitu. V kontextu pravděpodobnosti α -hydroxylace má 2-methyl-1-nitrosopiperidin jeden ze dvou uhlíků v α -poloze chráněný pomocí substituce methylovou skupinou. Tato skupina stericky chrání toto místo, což omezuje možnost α -hydroxylace, jak bylo podrobně vysvětleno v kapitole 3.2.1 Tento fakt vede k tomu, že koeficient pravděpodobnosti α -CH₂ hydroxylace je u tohoto derivátu nižší v porovnání s předchozími sloučeninami.

Na rozdíl od sloučenin hodnocených v předchozích částech této práce se 2-methyl-1-nitrosopiperidin vyznačuje tím, že má dva optické izomery, označované jako R a S.

Optické izomery jsou specifický druh stereoisomerů, které se liší ve své schopnosti otočit rovinu polarizovaného světla. Tato vlastnost vychází z přítomnosti tzv. chirálního centra

(nebo více center) v molekule, což je uhlíkový atom, na němž jsou navázány čtyři různé skupiny. Optické izomery jsou také nazývány enantiomery. Enantiomery jsou značeny jako R a S (dříve D a L). Značení R (z latinského rectus) a S (z latinského sinister) je založeno na prioritě substituentů kolem chirálního centra.

Enantiomery, i když mají stejný strukturní vzorec, stejný typ a počet vazeb, mohou mít velmi odlišné vlastnosti, zejména ve vztahu k biologickým systémům, protože mnoho biologických molekul je také chirálních. V tomto případě můžeme mimo jiné pozorovat rozdíly v příslušných hodnotách TD₅₀.

4.2.3.1 Odhad AI z TD₅₀

V databázi LCDB existují údaje pro oba izomery [45, 46]. Tyto informace jsou podrobně shrnuty v tabulce č. 10 a v tabulce č. 11. Zdrojem údajů byla studie porovnávací karcinogenní působení dvou optických izomerů 2-methylnitrosopiperidinu [47].

Tabulka 9: Souhrn údajů pro R a S izomer 2-Methylnitrosopiperidinu z databáze LCDB

Izomer	Druh	Lhasa TD₅₀ (mg/kg/den)	Gold TD₅₀ (mg/kg/den)	Pohlaví	Výsledek	Místo nádoru
R	Potkan	-	20,4	nespecifik.	pozitivní	vícenásobný výskyt
S	Potkan	-	13,2	nespecifik.	pozitivní	vícenásobný výskyt

Tabulka 10: Klíčové informace o R a S izomeru 2-Methylnitrosopiperidinu z LCDB

Izomer	Potkan	Místo nádoru	Lhasa TD ₅₀ [mg/kg/den]	Gold TD ₅₀ [mg/kg/den]	Dávka[mg/kg/den] výskyt tumoru	
R	mix pohlaví	játra	-	108	0	25,7
					0/20	3/20
		více lokalit	-	20,4	0	25,7
					1/20	12/20
		čichový nerv - mozek	-	22,1	0	25,7
					0/20	11/20
S	mix pohlaví	játra - jaterní buňky	-	61,2	0	25,7
					0/20	5/20
		játra - více míst	-	49,4	0	25,7
					0/20	6/20
		čichový nerv	-	34,5	0	25,7
					0/20	8/20
		více lokalit	-	13,2	0	25,7
					1/20	15/20

Databáze nám v současné době neposkytuje dostatečné množství údajů potřebných pro odhad hodnot TD₅₀ a výpočet AI pro 2-methylnitrosopiperidin. Existují významná omezení v dostupných datech, včetně toho, že provedené testy se zatím omezují na malý počet zvířat a nedostatečný počet dávkových skupin. Tato situace neumožňuje uskutečnit plnohodnotné závěry. Vzhledem k tomu je nutné pro získání hodnoty AI použít jiné zdroje TD₅₀.

Ve studii od autorů *Dobo K. L. a kol., 2022.* jsou uvedené specifické hodnoty TD₅₀ pro jednotlivé nitrosaminy, které byly získané z databáze LCDB či výpočtem. Když se přistoupí k hodnocení specifických hodnot pro oba izomery, které jsou uvedené v tabulce č. 7, vykazují se významné rozdíly. Pro (R)-2-methyl-1-nitrosopiperidin je udána hodnota TD₅₀ 22,1 mg/kg/den. Z této hodnoty byla pomocí rovnice 1 vypočítána hodnota AI, která činí **22 100 ng/den**.

Podobně, pro izomer (S)-2-methyl-1-nitrosopiperidin je určena hodnota TD₅₀ na 49,4 mg/kg/den. Přepočtem získáme hodnotu AI této látky, a sice **49 400 ng/den**.

4.2.3.2 Metoda dle skupinového AI

Pro určení hodnoty TD_{50} může být využita metoda strukturních skupin, podobně jako u předchozí sloučeniny nitrosopiperidinolu.

Ve vztahu k 2-methylnitrosopiperidinu, jenž patří do stejné strukturní skupiny jako nitrosopiperidinol, se předpokládá, že bude platit stejné skupinové AI, a to **499 ng/den**.

4.2.3.3 Metoda zohledňující pravděpodobnost α -hydroxylace

Poslední přístup, který bude využit pro určení hodnoty AI 2-methylnitrosopiperidinu, je metoda zohledňující pravděpodobnost α -hydroxylace N-nitrosaminu, inspirovanou ze studie od autora *Chakravartih, S., 2023*.

Opět bude výpočet proveden pomocí rovnice 2. V tomto případě bude látka A 2-methylnitrosopiperidin a látka B (strukturní analog s dostatečně kvalitními toxikologickými údaji) nitrosopiperidin.

$$AI_A = \frac{\alpha-CH_2 \text{ pravděpodobnost hydroxylace}_{NPIP}}{\alpha-CH_2 \text{ pravděpodobnost hydroxylace}_A} \times AI_{NPIP}$$

$$AI_A = \frac{0,56}{0,232} \times 974$$

$$AI_A = \mathbf{2\ 351,03\ ng/day}$$

Výpočet nám poskytl hodnotu AI pro 2-methylnitrosopiperidin, která je **2 351,03 ng/den**. Vzhledem k absenci dostupných údajů o pravděpodobnosti α -hydroxylace pro oba optické izomery 2-methylnitrosopiperidinu, je tento výpočet aplikován jako obecná hodnota platná pro obě tyto formy sloučeniny.

4.3 Souhrn

Pro odhad hodnoty akceptovatelného denního příjmu N-nitrosopiperidinu, 1-nitrosopiperidinu-4-olu a 2-methyl-1-nitrosopiperidinu byly využity různé metody. Následující tabulka nabízí přehled metod použitých pro odhad AI a hodnotí jejich výhody a nevýhody.

Tabulka 11: Hodnocení metod použitých pro odhad AI u N-nitrosaminů

Metoda výpočtu	Výhody	Nevýhody
Standardní metoda výpočtu AI	Standardizovaná metoda , pokud jsou k dispozici dostatečné údaje.	U řady molekul ze skupiny N-nitrosaminů nejsou k dispozici validní údaje.
Metoda využívající méně kvalitní hodnoty TD₅₀	Pro odhad AI umožňuje využití dostupných dat . Zohledňuje více studií či databází.	Data mohou být méně spolehlivá kvůli nižší kvalitě zdrojů. Výsledky mohou být zkreslené nedostatkem kvalitních dat, nemusí odrazet genotoxický potenciál sloučeniny.
Metoda dle skupinového AI	Metoda je využitelná, pokud nejsou k dispozici kvalitní data. Hodnota AI je určena na základě nejnižší hodnoty TD₅₀ ve skupině, což odráží konzervativní přístup .	Metoda nebyla schválena orgánem EMA pro bezpečnost léčiv: Safety Working Party (SWP). Nedokonale reflektuje jednotlivé TD ₅₀ všech sloučenin ve skupině, což může vést k přeceňování toxicity některých látek.
Metoda zohledňující pravděpodobnost α-hydroxylace	Metoda využívá koeficienty pravděpodobnosti α -hydroxylace konkrétní sloučeniny. Metoda je využitelná, pokud nejsou k dispozici kvalitní data.	Metoda není v souladu s ICH M7 R1. Závisí na dostupnosti a kvalitě údajů strukturního analogu .

Tabulka 12: Souhrn hodnot AI pro deriváty N-nitrosopiperidinu

odhad AI (ng/den)	odhad AI (ng/den)			
	TD ₅₀ (z LCDB)	TD ₅₀ (z méně kvalitních studií)	Metoda dle skupinového AI	Metoda zohledňující pravděpodobnost α -hydroxylace
N-nitrosopiperidin	974	-	-	-
1-nitrosopiperidin-4-ol	-	596	499	894,16
2-methyl-1-nitrosopiperidin (R/S izomer)	-	22 100	499	2 351,03
		49 400		

Pro nitrosopiperidin byla zvolena hodnota AI 974 ng/den, jelikož byla odvozena od hodnoty TD₅₀ získané z kvalitní studie, která splňovala stanovená kritéria pro kvalitu. V případě 1-nitrosopiperidin-4-olu bylo pro odhad AI zvoleno TD₅₀ dle skupinového AI, což odpovídá hodnotě 499 ng/den. Tato volba vychází z konzervativního přístupu a je v souladu s hodnotou vypočítanou z TD₅₀ získaného z méně kvalitní studie. Pro 2-methyl-1-nitrosopiperidin bylo upřednostněno AI ve výši 2 351,03 ng/den, které bylo získáno metodou zohledňující pravděpodobnost α -hydroxylace. Odhad této hodnoty byl založen na předpokladu, že tato látka má menší genotoxický potenciál než nitrosopiperidin a 1-nitrosopiperidin-4-ol, a tím bude její AI v porovnání s těmito látkami vyšší.

Závěr

V rámci předložené bakalářské práce byl diskutován vztah mezi strukturou a aktivitou N-nitrosaminů. Předmětem zájmu byl vliv struktury těchto sloučenin na průběh metabolických procesů, které mohou vést k tvorbě buď velmi toxických reaktivních metabolitů, nebo produktů, které nepředstavují pro organismus výrazné riziko. Reaktivní metabolity vznikají při metabolických přeměnách N-nitrosaminů katalyzovaných enzymy ze skupiny cytochrom P450 a jsou schopné se vázat na dusíkaté báze DNA. V důsledku toho lze některé N-nitrosaminy zařadit mezi potenciálně mutagenní látky. Bakteriální testy reverzních mutací, jako je například Amesův test, se ukázaly být zvláště účinné při predikci karcinogenity u N-nitrosaminů, na základě korelace výsledků reverzních testů mutagenity s *in vivo* testy karcinogeneze.

V kontextu Structure-Activity Relationship (SAR), metody popisující vztah mezi strukturou a aktivitou, se práce věnovala vlivu jednotlivých funkčních skupin na výslednou genotoxicitu příslušných N-nitrosaminů. Byly popsány strukturní rysy odpovědné zvyšování či snižování genotoxického potenciálu látky.

Bylo konstatováno, že u N-nitrosaminů obsahujících ve své struktuře methylovou či ethylovou skupinu se metabolická aktivace odehrává na prvním uhlíku v řetězci, na kterém se nachází kyselý alfa vodík. Byl tak objasněn mechanismus α -hydroxylace, klíčové reakce vedoucí ke vzniku reaktivních metabolitů a následných aduktů DNA. Dalším strukturním prvkem nacházejícím se v molekulách N-nitrosaminů, u kterých vycházely testy genotoxicity pozitivně, jsou heterocykly. Strukturní prvky jako jsou benzylová skupina, allylový či propargylový uhlík zvyšují genotoxicitu molekuly. Dále bylo zjištěno, že N-nitrosaminy se skupinou přitahující elektrony v β -poloze také zvyšují genotoxické účinky dané molekuly.

Uvedeny byly také určité strukturní jednotky a funkční skupiny, které teoreticky snižují genotoxický potenciál N-nitrosaminů. Stericky bránící skupiny ovlivňují povahu alkylového diazoniového iontu vytvářeného během bioaktivace, či zaujímají potenciální pozici α -hydroxylace, což může vést ke snížení genotoxického potenciálu. Příkladem je isopropylová nebo terebutylová skupina. N-nitroso sloučeniny s karboxylovou skupinou v genotoxických testech vykazují negativní výsledky, což je pravděpodobně způsobeno tím, jakým mechanismem tato skupina ovlivňuje farmakokinetické vlastnosti celé molekuly. N-nitrosaminy, které obsahují v β -poloze skupinu, která silně přitahuje elektrony, ukazují rovněž

v testech genotoxicity nižší genotoxický potenciál, vzhledem k tomu, že tato strukturní jednotka posiluje vazbu mezi uhlíkem a vodíkem, a to inhibuje α -hydroxylaci.

V rámci praktické části této bakalářské práce byl proveden odhad hodnot akceptovatelného příjmu (AI) vybraných derivátů nitrosopiperidinu. Hlavním cílem bylo navrhnout metody umožňující odhad AI i pro strukturní analogy, pro něž nejsou dostupná dostatečně věrohodná toxikologická data.

Pro odhad hodnoty AI byly v případě omezené dostupnosti dat použity tři přístupy. První přístup byl založen na použití hodnot TD_{50} z méně kvalitních informačních zdrojů. V dalším přístupu byla použita metoda, která byla popsána ve vědeckém článku *Dobo K. L. a kol. (2022)*, kde byly na základě strukturních znaků jednotlivých nitrosaminů vytvořeny skupiny, ke kterým byly přiřazeny skupinové hodnoty AI. Poslední metoda vycházela z práce *Chakravartih S., 2023* a k dohadu AI byly použity uvedené koeficienty pravděpodobnosti α -hydroxylace jednotlivých N-nitrosaminů.

Odhadnutá výsledná hodnota AI pro nitrosopiperidin byla 974 ng/den, pro nitrosopiperidinol 499 ng/den a pro 2-methyl-1-nitrosopiperidin byla určena na 2351,03 ng/den, Vzájemné poměry výsledných odhadů hodnot AI jsou v souladu s teoretickými předpoklady o vztahu mezi strukturou a aktivitou N-nitrosaminů.

Seznam literatury:

- [1] YAMAZAKI, Hiroshi, Yukiharu INUI, Chul-Ho YUN, F.Peter GUENGERICH a Tsutomu SHIMADA. Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of *N*-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis* [online]. 1992, **13**(10), 1789–1794 [vid. 2023-04-03]. ISSN 0143-3334, 1460-2180. Dostupné z: doi:10.1093/carcin/13.10.1789
- [2] LEE, V. M., L. K. KEEFER a M. C. ARCHER. An evaluation of the roles of metabolic denitrosation and alpha-hydroxylation in the hepatotoxicity of N-Nitrosodimethylamine. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 1996, **9**(8), 1319–1324. ISSN 0893-228X. Dostupné z: doi:10.1021/tx960077u
- [3] EMA reviewing medicines containing valsartan from Zhejiang Huahai following detection of an impurity. nedatováno.
- [4] RESEARCH, Center for Drug Evaluation and. FDA Updates and Press Announcements on Angiotensin II Receptor Blocker (ARB) Recalls (Valsartan, Losartan, and Irbesartan). *FDA* [online]. 2023 [vid. 2023-05-23]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/fda-updates-and-press-announcements-angiotensin-ii-receptor-blocker-arb-recalls-valsartan-losartan>
- [5] EMA. EMA update on metformin diabetes medicines. *European Medicines Agency* [online]. 6. prosinec 2019 [vid. 2023-05-23]. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-update-metformin-diabetes-medicines>
- [6] EMA to review ranitidine medicines following detection of NDMA. nedatováno.
- [7] RESEARCH, Center for Drug Evaluation and. Laboratory Tests | Ranitidine. *FDA* [online]. 2019 [vid. 2023-05-23]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/drugs/drug-safety-and-availability/laboratory-tests-ranitidine>
- [8] *List of Classifications – IARC Monographs on the Identification of Carcinogenic Hazards to Humans* [online]. [vid. 2023-06-16]. Dostupné z: <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications/>
- [9] THRESHER, Andrew, Robert FOSTER, David J. PONTING, Susanne A. STALFORD, Rachael E. TENNANT a Robert THOMAS. Are all nitrosamines concerning? A review of mutagenicity and carcinogenicity data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. 2020, **116**, 104749 [vid. 2023-04-03]. ISSN 02732300. Dostupné z: doi:10.1016/j.yrtph.2020.104749
- [10] MOCHIZUKI, M., M. OSABE, T. ANJO, E. SUZUKI a M. OKADA. Mutagenicity of alpha-hydroxy N-nitrosamines in V79 Chinese hamster cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* [online]. 1984, **108**(3), 290–295. ISSN 0171-5216. Dostupné z: doi:10.1007/BF00390460
- [11] CHOWDHURY, Goutam, M. Wade CALCUTT, Leslie D. NAGY a F. Peter GUENGERICH. Oxidation of methyl and ethyl nitrosamines by cytochrome P450 2E1 and 2B1. *Biochemistry* [online]. 2012, **51**(50), 9995–10007. ISSN 1520-4995. Dostupné z: doi:10.1021/bi301092c

- [12] GODOY, H. M., M. I. Diaz GOMEZ a J. A. CASTRO. Mechanism of Dimethylnitrosamine Metabolism and Activation in Rats2. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* [online]. 1978, **61**(5), 1285–1289 [vid. 2023-04-03]. ISSN 1460-2105, 0027-8874. Dostupné z: doi:10.1093/jnci/61.5.1285
- [13] PONTING, David J., Krista L. DOBO, Michelle O. KENYON a Amit S. KALGUTKAR. Strategies for Assessing Acceptable Intakes for Novel N-Nitrosamines Derived from Active Pharmaceutical Ingredients. *Journal of Medicinal Chemistry* [online]. 2022, **65**(23), 15584–15607. ISSN 1520-4804. Dostupné z: doi:10.1021/acs.jmedchem.2c01498
- [14] LI, Yupeng a Stephen S. HECHT. Metabolic Activation and DNA Interactions of Carcinogenic N-Nitrosamines to Which Humans Are Commonly Exposed. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2022, **23**(9), 4559 [vid. 2023-04-03]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms23094559
- [15] STREETER, A. J., R. W. NIMS, P. R. SHEFFELS, Y. H. HEUR, C. S. YANG, B. A. MICO, C. T. GOMBAR a L. K. KEEFER. Metabolic denitrosation of N-nitrosodimethylamine in vivo in the rat. *Cancer Research*. 1990, **50**(4), 1144–1150. ISSN 0008-5472.
- [16] MARGISON, G. P., J. M. MARGISON a R. MONTESANO. Accumulation of O6-methylguanine in non-target-tissue deoxyribonucleic acid during chronic administration of dimethylnitrosamine. *The Biochemical Journal* [online]. 1977, **165**(3), 463–468. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj1650463
- [17] VON HOFÉ, Eric, Paul KLEIHUES a Larry K. KEEFER. Extent of DNA 2-hydroxyethylation by N -nitrosomethylethylamine and N -nitrosodiethylamine *in vivo*. *Carcinogenesis* [online]. 1986, **7**(8), 1335–1337 [vid. 2023-04-03]. ISSN 0143-3334, 1460-2180. Dostupné z: doi:10.1093/carcin/7.8.1335
- [18] SINGER, B. In vivo formation and persistence of modified nucleosides resulting from alkylating agents. *Environmental Health Perspectives* [online]. 1985, **62**, 41–48. ISSN 0091-6765. Dostupné z: doi:10.1289/ehp.856241
- [19] THOMAS, Robert, Rachael E. TENNANT, Antonio Anax F. OLIVEIRA a David J. PONTING. What Makes a Potent Nitrosamine? Statistical Validation of Expert-Derived Structure–Activity Relationships. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 2022, **35**(11), 1997–2013 [vid. 2023-04-03]. ISSN 0893-228X, 1520-5010. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrestox.2c00199
- [20] HECHT, S. S. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 1998, **11**(6), 559–603. ISSN 0893-228X. Dostupné z: doi:10.1021/tx980005y
- [21] HANZLIK, Robert P. a Kah Hiing John LING. Active site dynamics of toluene hydroxylation by cytochrome P-450. *The Journal of Organic Chemistry* [online]. 1990, **55**(13), 3992–3997 [vid. 2023-04-03]. ISSN 0022-3263, 1520-6904. Dostupné z: doi:10.1021/jo00300a010
- [22] *Lhasa Carcinogenicity Database - Study Information* [online]. [vid. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://carcdb.lhasalimited.org/study-information/44506036>

- [23] *Lhasa Carcinogenicity Database - Study Information* [online]. [vid. 2023-06-24]. Dostupné z: <https://carcdb.lhasalimited.org/study-information/44726028>
- [24] *Lhasa Carcinogenicity Database - Study Information* [online]. [vid. 2023-06-21]. Dostupné z: <https://carcdb.lhasalimited.org/study-information/44385071>
- [25] *Lhasa Carcinogenicity Database - Study Information* [online]. [vid. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://carcdb.lhasalimited.org/study-information/44726062>
- [26] *Lhasa Carcinogenicity Database - Study Information* [online]. [vid. 2023-06-25]. Dostupné z: <https://carcdb.lhasalimited.org/study-information/44506716>
- [27] BLANKSBY, Stephen J. a G. Barney ELLISON. Bond Dissociation Energies of Organic Molecules. *Accounts of Chemical Research* [online]. 2003, **36**(4), 255–263 [vid. 2023-04-03]. ISSN 0001-4842, 1520-4898. Dostupné z: doi:10.1021/ar020230d
- [28] REMYA, Geetha S. a Cherumuttathu H. SURESH. Quantification and classification of substituent effects in organic chemistry: a theoretical molecular electrostatic potential study. *Physical Chemistry Chemical Physics* [online]. 2016, **18**(30), 20615–20626 [vid. 2023-04-03]. ISSN 1463-9076, 1463-9084. Dostupné z: doi:10.1039/C6CP02936A
- [29] *nitrosamines-emea-h-a53-1490-assessment-report_en.pdf* [online]. [vid. 2023-05-24]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/referral/nitrosamines-emea-h-a53-1490-assessment-report_en.pdf
- [30] M7(R1) Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals To Limit Potential Carcinogenic Risk Guidance for Industry. 2018.
- [31] DOBO, Krista L., Michelle O. KENYON, Olivier DIRAT, Maria ENGEL, Andrew FLEETWOOD, Matthew MARTIN, Susan MATTANO, Alyssa MUSSO, James Christopher MCWILLIAMS, Alexandros PAPANIKOLAOU, Patricia PARRIS, Jessica WHRITENOUR, Shu YU a Amit S. KALGUTKAR. Practical and Science-Based Strategy for Establishing Acceptable Intakes for Drug Product *N*-Nitrosamine Impurities. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 2022, **35**(3), 475–489 [vid. 2023-04-27]. ISSN 0893-228X, 1520-5010. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrestox.1c00369
- [32] CHAKRAVARTI, Suman. Computational Prediction of Metabolic α -Carbon Hydroxylation Potential of *N*-Nitrosamines: Overcoming Data Limitations for Carcinogenicity Assessment. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 2023 [vid. 2023-06-13]. ISSN 0893-228X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrestox.3c00083
- [33] Mutagenicity of *N*-nitrosopiperidines with *Salmonella typhimurium*/microsomal activation system. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* [online]. 1977, **56**(2), 131–145 [vid. 2023-06-11]. ISSN 0027-5107. Dostupné z: doi:10.1016/0027-5107(77)90201-9
- [34] PUBCHEM. *N*-Nitrosopiperidine [online]. [vid. 2023-05-24]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7526>
- [35] *1-Nitrosopiperidine* | *C5H10N2O* | *ChemSpider* [online]. [vid. 2023-06-12]. Dostupné z: <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.7245.html?rid=5ece81c1-1707-47d0-baf6-ecb050c3b311#acdLabsTab>

- [36] *N-NITROSOPIPERIDINE---Chemical Information Search* [online]. [vid. 2023-05-24]. Dostupné z: https://www.chemicalbook.com/ProductList_en.aspx?kwd=1-nitrosopiperidine
- [37] GRAY, R., R. PETO, P. BRANTOM a P. GRASSO. Chronic nitrosamine ingestion in 1040 rodents: the effect of the choice of nitrosamine, the species studied, and the age of starting exposure. *Cancer Research*. 1991, **51**(23 Pt 2), 6470–6491. ISSN 0008-5472.
- [38] EISENBRAND, G., M. HABS, D. SCHMÄHL a R. PREUSSMANN. Carcinogenicity of N-nitroso-3-hydroxypiperidine and dose-response study with N-nitrosopiperidine in rats. *IARC scientific publications*. 1980, (31), 657–666. ISSN 0300-5038.
- [39] PUBCHEM. *Nitrosopiperidinol* [online]. [vid. 2023-05-25]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/41471>
- [40] *Nitrosopiperidinol | C5H10N2O2 | ChemSpider* [online]. [vid. 2023-05-25]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.37839.html?rid=b535511c-5d21-4fba-aaa-3e9979785b03>
- [41] *N-nitroso-4-hydroxypiperidine CAS#: 55556-93-9* [online]. [vid. 2023-05-25]. Dostupné z: https://www.chemicalbook.com/ProductChemicalPropertiesCB81320453_EN.htm
- [42] PUBCHEM. *2-Methylnitrosopiperidine* [online]. [vid. 2023-06-03]. Dostupné z: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/23677>
- [43] *2-Methyl-1-nitrosopiperidine | C6H12N2O | ChemSpider* [online]. [vid. 2023-06-03]. Dostupné z: <https://www.chemspider.com/Chemical-Structure.22139.html?rid=39f03ac1-f0a8-4c78-ab09-fe7a81ae5850>
- [44] *2-METHYL-N-NITROSOPIPERIDINE---Chemical Information Search* [online]. [vid. 2023-06-03]. Dostupné z: https://www.chemicalbook.com/ProductList_En.aspx?kwd=2-Methylnitrosopiperidine
- [45] *Lhasa Carcinogenicity Database - Study Information* [online]. [vid. 2023-06-21]. Dostupné z: <https://carcdb.lhasalimited.org/study-information/44483358>
- [46] *Lhasa Carcinogenicity Database - Study Information* [online]. [vid. 2023-06-21]. Dostupné z: <https://carcdb.lhasalimited.org/study-information/44548176>
- [47] WIESSLER, M. a D. SCHMÄHL. [The carcinogenic action of n-nitroso-compounds. Second communication. s (plus) and r(minus)-n-nitroso-2-methyl-piperidine (author's transl)]. *Zeitschrift Fur Krebsforschung Und Klinische Onkologie. Cancer Research and Clinical Oncology* [online]. 1973, **79**(2), 118–122. ISSN 0084-5353. Dostupné z: [doi:10.1007/BF00284387](https://doi.org/10.1007/BF00284387)