

INHIBIČNÍ VLIV CLOMIFENU NA BIOSYNTÉZU MASTNÝCH KYSELIN A STEROLŮ

T. ŘEZANKA, M. PODOJIL

Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha

Je popsána kvalitativní i kvantitativní inhibice produkce sterolů a mastných kyselin clomifenem* u zelené řasy *Chlorella kessleri* a kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. U sterolů jsou inhibovány demetylace steroidních kruhů v polohách 4 a 14 a přesun dvojnás vazby z polohy 8 do polohy 7. U mastných kyselin je inhibována elongace uhlíkatého řetězce nad 18 atomů uhlíku a desaturace za tvorby polyenových kyselin. Je diskutován vztah mezi antiestrogenní aktivitou clomifenu u člověka a předpokládanou změnou složení sterolů a mastných kyselin.

ných určitým inhibitorem je sumarizován v tabulce 1 a obrázku 1.

Studie o regulaci metabolismu lipidů clomifenem a dalšími inhibitory jsou u savců ojedinělé.

Předložená práce sleduje a hodnotí kvalitativní a kvantitativní změny ve složení lipidů mikroorganismů po inhibici clomifenem a upozorňuje na možnost ovlivnění metabolismu lipidů i při terapeutickém podávání clomifenu.

POKUSNÁ ČÁST

Řasa *Chlorella kessleri* byla kultivována autotrofně v trubkovém kultivátoru s koncentrací clomifenu 3 mg/L¹, kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* v laboratorním 2 L fermentoru LF 2 s koncentrací clomifenu 10 mg/L.²

V obou kultivacích byla suspenze odcentrifugována a jednotlivé izolované frakce lipidů (mastné kyseliny a steroly) ve formě derivátů (metylestery, popř. acetyáty) byly děleny a identifikovány plynovou chromatografií — hmotovou spektrometrií (GC-MS) na přístroji Hewlett-Packard 5995 B (CA, USA) s kapilárními kolonami.³⁻⁵

Tab. 1. Přehled biotransformací sterolů v závislosti na typu inhibitoru

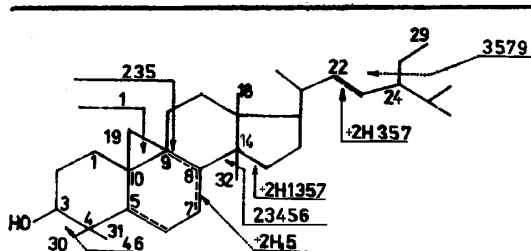
Inhibitor*	Biotransformace	Literatura
Tridemorph (1)**	inhibice štěpení dvojnás vazby 9 (19) inhibice redukce dvojnás vazby 14	16) 17)
Nystatin (2)	inhibice přesunu dvojnás vazby z polohy 8 do polohy 7; inhibice štěpení vazby 14 (32)	18)
AY-9944 (3)	inhibice přesunu dvojnás vazby z polohy 8 do polohy 7; redukce dvojnás vazby 14 a 22; štěpení vazby 14 (32); metylace na C ₁₄	3)
Triadimefon (4)	inhibice štěpení vazby 4 (30) a 14 (32)	19)
Triparanol (5)	inhibice přesunu dvojnás vazby z polohy 8 do polohy 7; redukce dvojnás vazby 7; 14; 22; štěpení dvojnás vazby 14 (32);	2, 8)
Triadimenol (6)	inhibice štěpení vazby 4 (30) a 14 (30)	19)
Triarimol (7)	inhibice redukce dvojnás vazby 14 a 22; metylace na C ₁₄	20)
Amo 1618 (8)	inhibice cyklizace skvalenu	4)
25-azaacykloartanol (9)	inhibice metylace na C ₁₄	21)

* číslo v závorce značí látku, která inhibuje reakci (viz obr. 1);

** inhibice štěpení cyklopropanového kruhu

* Clomifen (1-*p*/2-diethylaminoethoxy-fenyl-1,2-difenyl-2-chloreten) účinná složka přípravku Gravosan (Špofa) s antiestrogenní aktivitou.

Mastné kyseliny byly identifikovány jako metylestery,⁷⁾ polohy dvojnás vazeb byly určeny podle Anderssona.⁸⁾ Steroly byly identifikovány z hodnot retenčních časů⁹⁾ a hmotových spekter.¹⁰⁾



VÝSLEDKY

Z tabulek 2 a 3 vyplývá, že se po aplikaci clomifenu u *S. cerevisiae* a *C. kessleri* podstatně zvýšil obsah nižších mastných kyselin (do C_{16} včetně), na-

Tab. 2. Vliv clomifenu na obsah mastných kyselin u *Saccharomyces cerevisiae*

Kyselina	Kultivace	
	s clomifenem	bez clomifenu
12 : 0	2,3	1,1
14 : 0	4,1	2,7
15 : 0	1,3	0,5
16 : 1	2,1	0,2
16 : 0	4,9	5,8
9-16 : 1	64,2	55,4
18 : 0	1,8	3,2
9-18 : 1	17,2	27,9
9,12-18 : 2	tr	0,7
20 : 0	0,1	0,1
22 : 0	tr	0,4
24 : 0	tr	tr
26 : 0	tr	1,1
2-OH-20 : 0	tr	tr
2-OH-22 : 0	tr	tr
2-OH-24 : 0	tr	0,2
2-OH-26 : 0	tr	0,7

Číslo před pomlčkou udává polohu dvojné vazby; 2-OH – kyselina 2-hydroxyalkánová

Tab. 3. Účinek clomifenu na obsah mastných kyselin v faze *C. kessleri* (%)

Mastné kyseliny	Kultivace	
	s clomifenem	bez clomifenu
14 : 0	0,4	7,2
5-14 : 1	2,4	1,0
5,8,11-14 : 3	0,8	0,0
16 : 0	20,7	30,6
7-16 : 1	3,9	6,6
7,10-16 : 2	0,0	0,7
4,7,10-16 : 3	0,0	1,3
17 : 0*	8,1	6,4
18 : 0	3,3	8,8
9-18 : 1	41,8	7,0
9,12-18 : 2	1,7	19,6
9,12,16-18 : 3	0,2	7,6
20 : 0	0,0	0,4
Minoritní a neidentifikované	6,7	0,8
	0,0	3,0

* 2-Metylhexadekanová kyselina

opak byl zaznamenán pronikavý úbytek C_{18} kyselin, především linolové kyseliny. Nejzajímavějším jevem je vymizení mastných kyselin nad C_{20} včetně 2-hydroxykyselin.

Jak je patrné z tabulky 4, u *S. cerevisiae* kultivované s clomifenem bylo identifikováno 12 sterolů, jeden byl identifikován pouze částečně a dva steroly nebyly identifikovány; u kontroly bylo identifikováno všech sedm nalezených sterolů.

Tab. 4. Účinek clomifenu na zastoupení sterolů u *Saccharomyces cerevisiae* (%)

Sterol	Kultivace	
	s clomifenem	bez clomifenu
Cholesta-8,24-dienol	6,0	4,6
4 α -Metylocholest-8-enol	2,1	1,4
Cholesta-7,24-dienol	1,5	1,4
Ergosta-5,7,23-trienol	56,9	64,4
Ergosta-5,7,23,24(28)-tetraenol	12,3	21,4
Ergost-8(14)-enol	6,4	2,7
Ergostanol	0,9	—
Ergosta-8,24(28)-dienol	8,8	2,1
Ergosta-7,24(28)-dienol	2,0	—
Neznámý*	0,5	—
4 α -Ergost-7-enol	0,7	—
4 α -14-Dimetylergosta-8,24-dienol	0,6	—
24-Metyllanost-8-enol	0,4	—
Neidentifikováno	1,0	—

* 4-Metylergostadienol, s jednou vazbou v kruších a druhou v postranním řetězci

U inhibované fasy *C. kessleri* bylo nalezeno 15 sterolů (tab. 5), z nichž tři nebyly identifikovány. Pomocí SIM (single ion monitoring) byla u neidentifikovaných sterolů určena relativní molekulární hmot-

Tab. 5. Účinek clomifenu na obsah sterolů v faze *C. kessleri* (%)

Steroly	Kultivace	
	s clomifenem	bez clomifenu
Ergost-8-en	5,7	0,0
Ergost-8(14)-en	8,6	4,3
Ergost-7-en	20,6	50,3
Ergosta-8,22-dienol	2,8	0,0
Ergosta-8(14),22-dienol	3,4	0,0
Ergosta-7,22-dien-3-ol	0,0	2,8
Ergosta-5,22-dien-3-ol	4,1	0,0
14 α -Metyl-8,22-dienol	5,6	0,0
Stigmast-8-enol	12,9	0,0
Stigmast-8(14)-enol	2,9	9,3
Stigmast-7-enol	15,4	23,8
Stigmast-5-enol	3,3	0,0
Stigmast-7,24(28)-dienol	10,5	0,0
Neznámý A	0,0	6,8
Neznámý B*	2,1	0,0
Neznámý C*	1,4	0,0
Neznámý D*	0,4	0,0

* Zjištěno SIM metodou (single ion monitoring)

nost, a tím i počet uhlíků a dvojných vazeb. Proti tomu u neinhibované řady bylo nalezeno šest sterolů, z toho jeden nebyl identifikován.

DISKUSE

Jak je z výsledkové části zřejmé, je možno pozorovat při přidání clomifenu ke kvasince *S. cerevisiae* kvalitativní i kvantitativní změnu sterolů a mastných kyselin. Množství sterolů se snižuje, množství mastných kyselin zůstává zachováno. Pro jednotlivé mastné kyseliny je zřejmý nárůst obsahu kyselin C_{16} a nižších, naopak dochází k prudkému snížení obsahu kyselin C_{18} a vyšších. Též hydroxykyseliny vymizely.

Vzhledem k nalezenému poklesu tvorby sterolů a zachování produkce mastných kyselin předpokládáme, že clomifen inhibuje biosyntetickou dráhu, odvětvující se od dráhy polyketidové. Proto se domníváme, že clomifen se zřetelem ke způsobu biosyntézy nenasycených a dlouhých mastných kyselin inhibuje jak dehydrogenaci kyselin, tak také jejich elongaci nad C_{16} . Je zde ještě alternativa ovlivnění obsahu mastných kyselin clomifem změnou stavby buněčných stěn způsobenou přítomností dalších sterolů.

Hlavním efektem clomifenu u sterolů *S. cerevisiae* je inhibice odštěpení metylů v polohách C_4 a C_{14} , přesun dvojně vazby z polohy 8 do polohy 7 a vznik konjugovaného systému 5, 7. Tyto údaje jsou ve shodě s literaturou^{11,12}) u jiných inhibitorů. Naopak dochází ke stimulaci zavedení dvojně vazby do polohy 8/14 a redukci na plně nasycený skelet. Není ovlivňována alkylace na C_{24} a dvojně vazby 24/28/. Regulací složení sterolů clomifem se podstatně zvýšil obsah sterolů, které jsou prekurzory posledního stupně jejich biosyntézy.

U mastných kyselin ze zelené řasy nebyla ovlivněna jejich celková tvorba (tab. 3), i když Frasinell¹³) popisuje až desetnásobný váhový přrůstek po aplikaci triarimolu u *C. sorokiniana*. Clomifen podstatně zvýšil obsah olejové kyseliny, u palmitové a palmitolejové kyseliny nedošlo k výrazné změně, polyenové kyseliny prakticky vymizely. Kyseliny nad C_{18} , které byly hojně zastoupeny u neinhibované řasy,⁷) nebyly vůbec nalezeny. V tabulce 5 je uvedeno procentové zastoupení sterolových struktur u řasy kultivované s clomifemem a bez něho. Hlavním efektem clomifenu je: 1. inhibice odštěpení metylu v poloze 14, přesun dvojně vazby z polohy 8 do polohy 7 steroidního skeletu; 2. inhibice odštěpení metylů buď v polohách 4 (kvasinka), nebo 14 (řasa); 3. zachování sekundární metylace postranního řetězce S-adenosylmethioninem. Všechny uvedené reakce zpomalují odbourání výchozích látek (lanosterolu u kvasinek, cykloartenolu u řas) na konečný produkt metabolické dráhy, tj. sterol mající osmiuhlíkatý postranní řetězec, žádnou metylovou skupinu v polohách 4 a 14 a dvojnou vazbu v poloze 5. Takovým steroidem je u savců např. cholesterol.

Gravosan Spofa, jehož aktivním principem je clomifen, inhibuje tlumivý vliv estrogenů na hypofýzu. To vede ke stimulaci hypotalamo-hypofyzárního systému, který reaguje zvýšenou produkcí gonadotropinu. Z těchto důvodů má Gravosan silné antiestrogenní účinky a používá se k provokaci ovulace u sterility.¹²)

Mechanismus účinku clomifenu na savce byl experimentálně sledován pouze v rovině antiestrogenní aktivity.¹⁴)

Změny v metabolismu lipidů vyvolané clomifemem u mikroorganismů lze převést i na savce.¹⁵) K žádanému antiestrogennímu účinku clomifenu mohou přistoupit kvalitativní a kvantitativní změny sterolů a mastných kyselin, které by zasluhovaly detailní experimentální studium a posouzení nalezených údajů. Lze předpokládat, že antiestrogenní působení clomifenu zasahuje do metabolismu při biosyntéze cholesterolu a mohla by být ovlivněna nejen jeho tvorba, ale i tvorba dalších steroidních látek, jako gestagenů a žlučových kyselin, jejichž prekurzorem je cholesterol.

Změny v obsahu mastných kyselin po inhibici clomifemem by mohly iniciovat vznik odlišných fosfolipidů.

Выводы

Резанка Т., Подоил М.: Влияние кломифена на подавление биосинтеза липидов

В работе описано качественное и количественное торможение продукции стеролов и жирных кислот кломифеном у зеленой водоросли *Chlorella kessleri* и дрожжевых грибов *Saccharomyces cerevisiae*. У стеролов ингибируется деметилизация стероидных колец в положениях 4 и 14 и смещение двойной связи из положения 8 до положения 7. У жирных кислот ингибируется удлинение водородной цепи свыше 18 атомов и десатурация при образовании полиеновых кислот. Обсуждается отношение между антиэстрогенной активностью кломифена у человека и предполагаемым изменением состава стеролов и жирных кислот.

Б.

Ceskoslov. Farm., 35, 1986, No. 1, c. 10–13

Summary

Rezanka T., Podojil M.: Effect of Clomifen on the Inhibition of Lipid Biosynthesis

The paper describes both the qualitative and quantitative inhibition of the production of sterols and fatty acids with clomifen in the green alga *Chlorella kessleri* and the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In sterols, demethylations of the steroid rings in positions 4 and 14 and the shift of the double bond from position 8 to position 7 are inhibited. In fatty acids, elongation of the carbon chain over 18 carbon atoms and desaturation with the formation of polyenic acids are inhibited. The relationship between the antiestrogenic activity of clomifen in man and the presumed change in the composition of sterols and fatty acids is discussed.

Má

Ceskoslov. Farm., 35, 1986, No. 1, p. 10–13

Zusammenfassung

Rezanka T., Podojil M.: Der Einfluss von Clomifen auf die Inhibierung der Biosynthese von Lipiden

In dieser Studie wurde qualitative und quantitative Inhibierung der Produktion von Sterolen und Fettsäuren mit Clomifen bei der grünen Alge *Chlorella kessleri* und bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben. Bei den Sterolen werden Demethylierungen der Steroidringe in den Stellungen 4 und 14 und die Verschiebung der Doppelbindung aus der Stellung 8 in die Stellung 7 inhibiert.

Bei den Fettsäuren wird die Verlängerung der Kohlenstoffkette über 18 Kohlenstoffatome und die Desaturierung unter

Bildung der Polyensäuren inhibiert. Die Beziehung zwischen der Antiöstrogenaktivität von Clomifen bei Menschen und der vorausgesetzten Änderung der Zusammensetzung von Sterolen und Fettsäuren wird diskutiert.

Z. S.

Českoslov. Farm., 35, 1986, No. 1, p. 10–13

LITERATURA

1. Rattray, J. B. M., Schibeci, A., Kidby, D. K.: *Bacteriol. Rev.* 39, 197 (1975).
2. Chan, J. T., Patterson, G. W., Dutky, S. R., Cohen, C. F.: *Plant Physiol.* 53, 244 (1974).
3. Patterson, G. W., Doyle, P. J., Dickson, L. G., Cahn, J. T.: *Lipids* 9, 587 (1973).
4. Douglas, T. J., Paleg, L. G.: *J. Experiment. Bot.* 32, 59 (1981).
5. Řezanka, T., Livaneký K., Podojil, M.: *J. Basic Microbiol.* 25, 521 (1985).
6. Řezanka, T., Doležalová, L., Vyhánek, O., Novotný, Č.: *Folia Microbiol.* 30, 501 (1985).
7. Řezanka, T., Vokoun, J., Slavišek, J., Podojil, M.: *J. Chromatogr.* 268, 71 (1983).
8. Andersson, B. A.: *Prog. Chem. Fats Lipids* 16, 279 (1978).
9. Itoh, T., Tani, H., Fukushima, K., Tamura, T., Matsumoto, T.: *J. Chromatogr.* 234, 65 (1982).
10. Knights, B. A.: *J. Gas Chromatogr.* 5, 173 (1967).
11. Campagnoni, C., Holmlund, C. E., Whittaker, N.: *Arch. Biochem. Biophys.* 184, 555 (1977).
12. Hosokawa, G., Patterson, G. W., Lusby, W. R.: *Lipids* 19, 449 (1984).
13. Wenke, M., Hynie, S., Mráz, M.: *Farmakologie*, str. 442, Avicenum, Praha 1977.
14. Roy, S., Breenblatt, R. B., Mahesh, V. B.: *Acta Endocrinol.* 47, 657 (1964).
15. Blohm, T. R., Kariya, T., Laughlin, M.: *Arch. Biochem.* 85, 250 (1959).
16. Kerkenaar, A., Uchlyma, M., Versluis, G. G.: *Pesticide Biochem. Physiol.* 16, 97 (1981).
17. Schmitt, K., Benveniste, P., Leroux, P.: *Phytochemistry* 20, 2153 (1981a).
18. Pierce, A. M., Pierce, J. H. D., Unrau, A. M., Oehlschlager, A. C.: *Can. Biochem.* 56, 135 (1978).
19. Burkenauer, H., Röhner, E.: *Pesticide Biochem. Physiol.* 15, 58 (1981).
20. Frasinel, C., Patterson, G. W., Dutky, S. R.: *Phytochemistry* 17, 1567 (1978).
21. Schmitt, K., Narula, A. S., Benveniste, P., Patier, A.: *Phytochemistry* 20, 197 (1981b).

PhDr. ing. Milošlav Podojil, CSc.,
Videňská 1083, 142 20 Praha 4 - Krč

Došlo dne 25. 3. 1985