

Štěpné produkty globinových aduktů v moči jako nový typ ukazatelů BET: příklady praktického využití



Mráz J.¹, Hanzlíková I.¹, Dušková Š.¹, Tvrdíková M.¹, Chrástecká H.¹,
Vajtrová R.¹, Linhart I.²



¹ SZÚ Praha
² VŠCHT Praha

Biomarkery v hygieně a toxikologii

- **Výchozí látky v moči nebo krvi** (řidčeji v jiném biologickém materiálu...)
- **Metabolity v moči**
- **Adukty s buněčnou DNA**
- **DNA adukty v moči**
- **Adukty s proteiny (globinem, albuminem)**
- **Změněné hladiny endogenních látek**
- **Cytogenetické biomarkery (CA, SCE, MN, etc.)**
- **Genotyp biotransformačních enzymů**

BM expozice

**BM biochemického/
biologického účinku**

BM vnímavosti

Biomarkery v hygieně a toxikologii

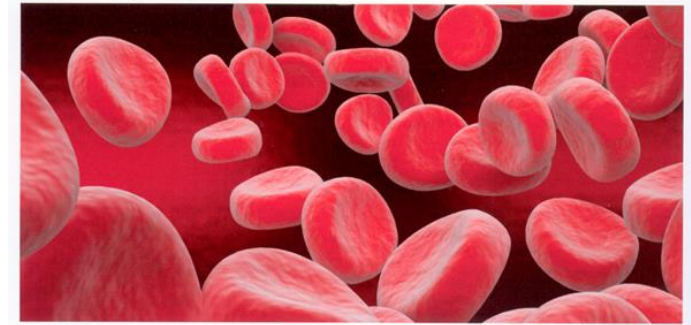
- **Výchozí látky v moči nebo krvi** (řidčeji v jiném biologickém materiálu...)
- **Metabolity v moči**
- **Adukty s buněčnou DNA**
- **DNA adukty v moči**
- **Adukty s proteiny (globinem, albuminem)**
- **Změněné hladiny endogenních látek**
- **Cytogenetické biomarkery (CA, SCE, MN, etc.)**
- **Genotyp biotransformačních enzymů**

BM expozice

**BM biochemického/
biologického účinku**

BM vnímavosti

Proč adukty s globinem?



- Snáze dostupné a měřitelné než adukty s DNA
- Dlouhodobá persistence v organismu po celou dobu života erythrocytů (u člověka ca. 125 dní)
- Dostupnost globinu v dostatečném množství (140 mg/ml krve)
- Zavedené analytické postupy
- Doporučené pro hodnocení expozice na pracovištích (biologické limity, BET)
- Použitelné pro alkylační činidla (např. epoxidy), arylaminy, isokyanáty, N,N-dimethylformamid
- Zakotveny v legislativě

**Co o globinových aduktech
ještě nevíme?**

Kam směřovat další výzkum?

**Další osud v organismu po ukončení
životnosti erythrocytů**



Pracovní hypotéza projektu IGA NT13401-4/2012

Po ukončení životnosti erythrocytu je globin s navázanými adukty odbourán proteolytickou degradací, při níž se uvolní:

- volné aminokyseliny, které (znovu) vstoupí do fyziologických metabolických cyklů
- degradační produkty ve formě aduktů s aminokyselinami nebo s peptidy (volné nebo dále metabolizované), které se vyloučí močí

ŽIVOTNÍ CYKLUS GLOBINOVÝCH ADUKTŮ

Expozice výchozí látce



(Metabolismus)

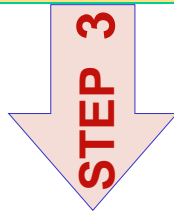
Transport aductotvorných sloučenin do erythrocytů
Tvorba globinových aduktů

Globinové adukty v erythrocytech



Odstranění a desintegrace erythrocytů
Hydrolytické štěpení globinových aduktů

Štěpné produkty (globinových aduktů) v krevním oběhu



(Metabolismus)

Vylučování ledvinami

Štěpné produkty v moči

Strategie výzkumu: *in vivo* experimenty na potkanech

- Přímé ip. podání výchozích látek *nebo*
- Transfúze chemicky modifikovaných erythrocytů (= inkubace erythrocytů s reaktivní aduktotvornou látkou a jejich podání do krevního oběhu potkanů-příjemců)



- Stanovení globinových aduktů v krvi
- Detekce, identifikace a stanovení štěpných produktů globinových aduktů v moči



Výchozí látka	Reaktivní činidlo	Vazebné místo v globinu			
		Val *	Cys	His	Lys
<i>N,N</i> -Dimethylformamid	Methylisokyanát (MIC)	+			+
Ethylenoxid	Ethylenoxid (EO)	+	+	+	
Styren	Styrenoxid (SO)	+	+	+	+
Akrylamid	Akrylamid (AA)	+	+	+	

* N-koncový Val

Studie na potkanech / Výsledky

- 1) Pro téměř všechny zkoumané globinové adukty byly nalezeny a identifikovány příslušné štěpné produkty v moči
- 2) Štěpné produkty byly močí vylučovány s vysokým (~ 40-100 % celkového množství globinových aduktů)
- 3) Kinetika vylučování štěpných produktů v moči odrážela rychlost odbourávání globinových aduktů v krvi

Další etapa výzkumu:

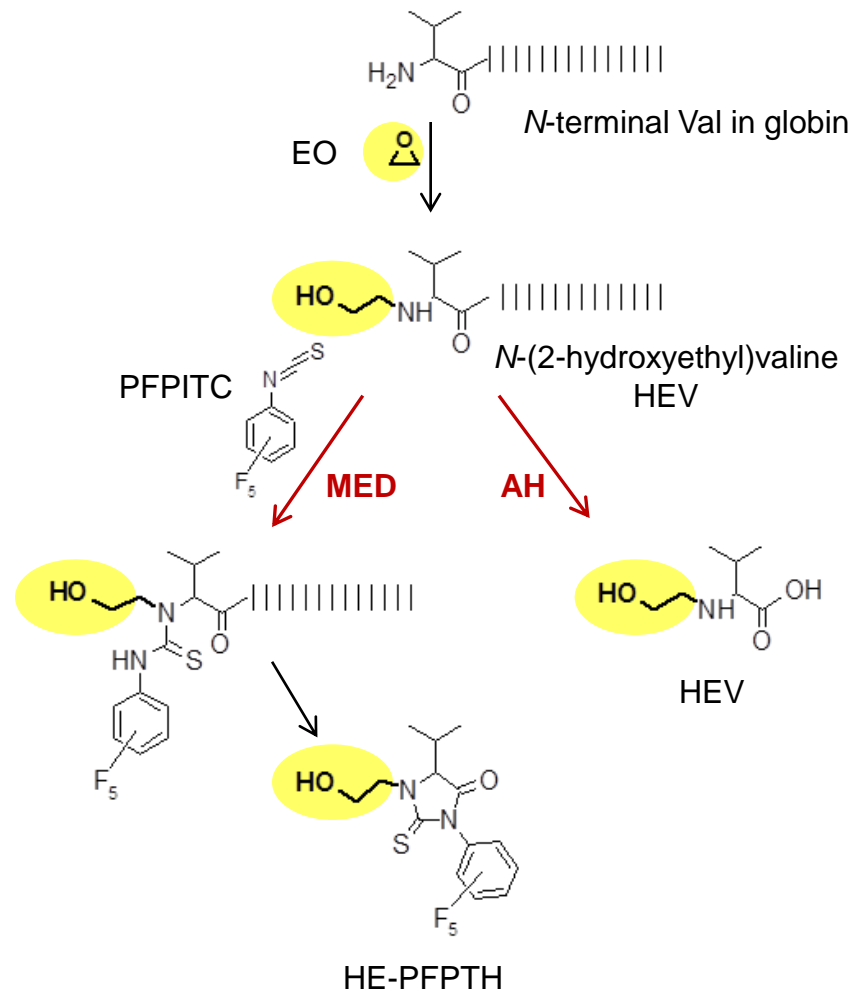
Studie na člověku

Ethylenoxid (EO)

- reaktivní plyn
- chemický meziprodukt
- sterilizační činidlo pro zdravotnický materiál
- karcinogen skupiny 1 (IARC)

Biologické monitorování EO

Stanovení *N*-(2-hydroxyethyl)valinu (HEV) v globinu



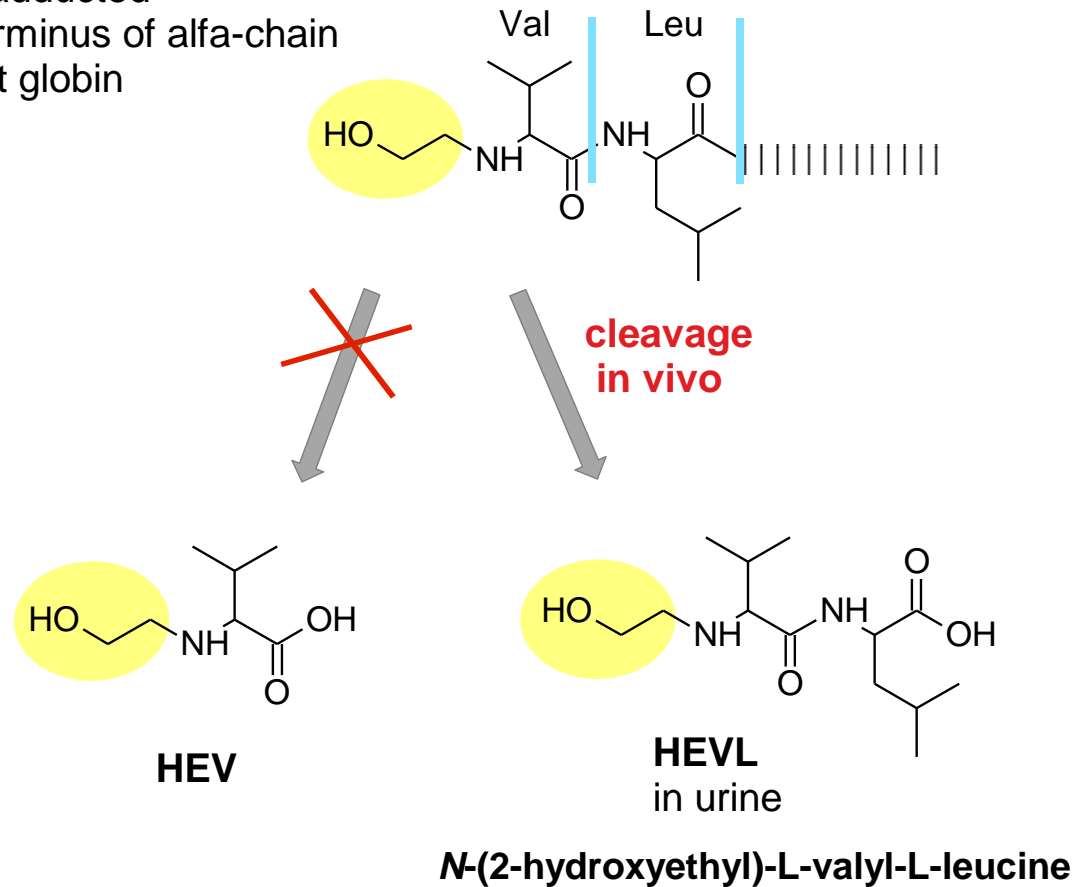
MED: modifikovaná Edmanova degradace

AH: totální kyselá hydrolýza

- Mráz J. et al. Toxicol. Lett. 298, 76-80 (2018)

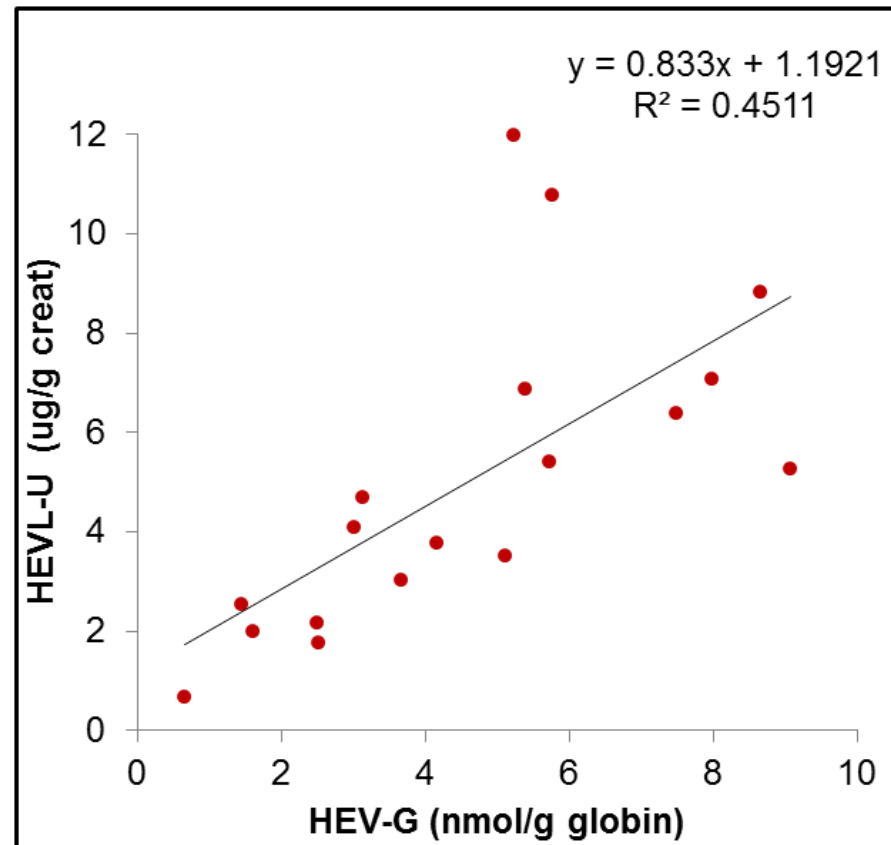
Vylučování štěpného produktu globinového aduktu EO v moči potkanů

EO-adducted
N-terminus of alfa-chain
of rat globin

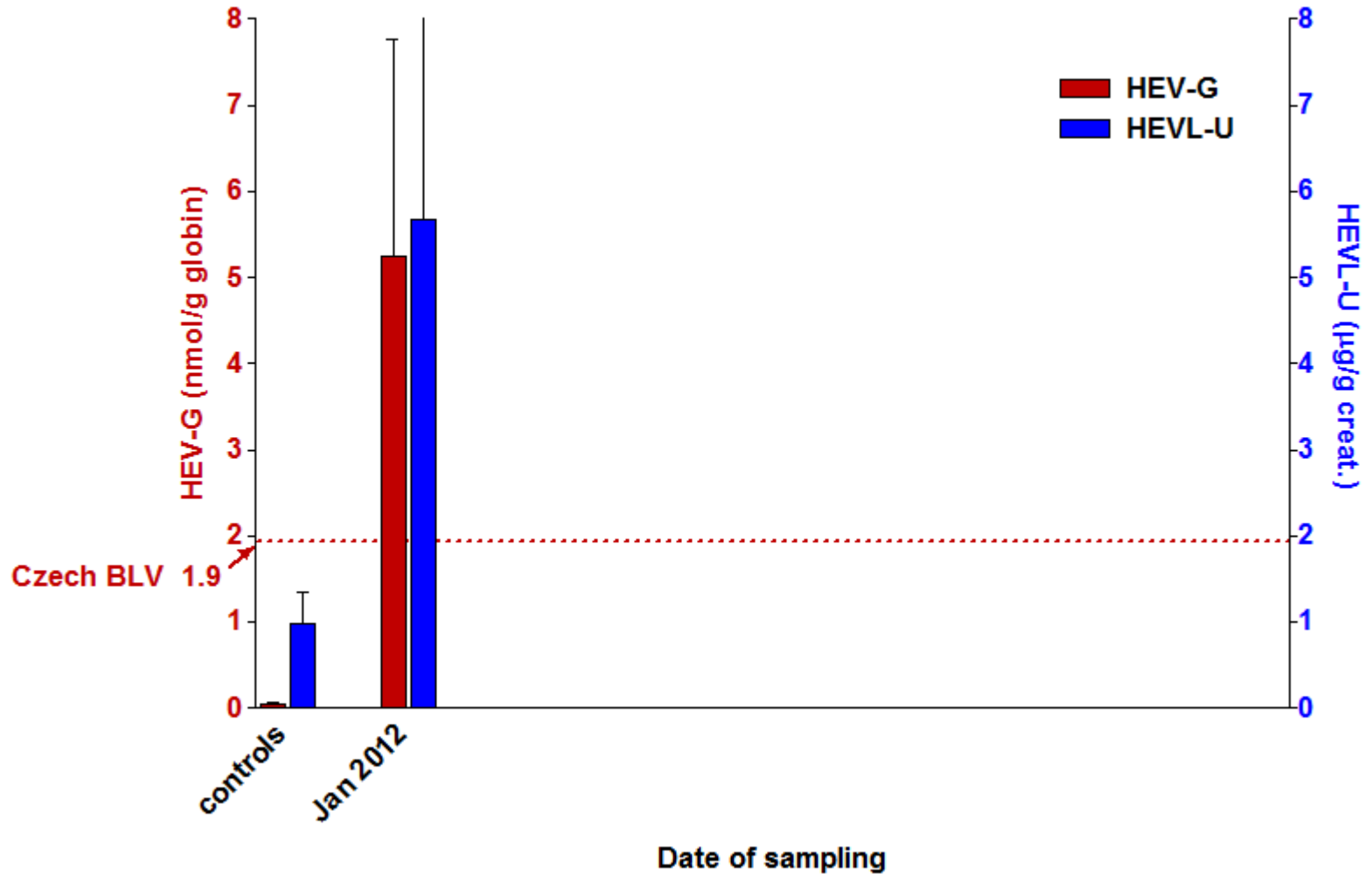


Dělníci exponovaní EO v průmyslové sterilizovně

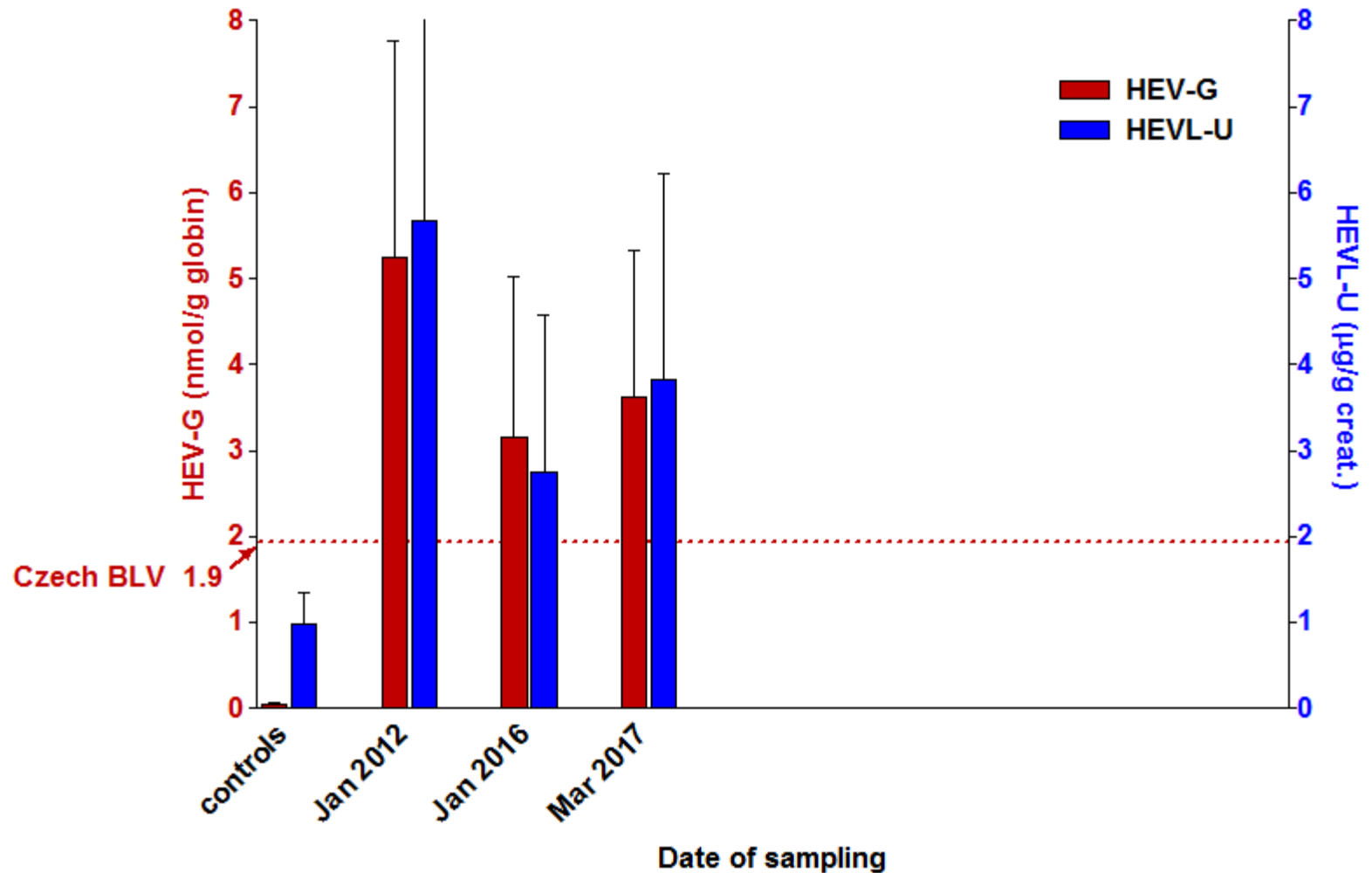
HEVL-U vs. HEV-G



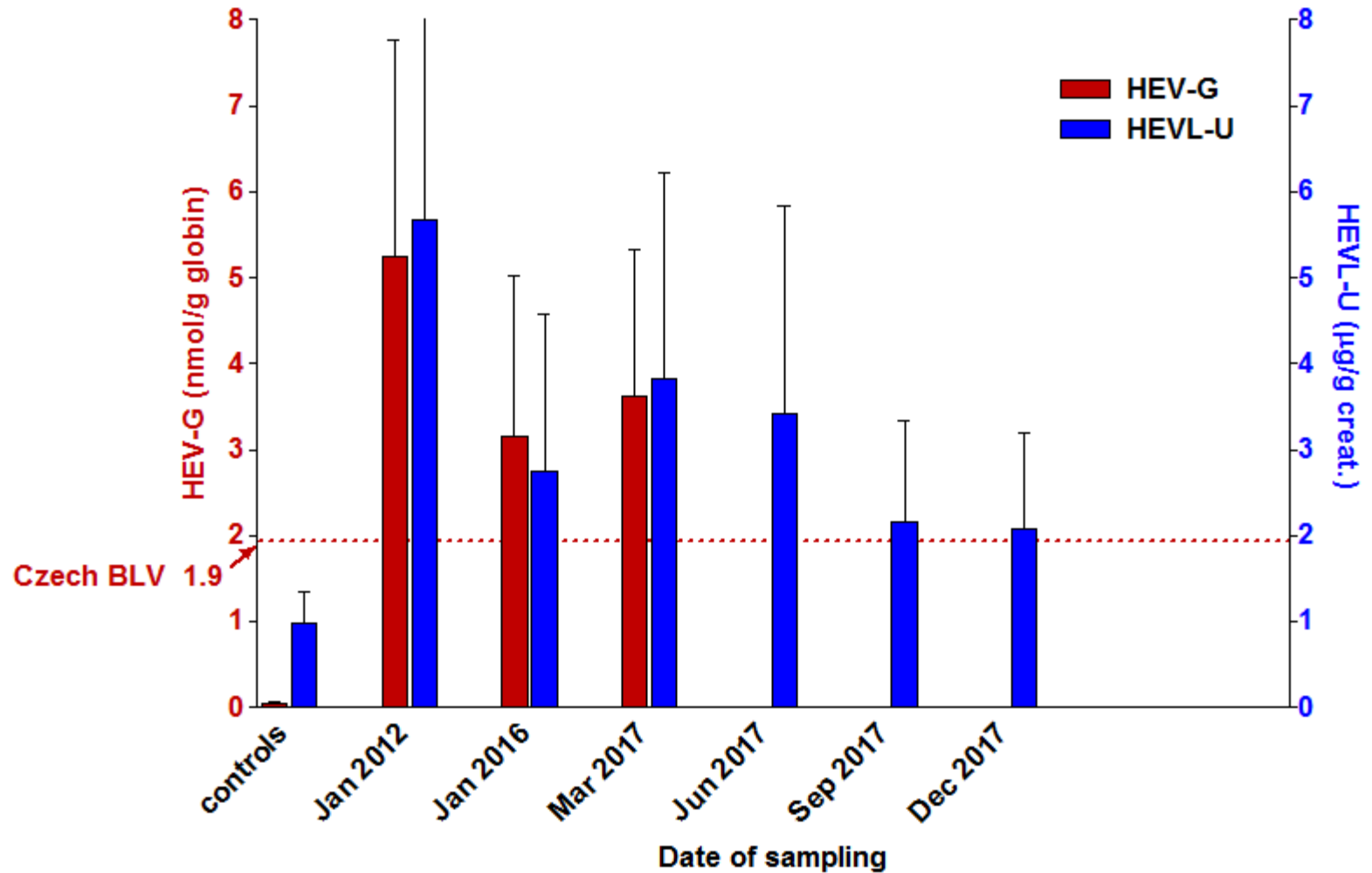
Biologické monitorování expozice EO v průmyslové sterilizovně Longitudinální studie (část 1)



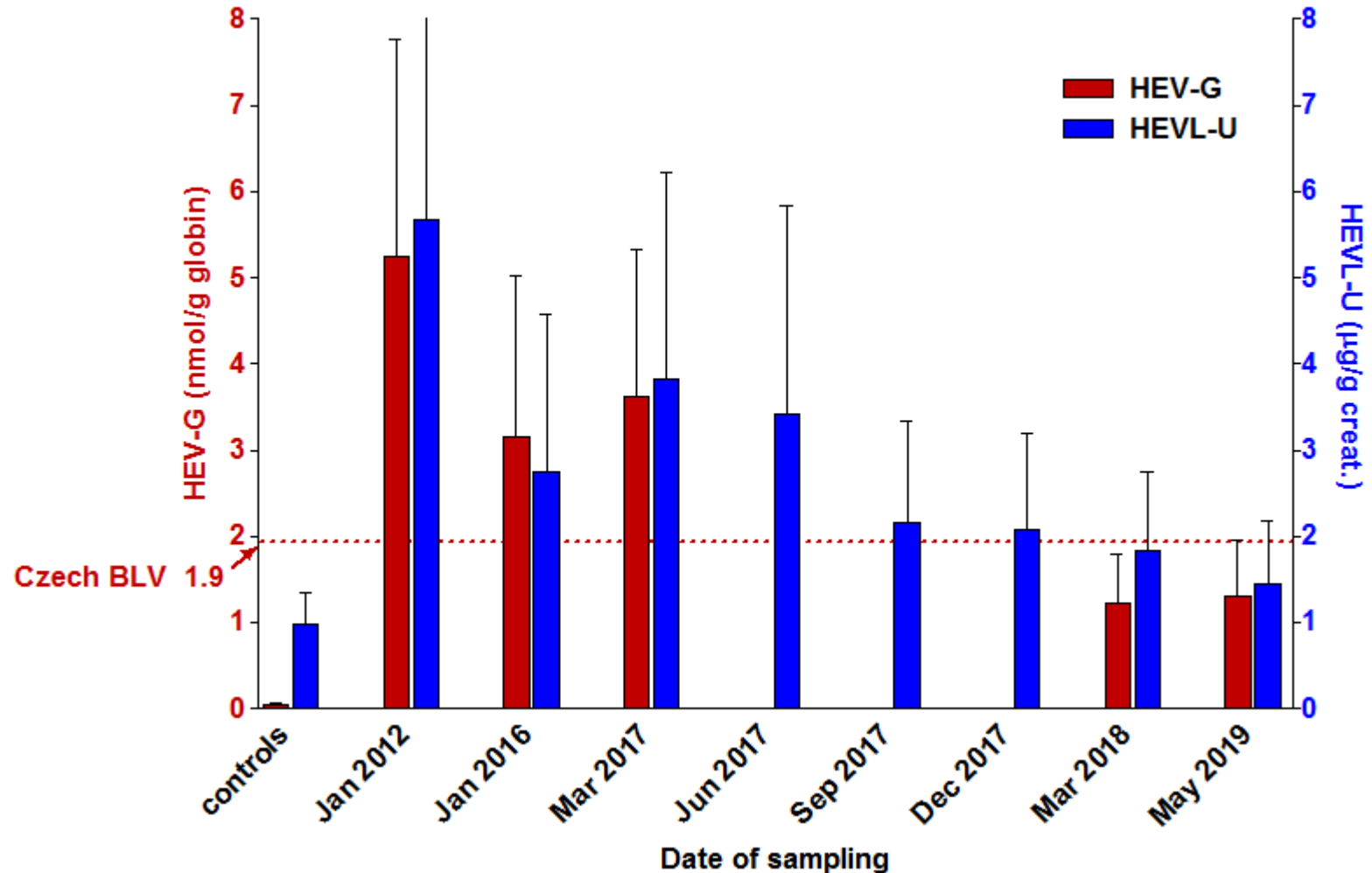
Biologické monitorování expozice EO v průmyslové sterilizovně Longitudinální studie (část 2)



Biologické monitorování expozice EO v průmyslové sterilizovně Longitudinální studie (část 3)



Biologické monitorování expozice EO v průmyslové sterilizovně Longitudinální studie (část 4)



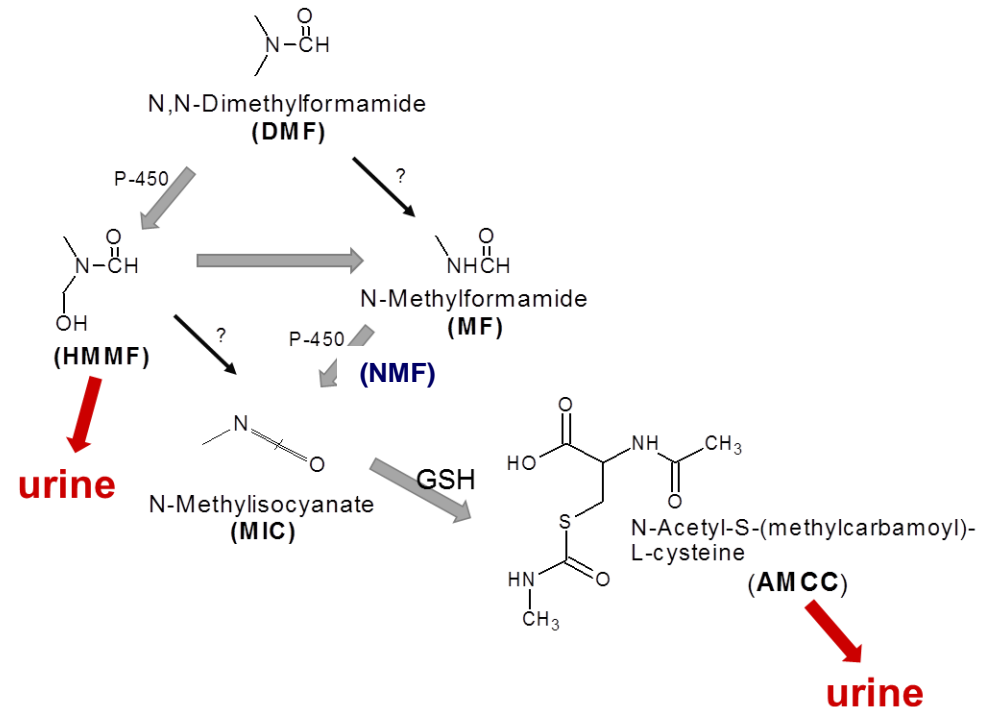
N,N-Dimethylformamid (DMF)

- organické rozpouštědlo pro polymerní materiály
- rozpustný ve vodě a většině organických rozpouštědel
- vysoká perkutánní absorpce

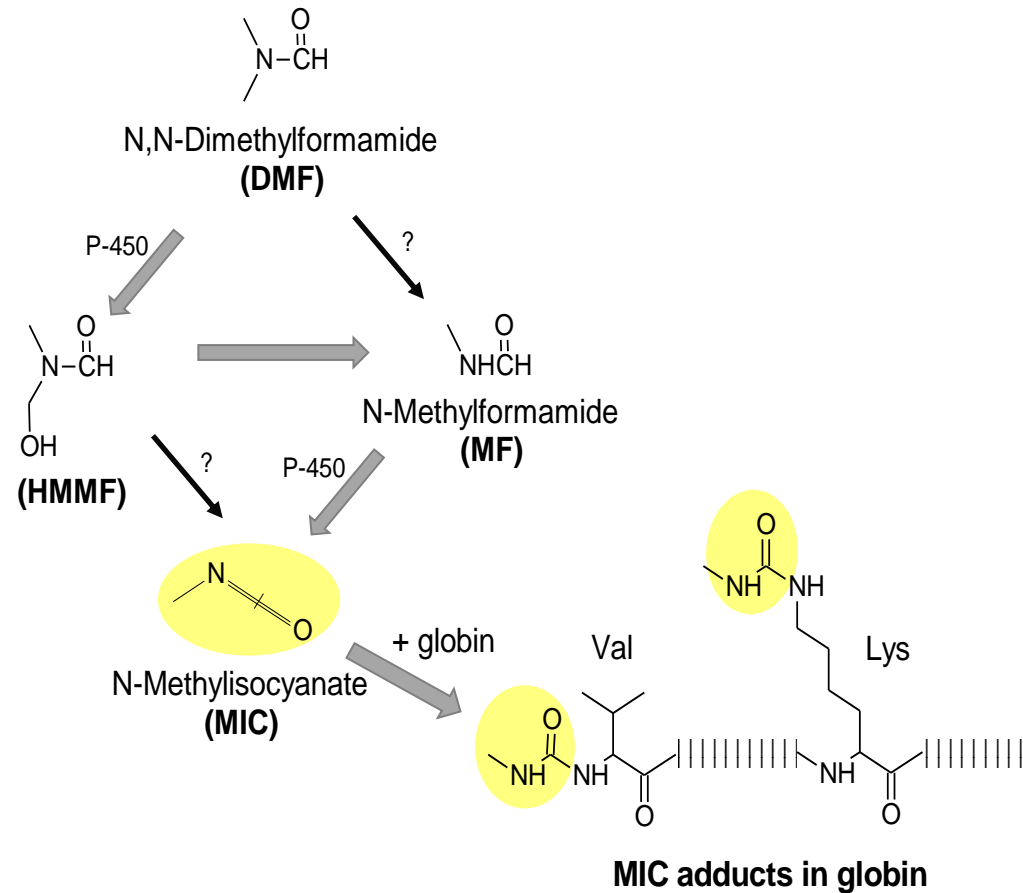
Biologické monitorování expozice DMF:

hlavní metabolity v moči

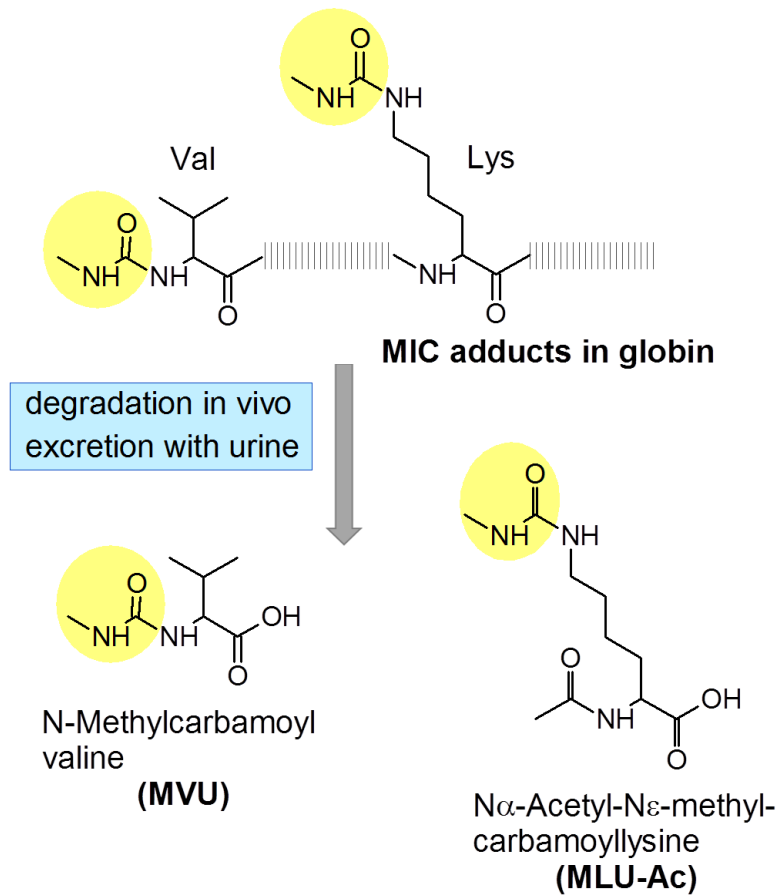
- N*-methylformamid (NMF)
- merkapturová kyselina AMCC



Biotransformace DMF u potkana a člověka Tvorba aduktů s globinem

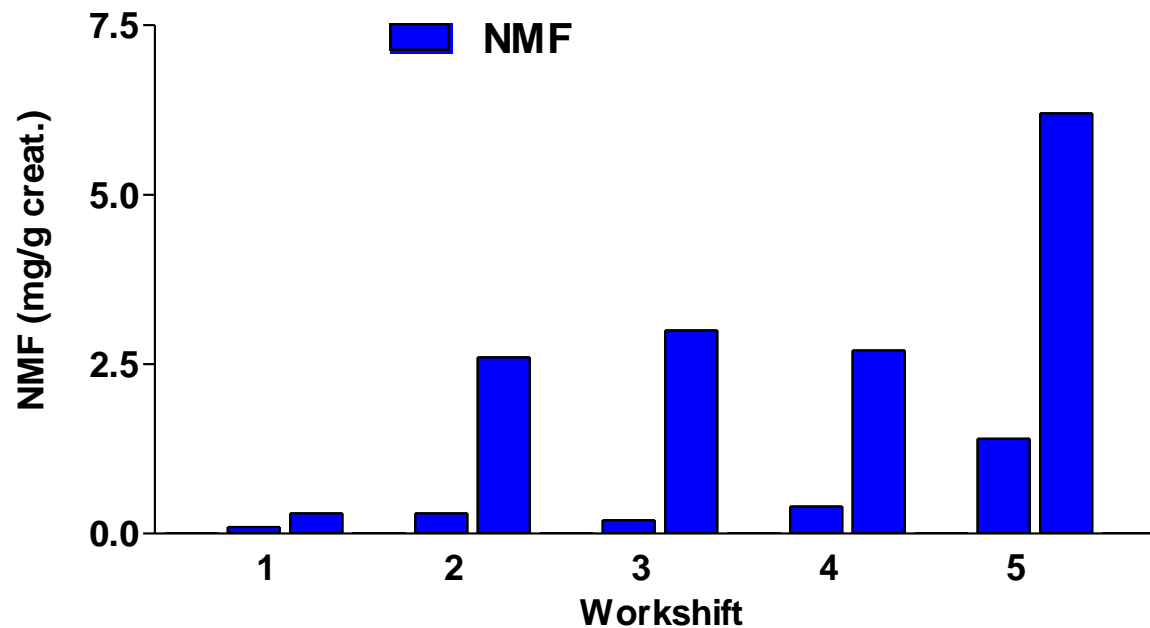


Biotransformace DMF u potkana Štěpné produkty globinových aduktů v moči



Profesionální expozice DMF (1 osoba) Vylučování NMF močí

předsměnové a posměnové vzorky moče v průběhu pracovního týdne

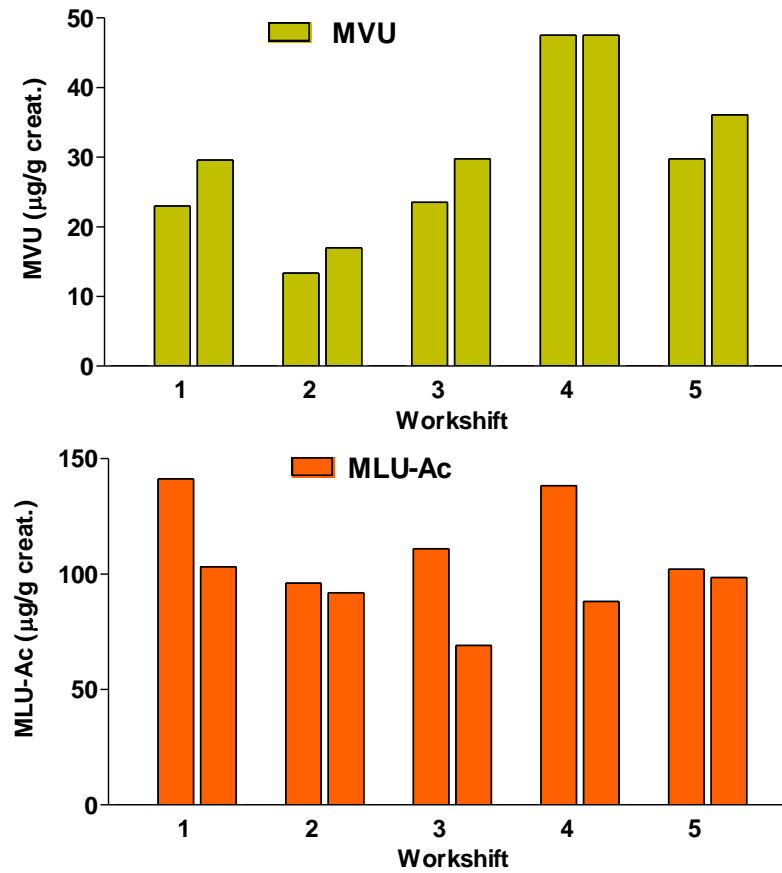


Poznámka:

NMF se z organismu vylučuje rychle (biologický poločas ~4 h), proto posměnové koncentrace NMF silně kolísají podle skutečných expozičních dávek v každém dni.

Profesionální expozice DMF (1 osoba) Vylučování štěpných produktů globinových aduktů v moči

předsměnové a posměnové vzorky moče v průběhu pracovního týdne



Poznámka:

Vylučování MVU a MLU-Ac odráží kumulativní expozici DMF během uplynulých 4 měsíců, proto není ovlivněno kolísáním expozic v průběhu jednoho pracovního týdne.

Souhrn

Štěpné produkty (globinových aduktů) v moči představují novou kategorii biomarkerů, spojující tři hlavní přednosti:

- Specifitu pro výchozí látku
- Monitorování dlouhodobých kumulativních expozií
- **Neinvazivní odběr vzorku**

Poděkování

Agentura zdravotnického výzkumu MZ ČR
Grant NV19-09-00378

Ministerstvo zdravotnictví ČR
Institucionální podpora
Státní zdravotní ústav (SZÚ), IN 75010330

European Regional Development Fund (ERDF)
IOP Reg. No. CZ.1.06/3.2.01/11.08435