

Degradační produkty proteinových aduktů v moči jako nový typ biomarkerů v toxikologii



**J. Mráz, I. Linhart *, I. Hanzlíková, Š. Dušková,
L. Dabrowská, H. Chrástecká, E. Černá, K. Černá**

**Státní zdravotní ústav, Praha
* VŠCHT Praha**

TOXIKOLOGIE

nauka o interakcích škodlivých látek s živými organismy, jejich mechanismech, projevech a důsledcích

Hodnocení rozsahu expozice chem. látkám

stanovení v prostředí

biomarkery

Hodnocení biochemického/ biologického účinku chem. látek

fyziologické vyšetření

fyzické vyšetření

Biomarkery v toxikologii

Míra rozsahu interakce chemické látky s organismem:

- **biomarkery expozice**
- **biomarkery biochemického/biologického účinku**

Vnímovost organismu k poškození chemickou látkou:

- **biomarkery vnímavosti (susceptibility)**

**Využití biomarkerů expozice a biochemického/
biologického účinku při ochraně zdraví osob při práci:
biologické expoziční testy (BET)**

(Vyhláška č. 432/2003 → novela 107/2013)

Biomarkery v toxikologii

- Výchozí látky v biologickém materiálu (moč, krev, vydechovaný vzduch, sliny, vlasy...)
- Metabolity v biologickém materiálu (moč)
- Adukty s buněčnou DNA
- DNA adukty v moči
- Adukty s proteiny (globin, albumin)
- Změněné hladiny endogenních látek
- Cytogenetické biomarkery (CA, SCE, MN, etc.)
- Genotyp biotransformačních enzymů

BM expozice

BM biochemického/
biologického účinku

BM vnímavosti

Biomarkery v toxikologii

- Výchozí látky v biologickém materiálu (moč, krev, vydechovaný vzduch, sliny, vlasy...)
- Metabolity v biologickém materiálu (moč)
- **Adukty s buněčnou DNA**
- **DNA adukty v moči**
- **Adukty s proteiny (globin, albumin)**
- Změněné hladiny endogenních látek
- Cytogenetické biomarkery (CA, SCE, MN, etc.)
- Genotyp biotransformačních enzymů

BM expozice

BM biochemického/
biologického účinku

BM vnímavosti

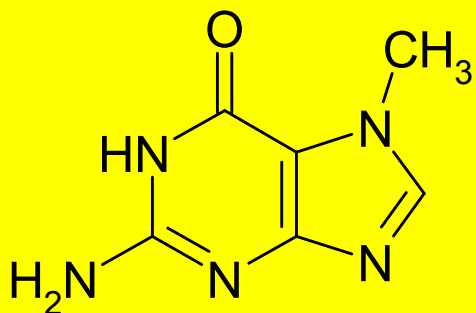


Adukty s buněčnou DNA:

- biomarkery efektivní dávky v cílové tkáni
- invasivní odběr vzorku (krve)
- pracná a složitá analýza

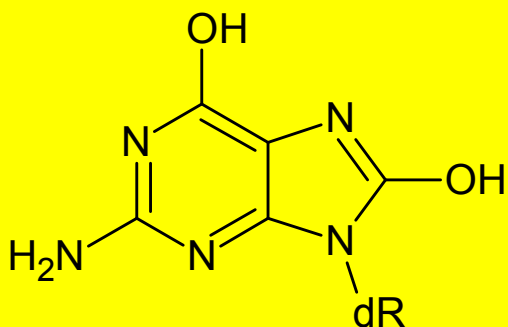
DNA adukty v moči:

- korelace s hladinami aduktů v buněčné DNA (?)
- neinvasivní odběr vzorku (moče)
- Instrumentálně náročná analýza



- Krüger a Salomon, Hoppe-Seyler's Zeitschrift für physiologische Chemie, 1898
- izolace 3.4 g N7-MeGua z 10 000 l lidské moče

N7-methylguanin (první identifikovaný DNA adukt v moči)



8-OH-2'-deoxyguanosen (marker oxidativního stresu)

Projekt MŠMT (2008-2011)

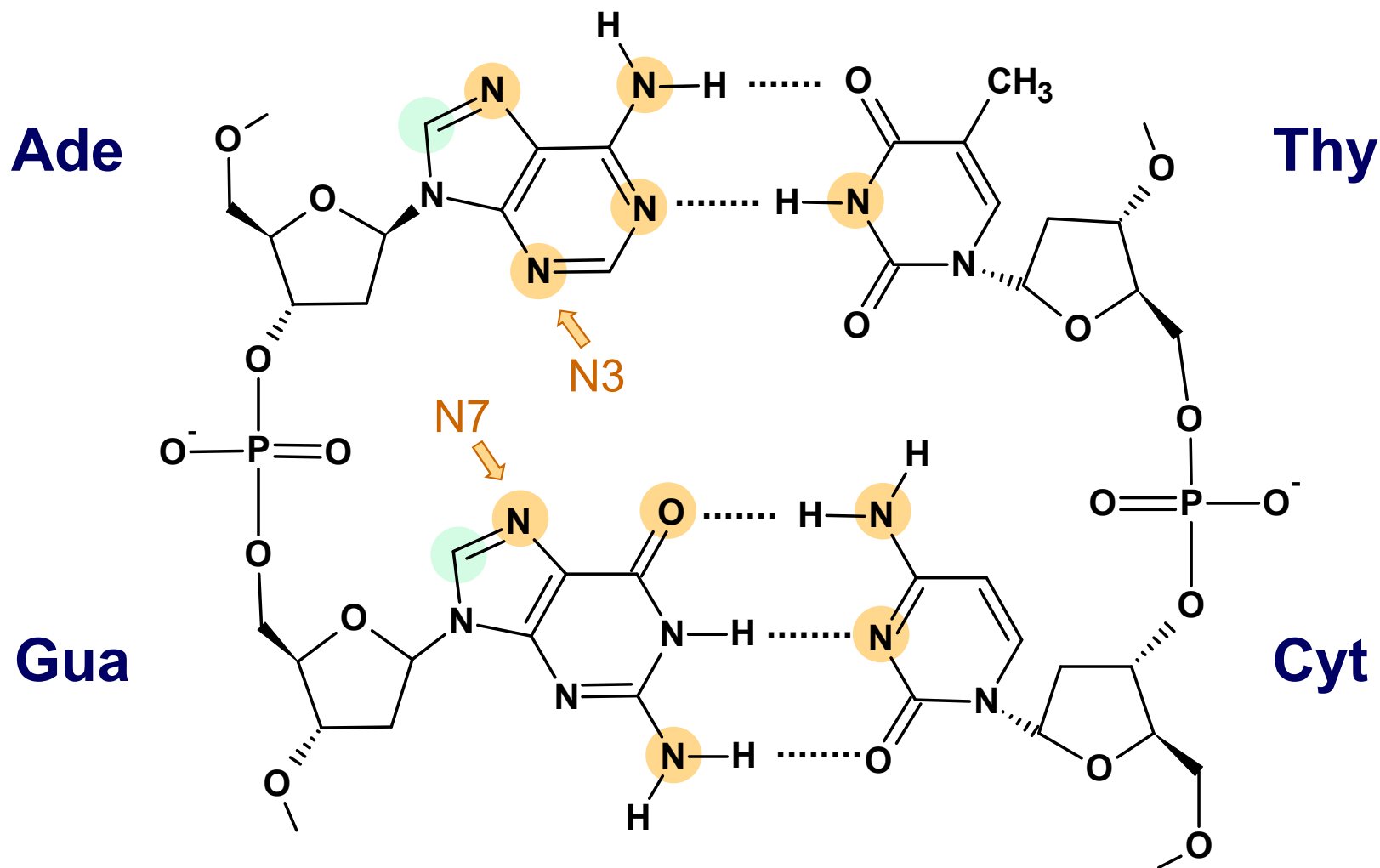
Nová strategie biologického monitorování expozice mutagenům a karcinogenům (řešitel I.Linhart, VŠCHT Praha)

Cíl

Identifikovat v moči DNA adukty toxikologicky významných chemických látek jako potenciální biomarkery jejich expozice/účinku

- styren
- benzen
- 3-aminobenzanthron

Hlavní vazebná místa pro chemické látky v DNA



- pro elektrofilní látky
- pro volné radikály

Výsledky a závěry

■ styren

Myš: po vysokých inhalačních expozicích v moči snadno stanoveny 4 DNA adukty

Člověk (profesionální expozice): nalezen jediný DNA adukt, výtěžek v moči řádově nižší než u myši, nález jen u některých osob, nízká specifita → málo vyhovující biomarker

■ benzen

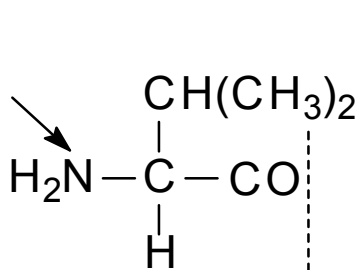
Myš: po vysokých inhalačních expozicích v moči stanoven jediný DNA adukt, nález jen u některých zvířat

Člověk (profesionální expozice): žádný hledaný DNA adukt nenalezen

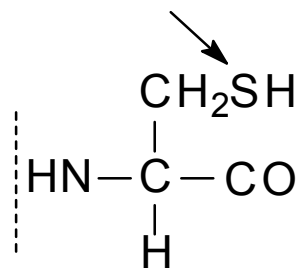
Proč adukty s globinem?

- **Vhodná náhrada za adukty s DNA**
- **Dlouhodobá persistence v organismu po celou dobu života erythrocytů (u člověka ca. 125 dní)**
- **Dostupnost 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**

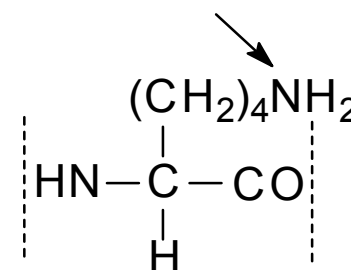
Nucleophilic sites in globin



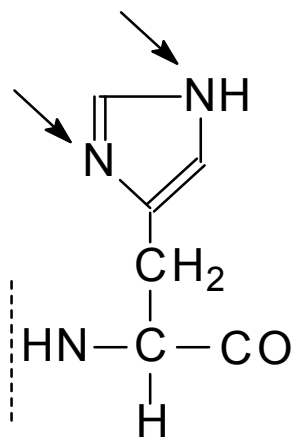
Val



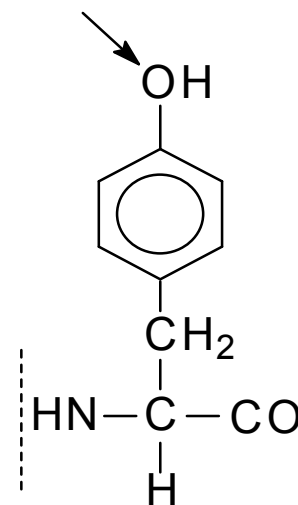
Cys



Lys

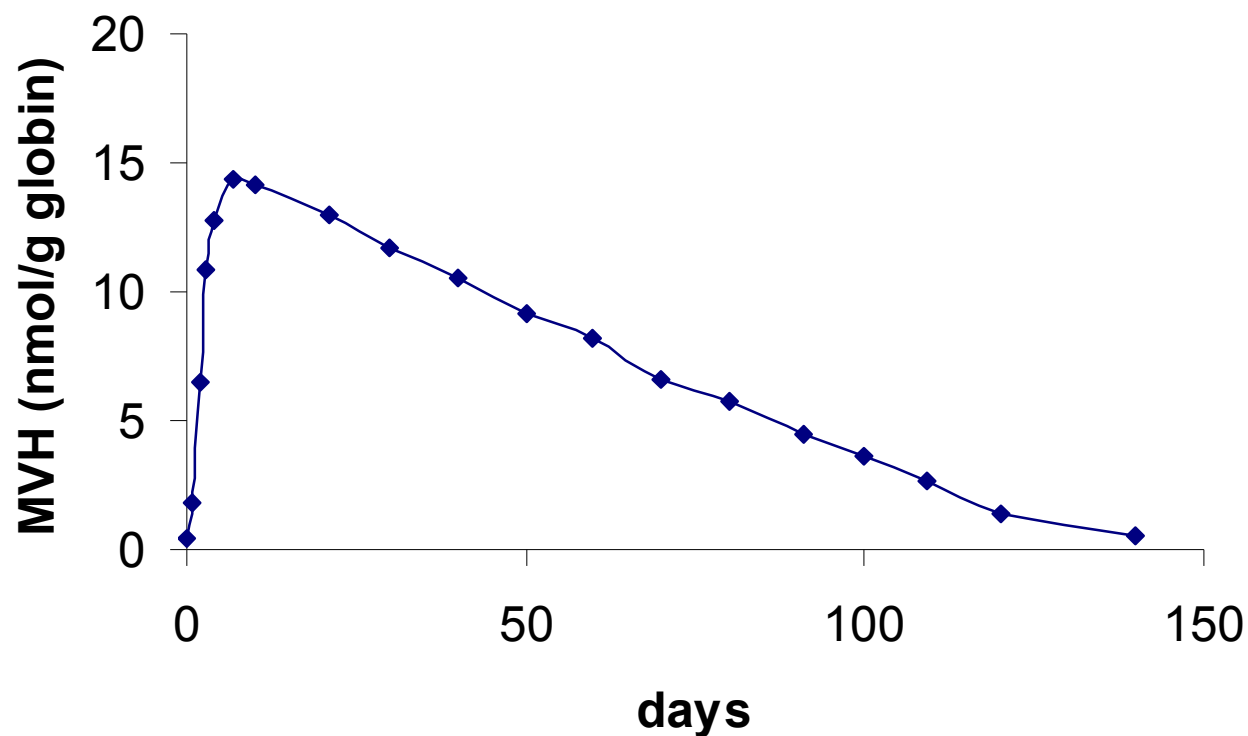


His



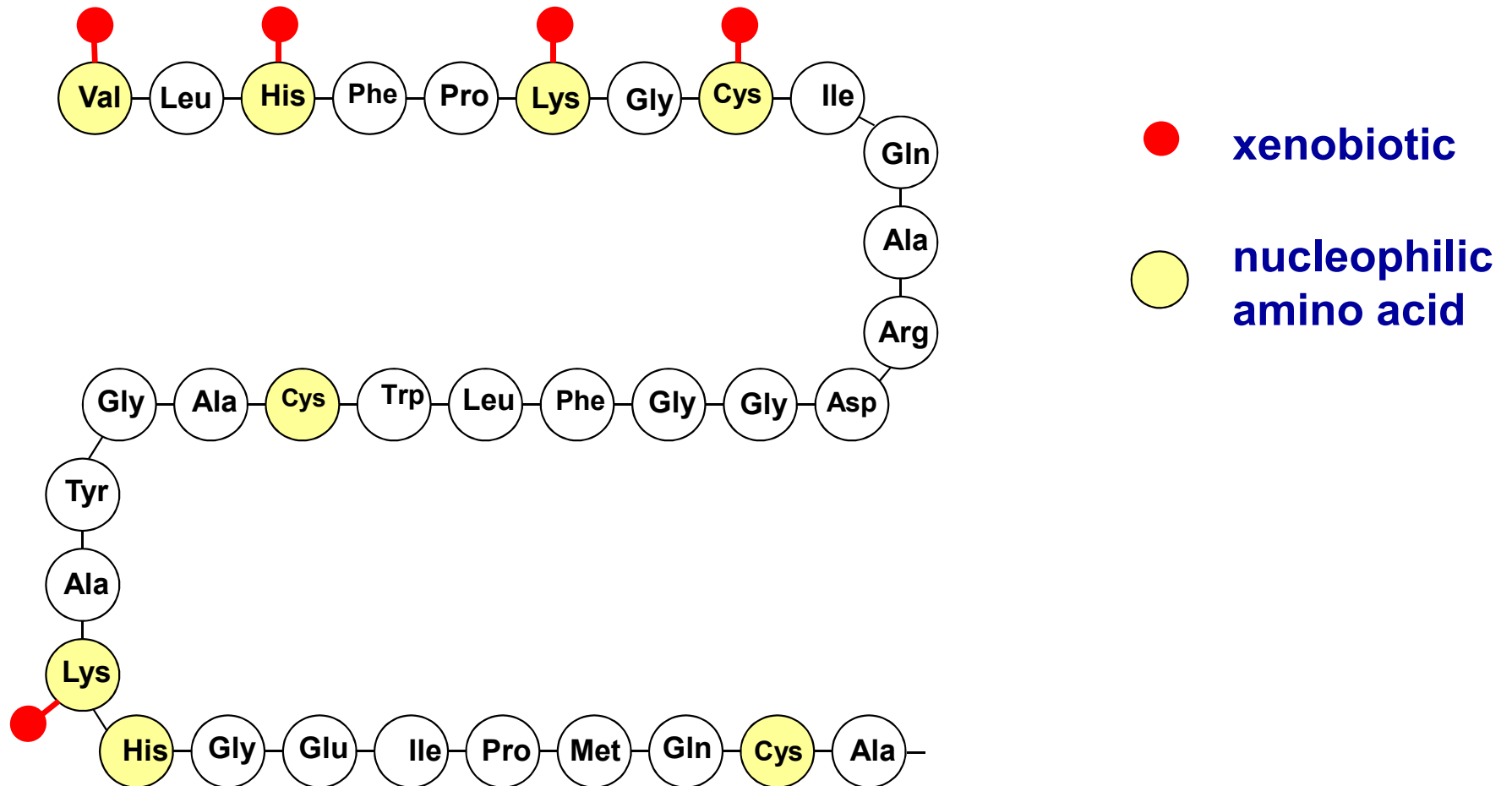
Tyr

Toxicokinetics of globin adducts in humans



N-methylcarbamoylvaline level in globin following single percutaneous exposure to DMF in human volunteers

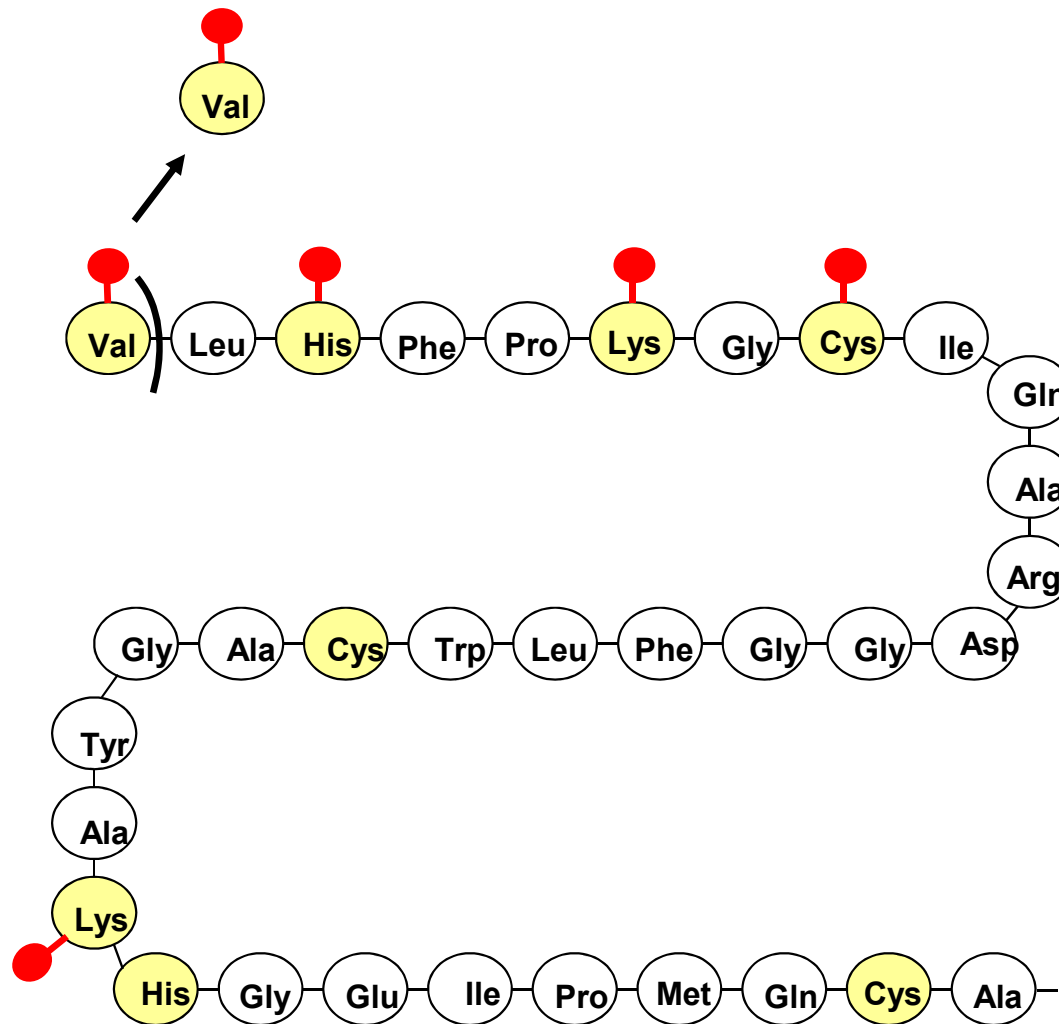
Globin adducts: structure



Globin adducts: methods of analysis (1)

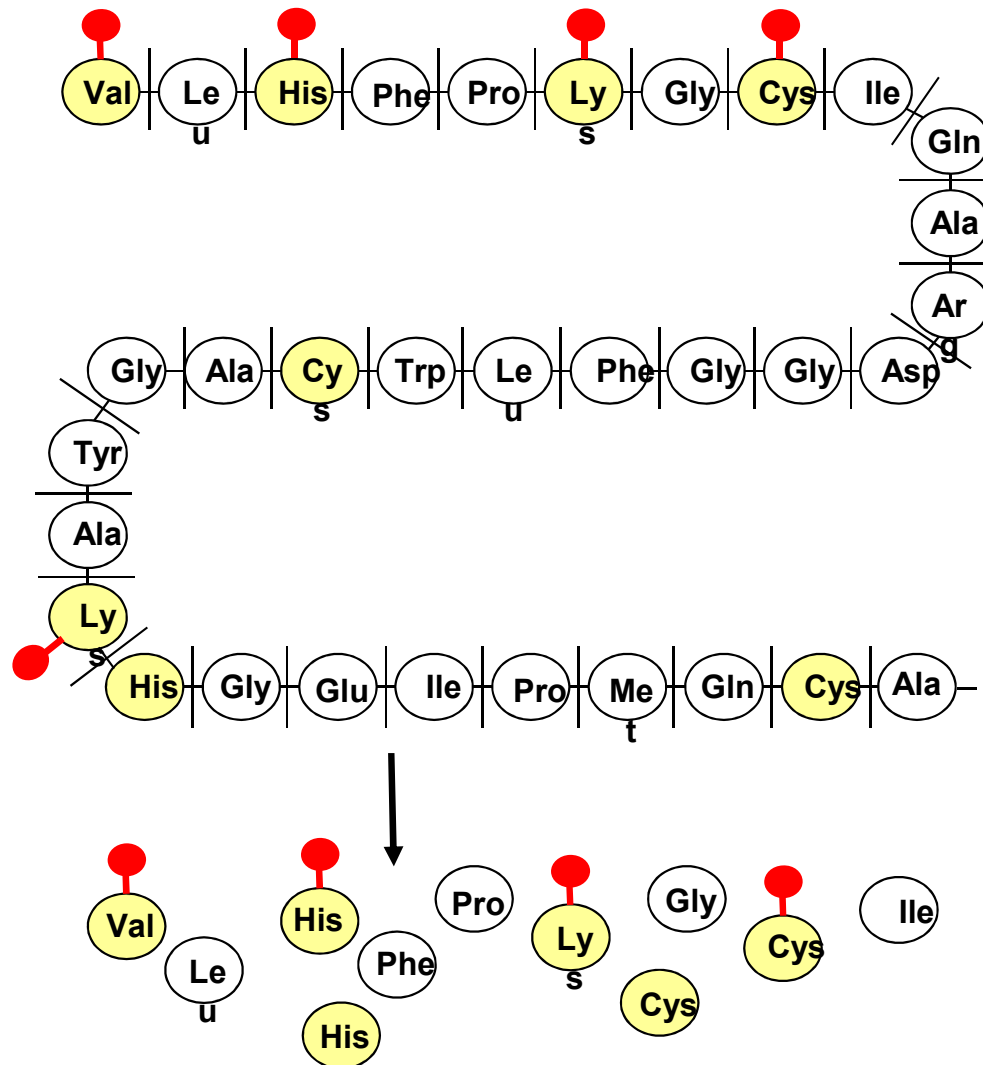
Edman degradation (for adducts of isocyanates)

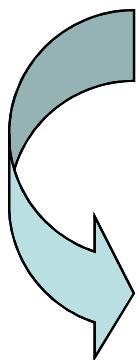
Modified Edman degradation (for adducts of alkylating agents)



Globin adducts: methods of analysis (2)

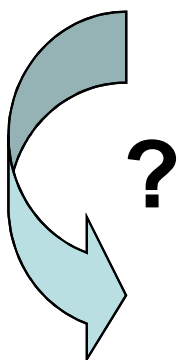
Total hydrolysis (acidic or enzymatic with pronase)





Adukty s buněčnou DNA

Produkty odbourávání v moči



Adukty s globinem

Produkty odbourávání v moči
(téměř žádné informace)

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
- volné aminokyselinové adukty, které se vyloučí močí

Modifikované aminokyseliny v moči

Modifikace endogenními procesy

Klinická medicína

- 3-methylhistidin: obnova/degradace kosterního svalstva
- prolyl-4-hydroxyprolin: obnova/degradace kostních proteinů (při osteoporóze)

Modifikace cizorodými látkami

Průmyslová toxikologie, hygiena: nevyužíváno

Výzkumný plán – Etapa 1

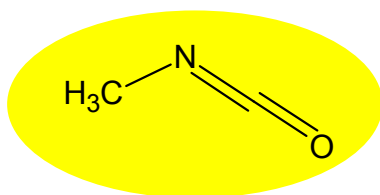
Studium vylučování aminokyselinových aduktů po jejich podání in vivo

- 1) Syntéza modelových aminokyselinových aduktů
- 2) Vývoj analytických postupů
- 3) Podání potkanům, sběr moči
- 4) Analýza moči: stanovení podaných látek a/nebo jejich (očekávaných) metabolitů; identifikace neočekávaných produktů

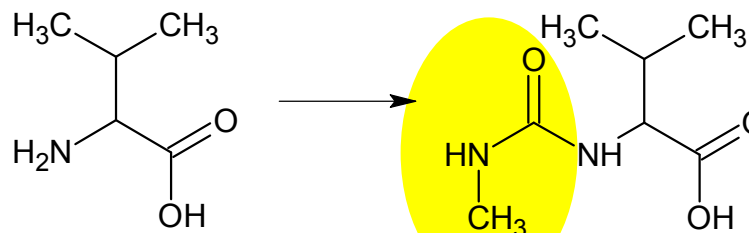
Amino acid adducts: model compounds

Precursor in vivo	Reactive species	Amino acid	Adduct
N,N-dimethyl-formamide	methyl-isocyanate	Val	N-methylcarbamoyl-Val
		Lys	N _ε -methylcarbamoyl-Lys
ethylene oxide	ethylene oxide	Val	N-(2-hydroxyethyl)-Val
		Cys	S-(2-hydroxyethyl)-Cys
acrylamide	acrylamide	Val	N-(2-amidoethyl)-Val
		Cys	S-(2-amidoethyl)-Cys
styrene	styrene oxide	Val	N-(2-hydroxy-1-phenylethyl)-Val N-(2-hydroxy-2-phenylethyl)-Val
		Cys	N-(2-hydroxy-1-phenylethyl)-Cys N-(2-hydroxy-2-phenylethyl)-Cys

Aminokyselinové adukty methylisokyanátu



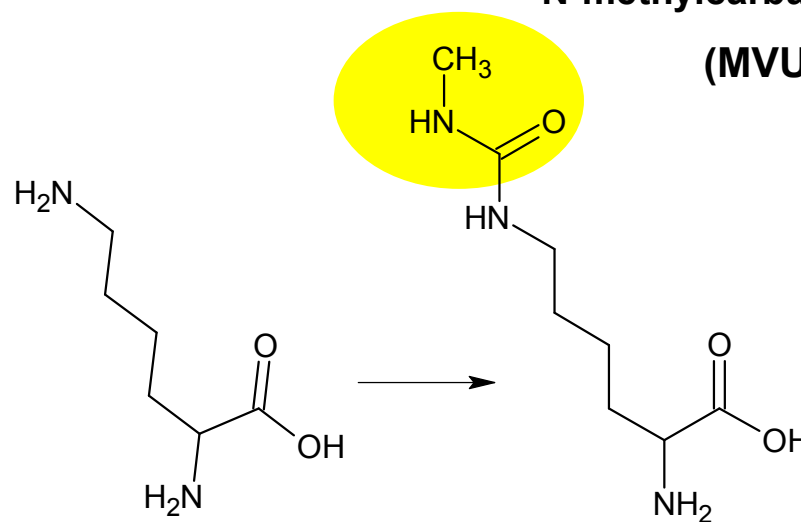
methylisocyanate
(MIC)



Val

N-methylcarbamoyl-Val

(MVU)

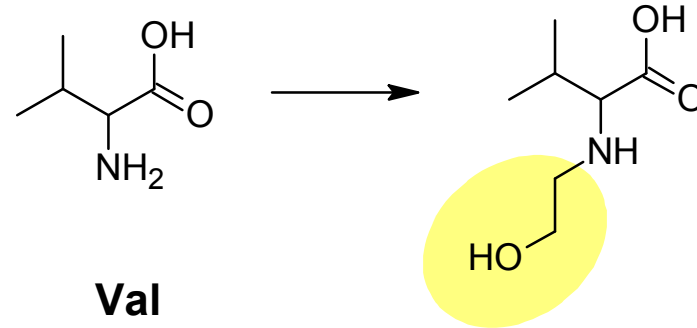


Lys

N(5)-methylcarbamoyl-Lys

(MLU)

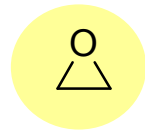
Aminokyselinové adukty ethylenoxidu



Val

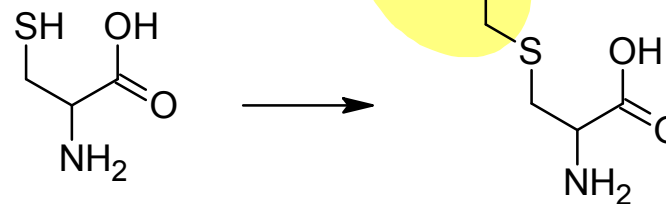
2-hydroxyethyl-Val

(HEV)



ethylenoxid

(EO)



Cys

2-hydroxyethyl-Cys

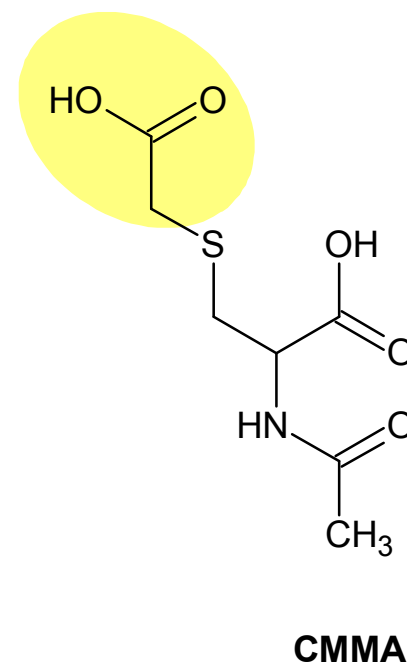
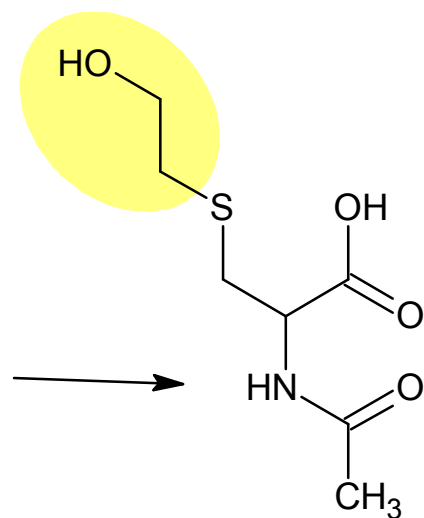
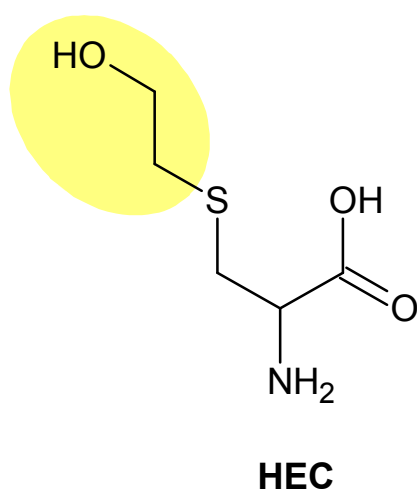
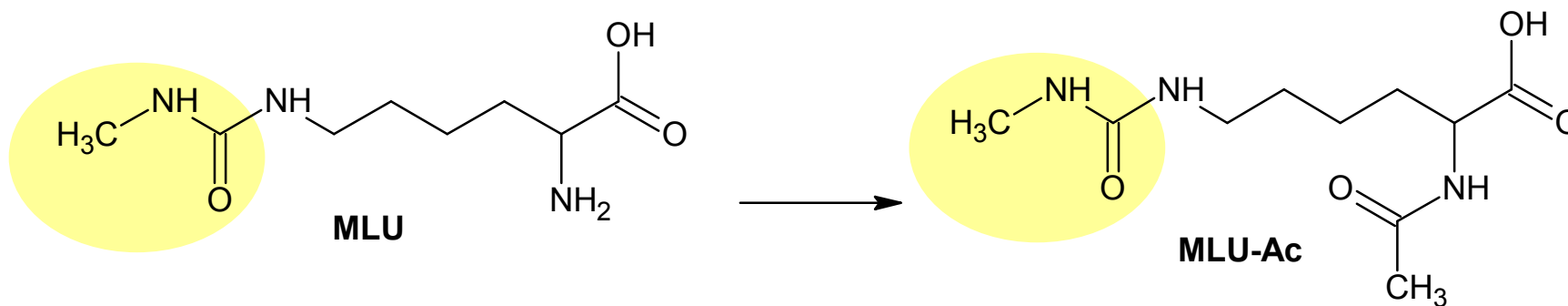
(HEC)

Výtěžky aduktů a jejich metabolitů v moči potkanů (0-24 h) po i.p. podání aduktů, 10 mg/kg

Podaný adukt	Látky stanovené v moči potkanů a jejich výtěžek (%) ¹⁾			
	Výchozí látka		Metabolický produkt	
HEV	HEV	29; 33		
HEC	HEC	<1 %	HEMA, CMMA	n.m. ²⁾
MVU	MVU	58; 105		
MLU	MLU	0,5; 0,5	MLU-Ac	46; 70

¹⁾ individuální hodnoty, n=2; ²⁾ n.m. neměřeno

Aminokyselinové adukty: další přeměny



Analytické postupy: izolace z moče

- Extrakce do kapaliny nevyhovující
- Extrakce na pevné fázi (SPE)
- Alkylace s reaktivními chlor-formiáty + extrakce v jediném kroku
- Lyofilizace + esterifikace ROH.HCl + extrakce

Stanovení

- HPLC/MS, GC/MS
- Příprava isotopicky značených vnitřních standardů

Výzkumný plán - Etapa 2

Studium osudu nativních globinových aduktů po jejich fyziologickém odbourání z organismu

- 1) Inkubace erythrocytů z potkanů-dárců s aduktotvorným činidlem
- 2) Promytí erythrocytů: odstranění všech rozpustných (tj. nenavázaných) forem aduktotvorného činidla
- 3) Přenos (transfúze) erythrocytů do krevního oběhu potkanů-příjemců
- 4) Stanovení globinových aduktů v přenášených erythrocytech a pak po transfúzi v krvi příjemců
- 5) Stanovení globinových aduktů v krvi příjemců po celou dobu života erythrocytů
- 6) Stanovení produktů odbourávání globinových aduktů, tj. aminokyselinových aduktů a případně jejich následných metabolitů v moči potkanů (paralelně s globinovými adukty)

Perspektivy

Pokud bude prokázáno, že fyziologické odbourávání globinových aduktů skutečně produkuje aminokyselinové adukty a jejich metabolické produkty vylučované močí, pak budou tyto látky představovat novou kategorii biomarkerů expozice, spojující tři hlavní výhody:

- **Specificitu pro výchozí chemickou látku**
- **Možnost monitorování dlouhodobých kumulativních expozic**
- **Neinvazivní odběr vzorků**

Možné využití i u dalších proteinů.

Možné aplikace v toxikologii, klinické medicíně a farmakologii.

Poděkování

IGA MZ ČR

Grant NT13401-4/2012

Spolupracovníkům

Posluchačům

