

Degradační produkty proteinových aduktů v moči jako perspektivní biomarkery kumulativní expozice reaktivním chemickým látkám



J. Mráz, I. Linhart *, I. Hanzlíková, Š. Dušková,
L. Dabrowská, H. Chrástecká, R. Vajtrová

Státní zdravotní ústav, Praha

* VŠCHT Praha

Biologické monitorování

Biologické expoziční testy (BET)

aplikace metod biologického monitorování v případě látek, pro něž je znám vztah mezi velikostí expozice a hladinou příslušného biomarkeru, a pro něž byl stanoven biologický limit

Provádění BET v ČR

řídí se Vyhláškou č. 432/2003 Sb. v platném znění (Vyhláška č. 107/2013)

Limitní hodnoty ukazatelů biologických expozičních testů a podmínky odběru biologického materiálu pro provádění biologických expozičních testů

Tabulka č. 1

Limitní hodnoty ukazatelů biologických expozičních testů v moči

Látka	Ukazatel	Limitní hodnoty		Doba odběru
Anilin	p-Aminofenol	50 mg/g kreatininu	52 μ mol/mmol kreatininu	konec směny
Arsen a arsenovodík	Arsen	0,05 mg/g kreatininu	0,075 μ mol/mmol kreatininu	konec pracovního týdne
Benzen	S-Fenylmerkapturová kyselina	0,05 mg/g kreatininu	0,024 μ mol/mmol kreatininu	konec směny
	<i>t,t</i> -Mukonová kyselina	1,5 mg/g kreatininu	1,2 μ mol/mmol kreatininu	konec směny
Cyklohexanon	1,2-Cyklohexandiol (po hydrolyze)	50 mg/g kreatininu	0,049 mmol/mmol kreatininu	konec směny na konci pracovního týdne
Dimethylformamid	N-Methylformamid	15 mg/g kreatininu	0,029 mmol/mmol kreatininu	konec směny

Tabulka č. 2
Limitní hodnoty ukazatelů biologických expozičních testů v krvi

Látka v krvi	Ukazatel	Limity	Doba odběru
Anilin	Methemoglobin	1,5 % hemoglobinu	konec směny
Ethylenoxid	N-(2-Hydroxyethyl) valin v globinu	0,3 µg/g globinu 1,9 nmol/g globinu	nerozhoduje
Inhibitory cholinesterázy a acetylcholinesterázy	Aktivita cholinesterázy a acetylcholinesterázy	pokles o 20% z hodnoty před započítím prací	konec směny
Kadmium	Kadmium	0,005 mg/l 0,045 µmol/l	nerozhoduje
Nitrobenzen	Methemoglobin	1,5% hemoglobinu	konec směny
Oxid uhelnatý	Karboxylhemoglobin	5 % hemoglobinu	konec směny
Olovo	Olovo	0,4 mg/l	nerozhoduje
Polychlorované bifenyly	Polychlorované bifenyly	0,05 mg/l	nerozhoduje“.

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

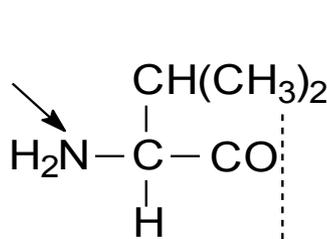
BM vnímavosti

Proč adukty s globinem?

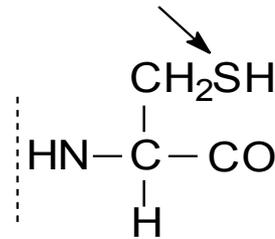


- Vhodná náhrada za adukty s DNA
- Dlouhodobá persistence v organismu po celou dobu života erythrocytů (u člověka ca. 125 dní)
- Dostupnost v dostatečném množství (140 mg/ml krve)
- Zavedené analytické postupy
- Doporučené pro hodnocení expozice na pracovištích (biologické limity, BET)
- Použitelné pro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

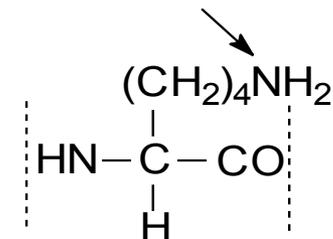
Nucleophilic sites in globin



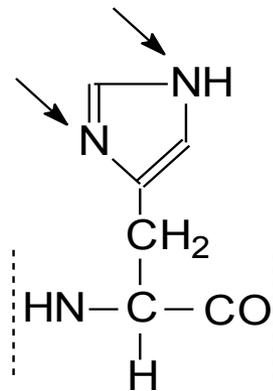
Val



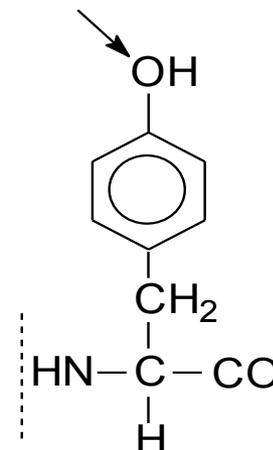
Cys



Lys

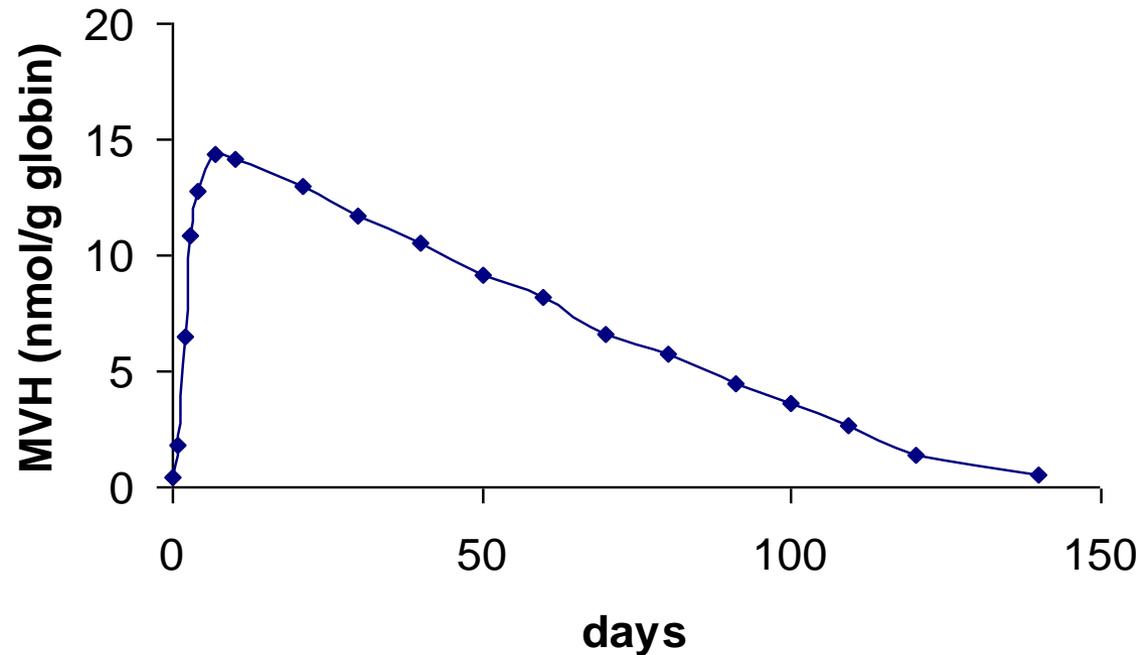


His



Tyr

Toxicokinetika globinových aduktů u člověka



Hladina aduktu MVU (stanoveného jako MVH) v globinu po jednorázové perkutánní expozici N,N-dimethylformamidu (DMF)

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

Adukty s aminokyselinami: modelové sloučeniny

Precursor in vivo	Reactive species	Amino acid	Adduct
N,N-dimethyl-formamide, N-methyl-formamide	methyl-isocyanate	Val	N-methylcarbamoysl-Val
		Lys	N _ε -methylcarbamoysl-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

Expozice výchozí látce

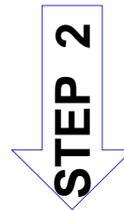


(Metabolismus)

Transport adduktotvorných činidel do erythrocytů

Tvorba globinových aduktů

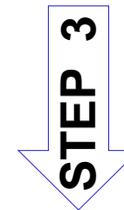
Globinové adukty v erythrocytech



Odstranění a desintegrace erythrocytů

Proteolýza globinu

Degradační produkty globinových aduktů v krevním oběhu



(Metabolismus)

Vylučování ledvinami

Degradační produkty globinových aduktů v moči

Totální hydrolýza globinu modifikovaného látkou (X)

XVLSPAD**X**KTNV**K**AAWG**K**VGA**X**HAGE**X**CGAEA-----



acidic hydrolysis
enzymatic hydrolysis (Pronase)

S L **XV** V P G A D W E A G
 P N G T A **K** V D **XH** A A G
 A G N T A **K** A E **XC** A
 E

Stanovení degradačních produktů globinových aduktů v moči

- Záchyt polárních aduktů z moči pomocí extrakce na pevné fázi (SPE)
- Analýza HPLC/MS/MS

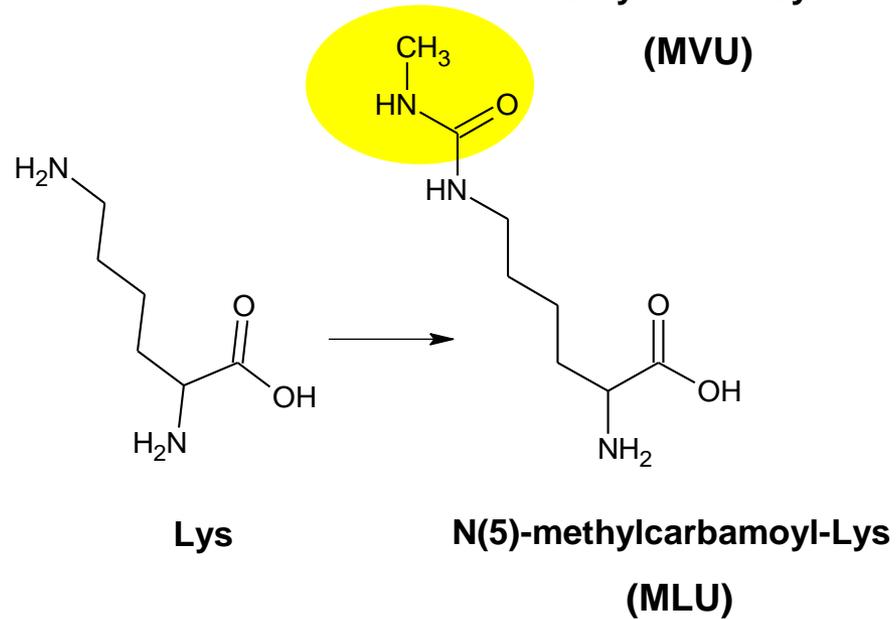
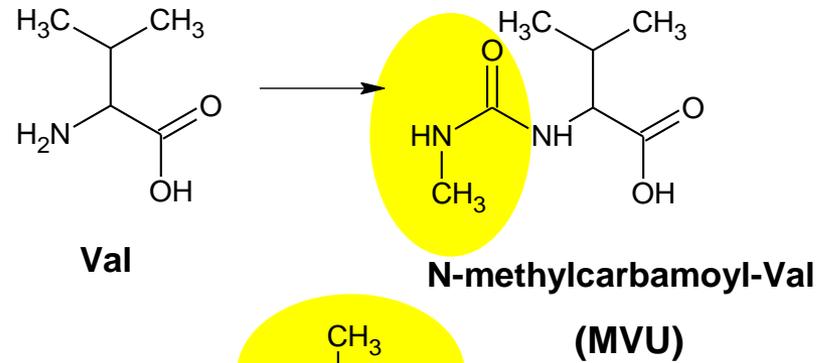
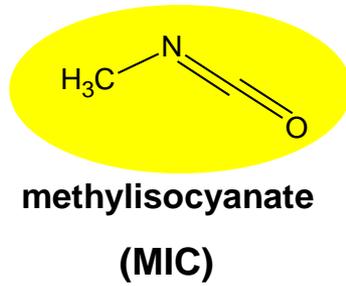
Plánované experimenty s potkany:

- A) Intraperitoneální podání aduktotvorných látek, stanovení aduktů v globinu a moči po celou dobu vylučování**
- B) Intravenózní podání (transfuse) erythrocytů modifikovaných *in vitro* aduktotvornou látkou, stanovení aduktů v globinu a moči po celou dobu vylučování**

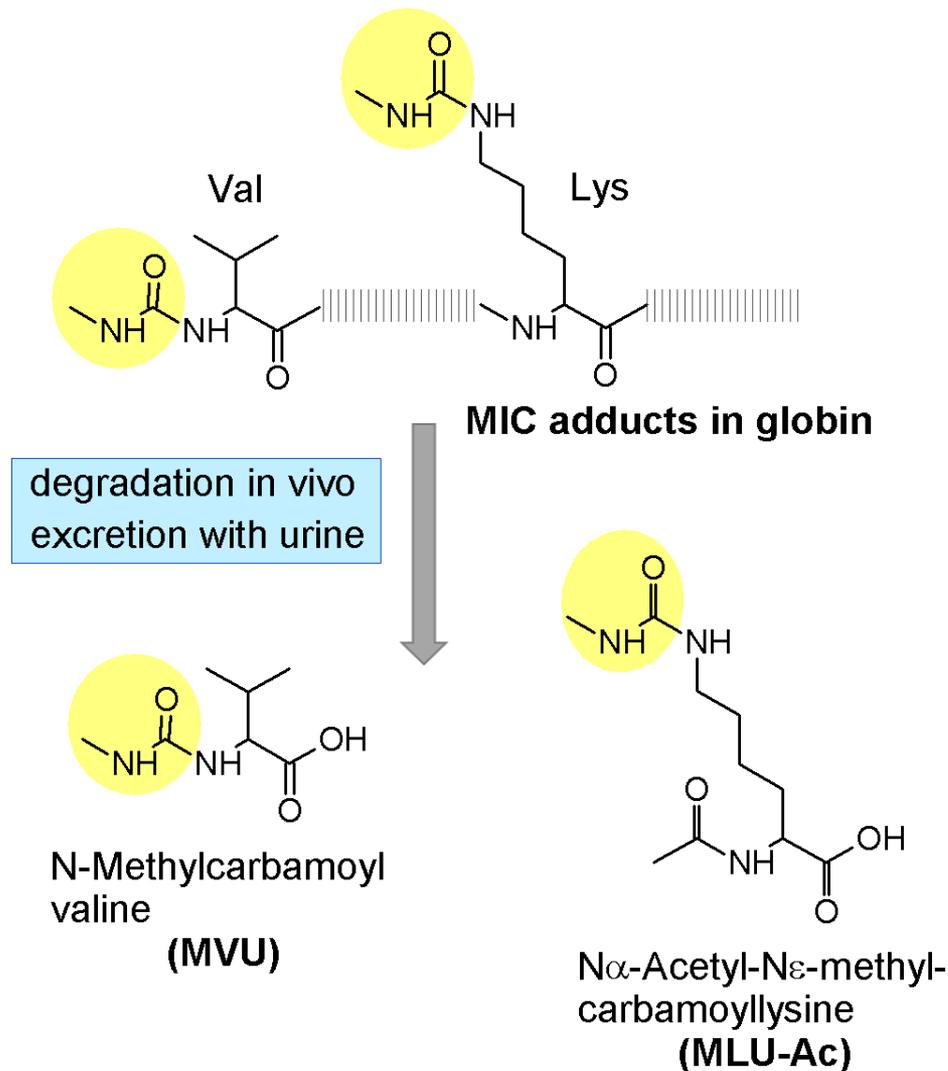
Příprava a aplikace potkaních erythrocytů modifikovaných MIC (IRE-MIC)

- 1) Odběr krve potkanů-dárců (anestésie, vykrvení aortou)**
- 2) Oddělení a promytí erythrocytů**
- 3) Inkubace erythrocytů s MIC (5-50 mM) → „IRE-MIC“**
- 4) Promytí IRE-MIC, stanovení hemoglobinu**
- 5) Odběr části IRE-MIC, izolace globinu, stanovení aduktů**
- 6) Podání IRE-MIC potkanům-příjemcům, 2 ml/kg (anestésie, podání kanylou do vena jugularis)**
- 7) Odběr vzorku celkové krve 10 min po podání IRE-MIC**
- 8) Uzavření veny jugularis, zašití rány**
- 9) Odběry krve a stanovení globinových aduktů v krvi příjemců po celou dobu života erythrocytů**
- 10) Odběry moči a stanovení produktů odbourávání globinových aduktů (aminokyselinových aduktů a/nebo jejich metabolitů) po celou dobu života erythrocytů**

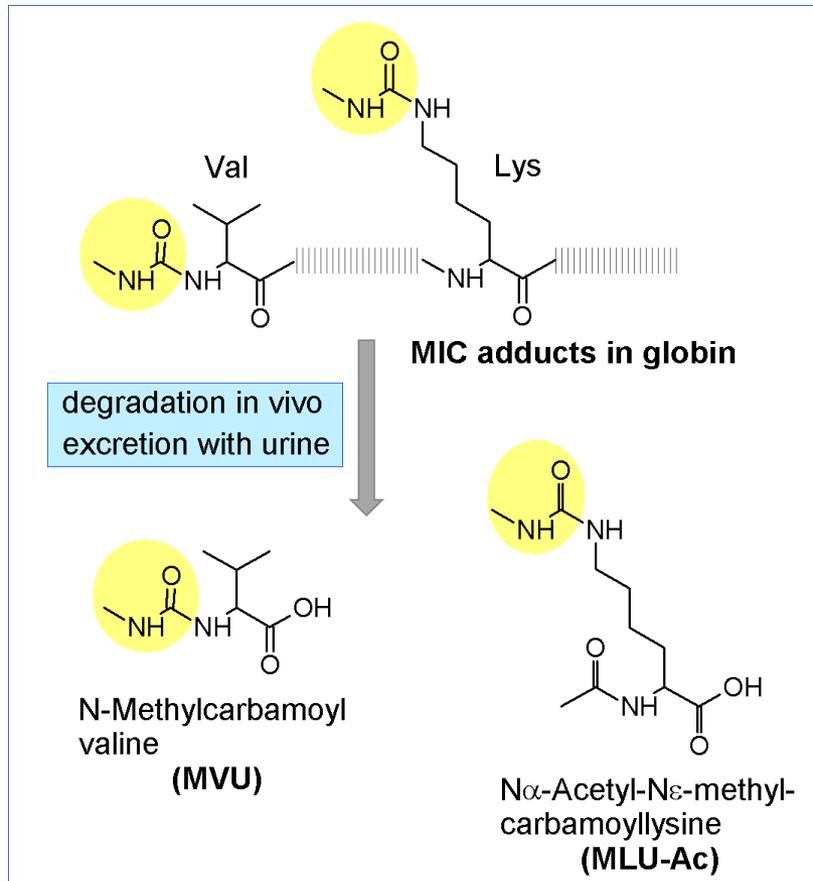
Aminokyselinové adukty methylisokyanátu



Odbourávání aduktů methylisokyanátu s globinem



Aduky methylisokyanátu v globinu a moči: toxikokinetika



SCHEME 2: In vivo degradation of MIC adducts in globin

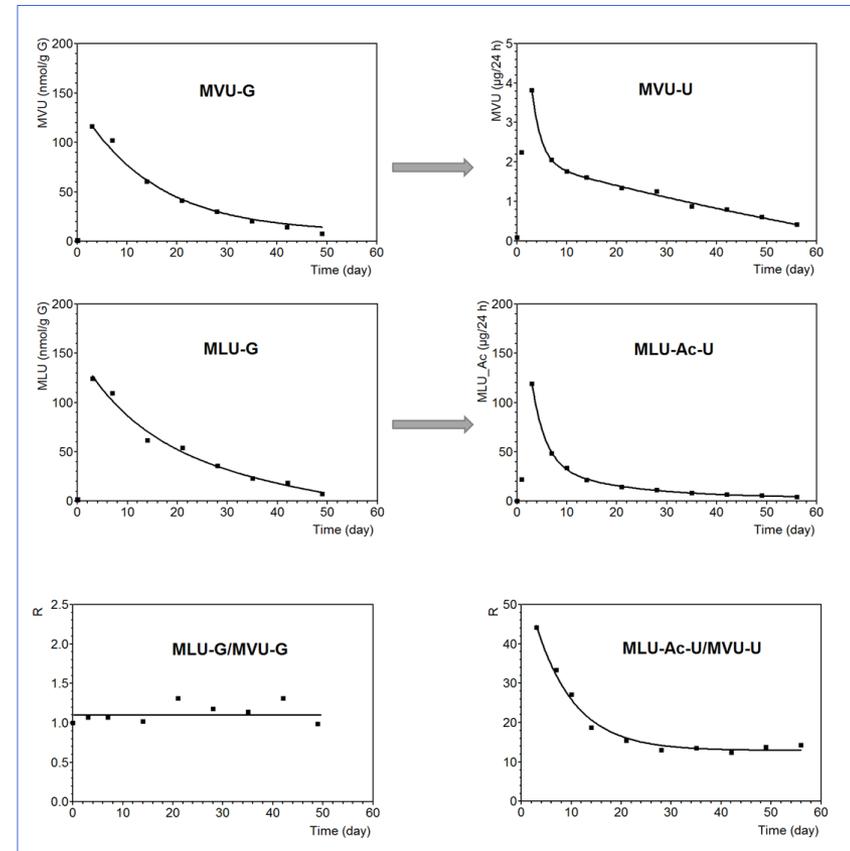
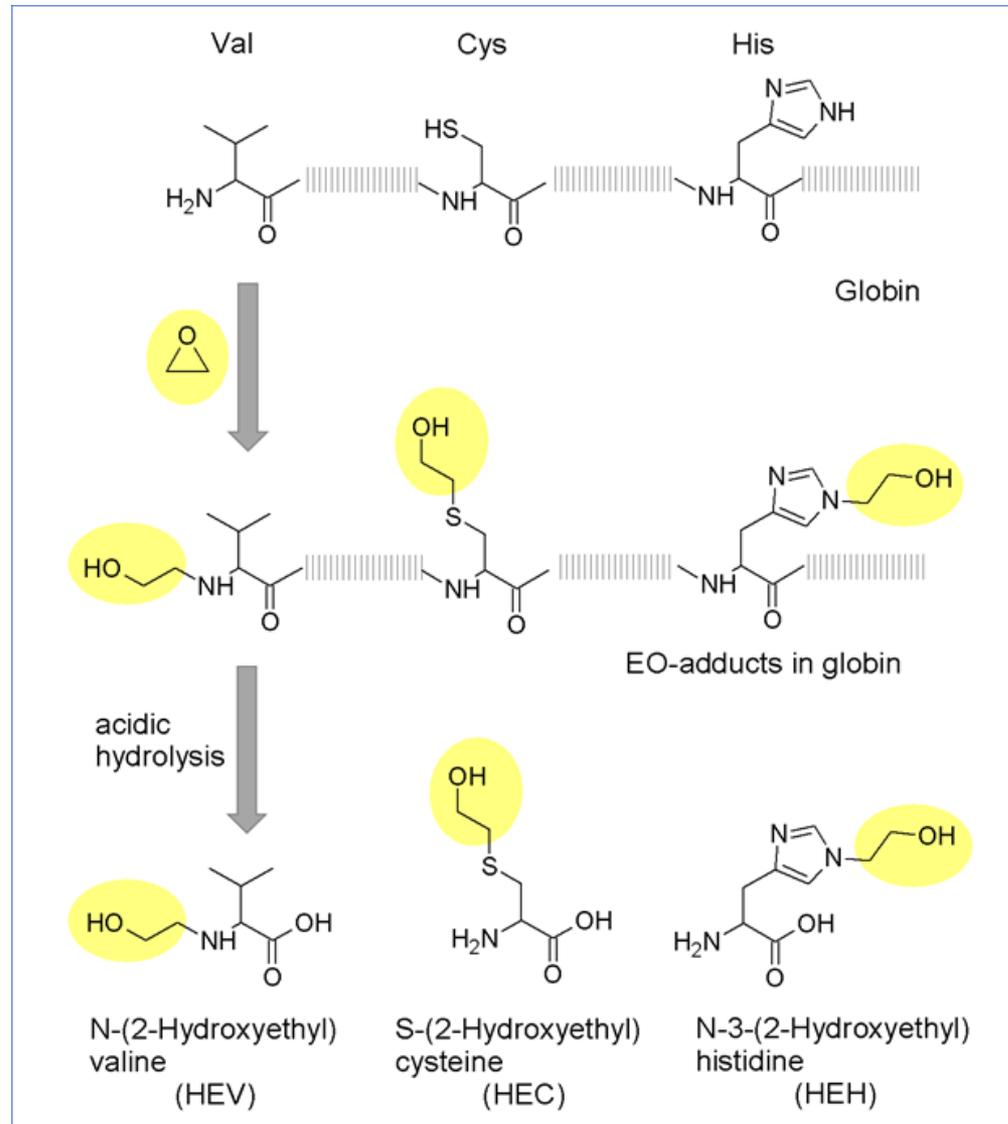


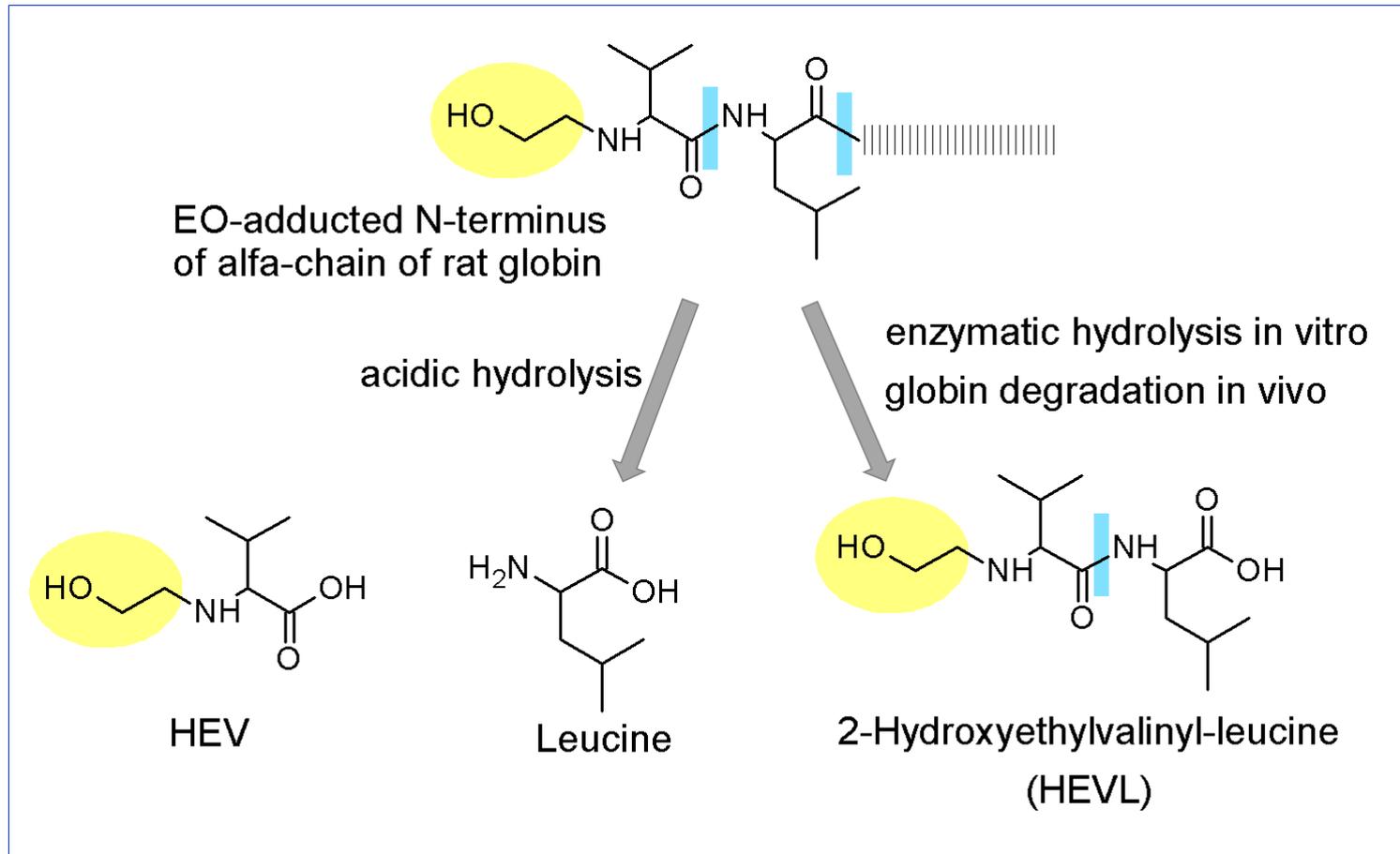
Fig.2: Decay of the adduct levels in globin (MVU-G, MLU-G) and urine (MVU-U, MLU-Ac-U) following single i.p. administration of MF in the rat (500 mg/kg). The bottom panels demonstrate time course of the ratio of both adducts in globin (MLU-G/MVU-G) and in urine (MLU-Ac-U/MVU-U)

Adukty ethylenoxidu s globinem



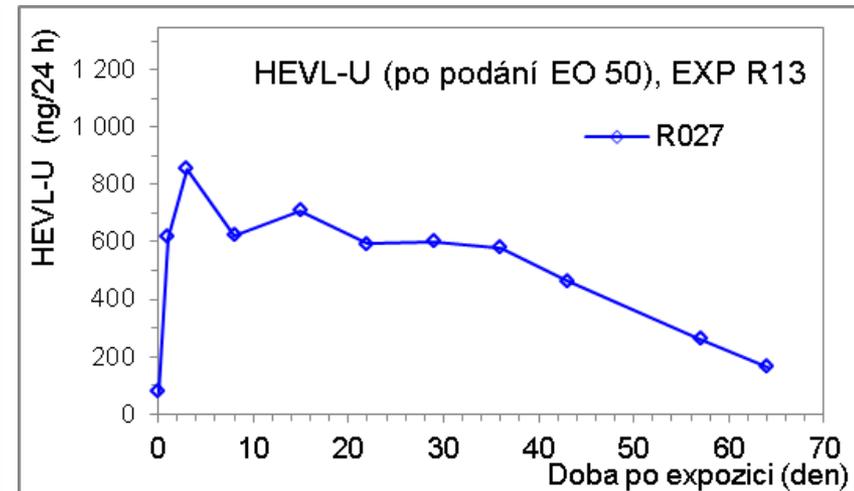
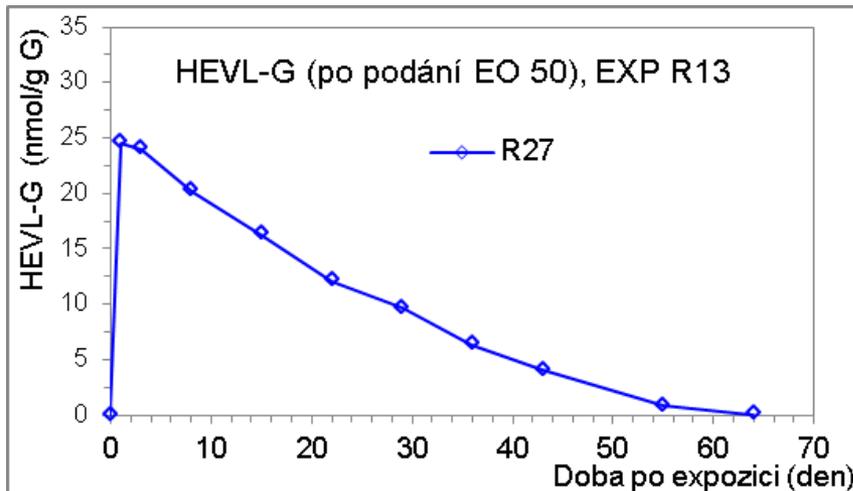
SCHEME 2: Structure and analysis of EO adducts in globin

Odbourávání aduktu ethylenoxidu s N-koncovým valinem globinu

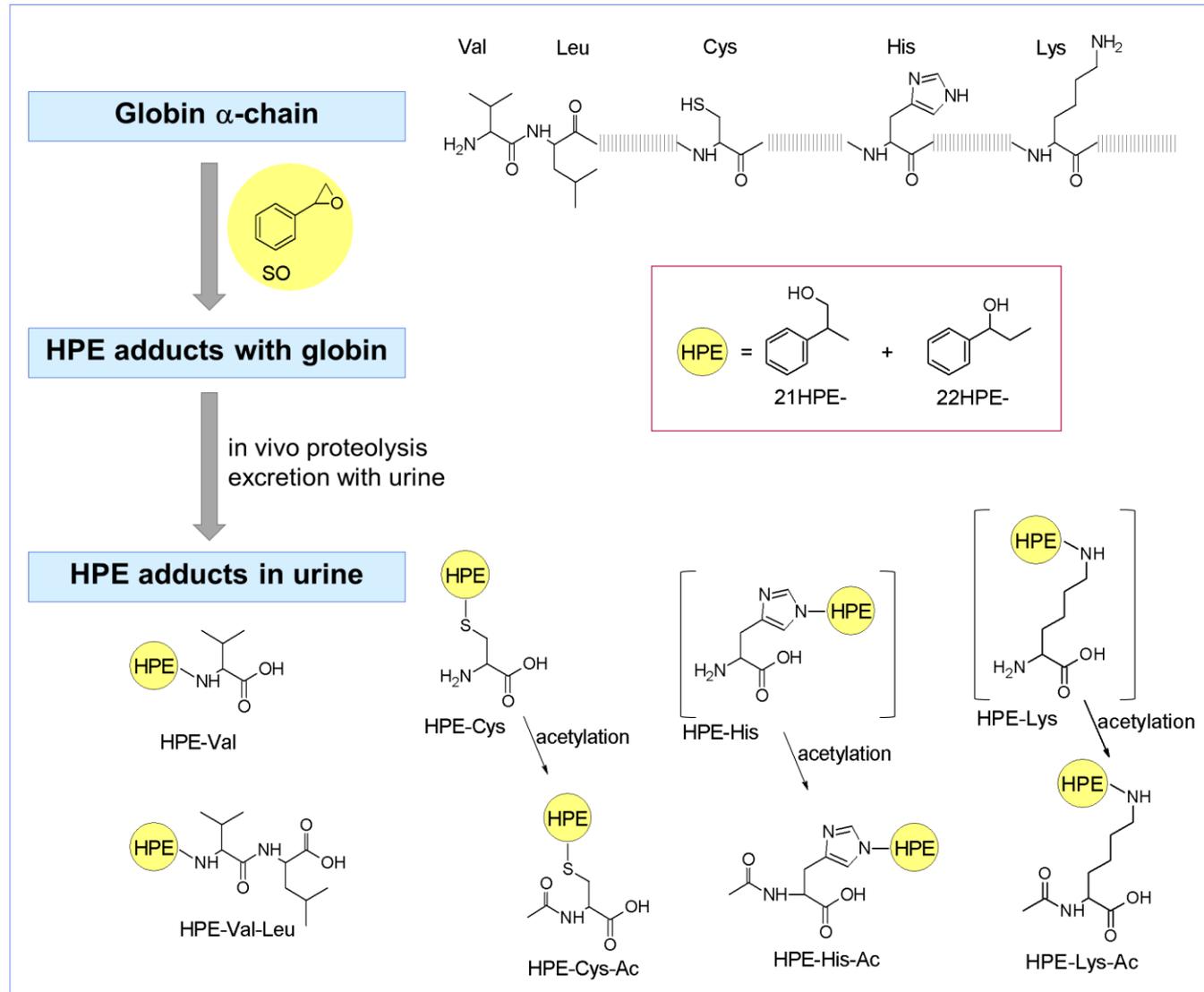


Scheme 4: In vitro and in vivo proteolytic formation of HEVL from EO-adducted α -chain of rat globin

Kinetika aduktů ethylenoxidu s N-koncovým Val-Leu v globinu a moči potkanů po i.p. podání EO

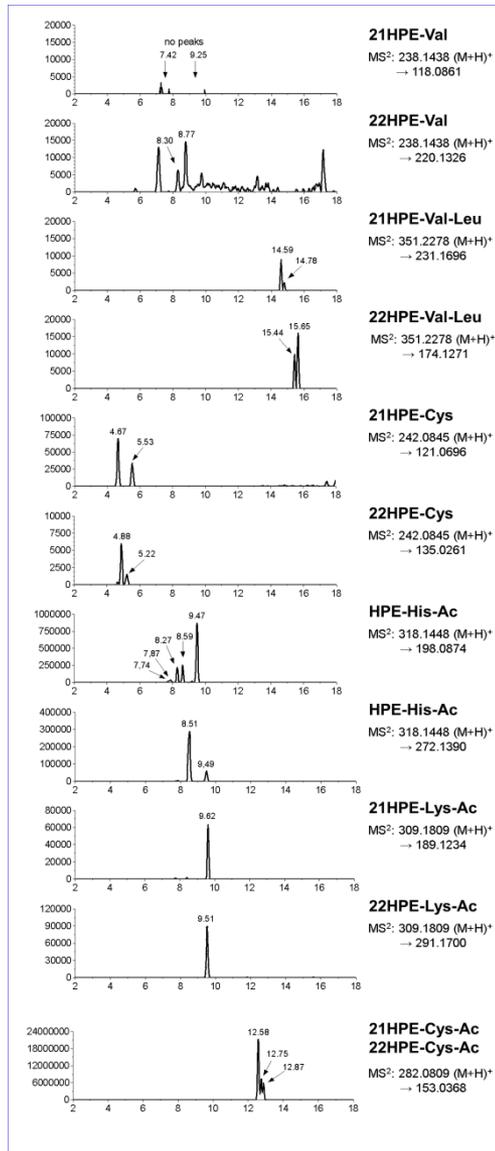


Odbourávání globinových aduktů styrenoxidu

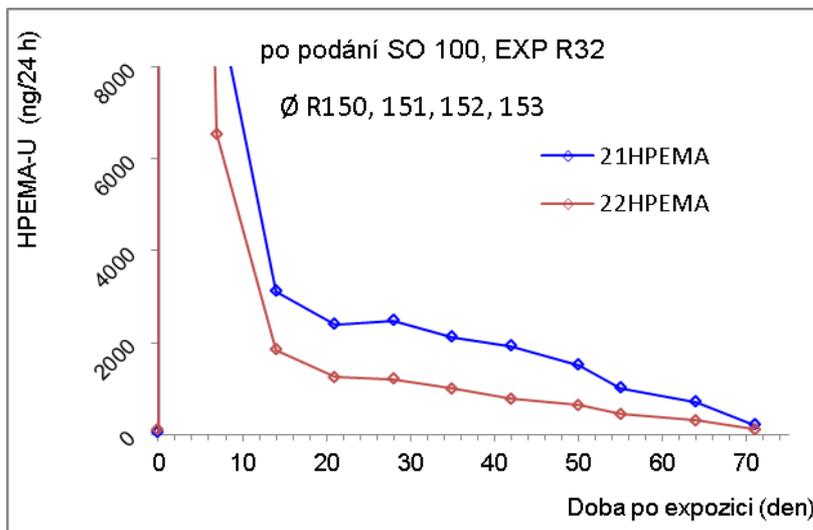
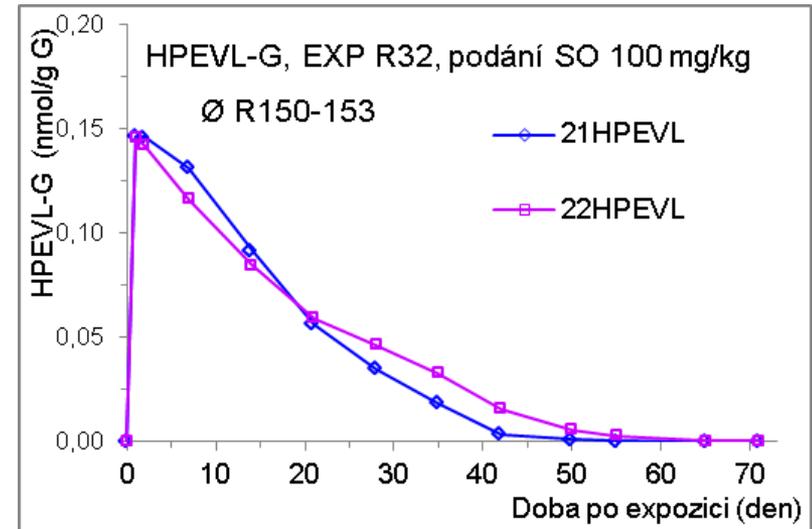
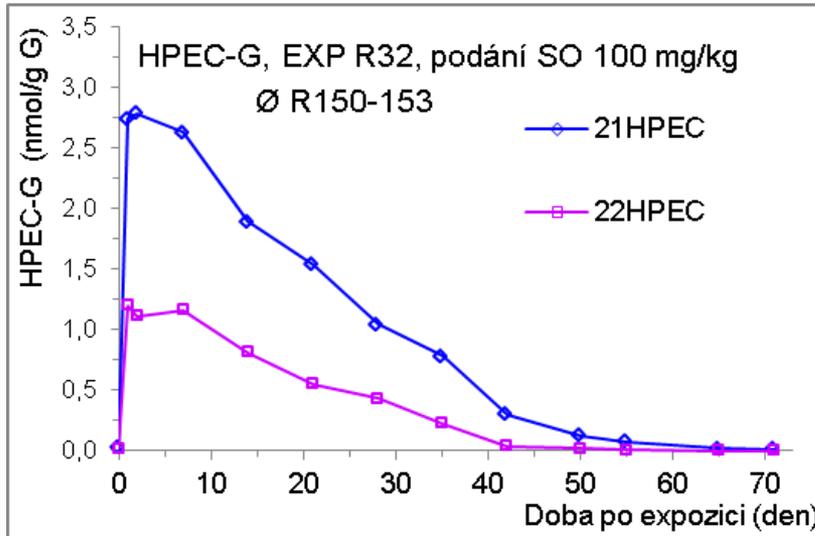


SCHEME 1: Degradation products of SO-globin adducts in urine

HPLC/MS/MS stanovení aduktů SO v moči



Kinetika úbytku aduktů styrenoxidu s Cys a Val v globinu a moči potkanů



Shrnutí

Fyziologické odbourávání globinových aduktů produkuje aminokyselinové adukty, které se vylučují močí ve volné formě nebo jako jednoduché metabolity.

Tyto produkty představují novou kategorii biomarkerů expozice, spojující tři hlavní výhody:

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

Perspektivy

Rozšíření studie na další typy aduktů

Studie na člověku

Poděkování

IGA MZ ČR

Grant NT13401-4/2012

Spolupracovníkům