

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Tato diplomová práce byla uznána dle Rigorózního řádu UK a PřF jako práce
rigorózní dne 10. 7. 2009

.....
studijní oddělení



2005

Marcela Semanská

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BIOCHEMIE**



**Studium oxidace karcinogenního azobarviva Sudanu I
peroxidasou a jeho vazby na deoxyguanosin a guanosin**

Diplomová práce

Školitel: Doc. RNDr. Marie Stiborová, DrSc.

Praha 2005

Marcela Semanská

Prohlášení

Já, Marcela Semanská studentka 5. ročníku Přírodovědecké fakulty, Praha 2, Albertov 6, 128 43 – součásti Univerzity Karlovy v Praze se sídlem v Praze 1, Ovocný trh 3–5, 116 36 (AČ: 00216208) jsem v rámci plnění svých studijních povinností vypracovala v akademickém roce 2004/2005 diplomovou práci s názvem „STUDIUM OXIDACE KARCINOGENNÍHO AZOBARVIVA SUDANU I PEROXIDASOU A JEHO VAZBY NA DEOXYGUANOSIN A GUANOSIN“, která má povahu školního díla ve smyslu § 60 z.č. 121/2000 Sb. ve znění pozdějších předpisů. Při vypracování diplomové práce jsem využívala vybavení vysoké školy, její knihovní fondy a sbírky. Při vypracování diplomové práce mi byli nápomocni Doc. RNDr. Marie Stiborová, DrSc. jako školitel a RNDr. Václav Martínek, Ph.D. jako konzultant. Až na výše uvedené jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím literatury, která je v diplomové práci citována.

S přihlédnutím k výše uvedeným skutečnostem a podmínkám, za nichž školní dílo vzniklo, uděluji tímto Univerzitě Karlově v Praze se sídlem v Praze 1, Ovocný trh 3–5, 116 36 (IČ: 00216208) a její součásti Přírodovědecké fakultě, Praha 2, Albertov 6, 128 43 svolení k užití výše specifikovaného školního díla, a to zejména pro vnitřní potřeby vysoké školy a její reprezentaci.


Dále se zavazuji výše specifikované školní dílo sama užít a jinému poskytnout licenci pouze s předchozím písemným souhlasem Univerzity Karlovy v Praze se sídlem v Praze 1, Ovocný trh 3–5, 116 36 (IČ: 00216208) a její součásti Přírodovědecké fakulty, Praha 2, Albertov 6, 128 43. Vysoká škola a její zmíněná součást tento souhlas udělí, pokud užití školního díla jeho autorem a poskytnutí licence jinému není v rozporu s jejími oprávněnými zájmy. Jsem srozuměna s tím, že vysoká škola a její součást jsou oprávněny požadovat, abych jim jako autor školního díla z výtěžku mnou dosaženého v souvislosti s užitím tohoto díla či poskytnutím licence jinému přiměřeně přispěla na úhradu nákladů, které na vytvoření díla

vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše. Přitom se přihlédne k výši výtěžku dosaženého vysokou školou a její součástí z užití školního díla dle předchozího odstavce.

Jsem si vědoma své odpovědnosti za škodu způsobenou vysoké škole a její součástí porušením povinností, které vyplývají z obecně závazných právních předpisů a tohoto prohlášení, a zavazuji se případnou takto způsobenou škodu vysoké škole a její součástí uhradit.

Toto prohlášení činím na základě své pravé vůle, svobodně, vážně, srozumitelně, určitě, nikoliv v tísní a pod nátlakem. Na důkaz toho připojuji svůj vlastnoruční podpis.

V Praze dne 30. 5. 2005


.....

podpis

Ráda bych poděkovala své školitelce Doc. RNDr. Marii Stiborové, DrSc. za zadání zajímavého tématu diplomové práce, odborné vedení a trpělivý přístup při jejím vypracování.

Speciální poděkování bych chtěla vyjádřit RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D. za objasnění experimentálních postupů potřebných k řešení této práce, odborné rady a trpělivost.

Dále bych chtěla poděkovat kolektivu laboratoře za vytvoření příjemných pracovních podmínek.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	7
1. ÚVOD A PŘEHLED LITERATURY	9
1.1. Proces kancerogeneze:	10
1.1.1. Karcinogeny a jejich působení	11
1.2. Azobarviva.....	11
1.2.1. Fyzikální a chemické vlastnosti azobarviv	12
1.2.2. Biotransformace azobarviv	12
1.2.3. Sudan I	13
1.2.3.1. Biotransformace Sudanu I	14
1.2.3.2. Adukty Sudanu I aktivovaného cytochromy P450 a peroxidasami s DNA, RNA a nukleotidy	15
1.3. Peroxidasý	16
1.3.1. Klasifikace a charakterizace peroxidasy	17
1.3.1.1. Peroxidasý rostlin, hub a bakterií	17
1.3.1.2. Živočišné peroxidasy	18
1.3.1.3. Dělení peroxidasy dle struktury	18
1.3.2. Lokalizace peroxidasy	20
1.3.2.1. Rostlinná buňka	20
1.3.2.2. Živočišná buňka	20
1.3.2.3. Živočišné tkáně	20
1.3.2.4. Rostlinná pletiva	20
1.3.3. Reakce katalyzované peroxidasami	21
1.3.3.1. Reakce využívající H ₂ O ₂ bez přítomnosti O ₂	21
2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	24
3. MATERIÁL A METODY	25
3.1. Použité přístroje	25
3.2. Použitý materiál a chemikálie.....	26
3.3. Použité metody	27
3.3.1. Oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou	27
3.3.2. Separace produktů oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou na tenké vrstvě.....	27
3.3.3. Rozdělení produktů oxidace Sudanu I pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie	28
3.3.4. Analýza produktů Sudanu I pomocí hmotnostní spektrometrie.....	29
3.3.5. Analýza produktů Sudanu I pomocí nukleární magnetické rezonance	29
3.3.6. Aktivace Sudanu I peroxidasou a vazba reaktivních metabolitů na deoxyguanosin a guanosin.....	29
3.3.7. Chromatografie aduktů na TLC.....	30
3.3.8. UV/VIS a hmotnostní spektrometrie aduktů aktivovaného Sudanu I s deoxyguanosinem a guanosinem	30
4. Výsledky	31
4.1. Oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou.....	31

4.1.1. Separace produktů oxidace Sudanu I peroxidasou pomocí TLC ...	31
4.1.2. Separace produktů oxidace Sudanu I peroxidasou pomocí HPLC	32
4.2. Spektrální charakterizace majoritních produktů oxidace Sudanu I peroxidasou	36
4.2.1. Charakterizace majoritních metabolitů Sudanu I pomocí UV/VIS spektrometrie.....	36
4.2.2. Charakterizace majoritních produktů oxidace Sudanu I pomocí hmotnostní spektrometrie	37
4.3. Efektivita tvorby aduktů aktivovaných Sudanem I s deoxyguanosinem a guanosinem.....	45
4.3.1. Vliv pH na tvorbu aduktů	45
4.3.2. Vliv koncentrace Sudanu I na tvorbu aduktů	46
4.3.3. Vliv koncentrace nukleosidů na tvorbu aduktů s aktivovaným Sudanem I.....	47
4.4. Charakterizace aduktů peroxidasou aktivovaného Sudanu I s guanosinem a deoxyguanosinem	49
5. Diskuse	57
6. Závěr	61
7. Seznam literatury	63

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A	oxidovaný substrát
AH [·]	radikál substrátu
AH	substrát
APCI	chemická ionizace za atmosferického tlaku
BDI	benzodiazoniový kation
CYP	cytochrom P450 (novější označení)
CYP 1A	cyt P448
Da	Dalton
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ESI	ionizace elektrosprejem
EtOH	ethanol
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství
GMP	Guanosin 5' monofosfát
GIT	gastrointestinální trakt
HRP	peroxidasa křenu selského (horseradish peroxidase)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
IARC	Mezinárodní institut pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer)
LPO	laktoperoxidasa
MetOH	methanol
MFO	systém oxidas se smíšenou funkcí (mixed function oxidases)
MPO	myeloperoxidasa
PHS	postaglandin H synthasa
RNA	ribonukleová kyselina
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TRP	tryptofan
TYR	tyrosin
UV	ultrafialová oblast spektra

VIS

viditelná oblast spektra

WHO

Světová zdravotnická organizace

1. ÚVOD A PŘEHLED LITERATURY

Některé reaktivní chemické látky tvořené v průběhu metabolismu karcinogenů se mohou kovalentně vázat na purinové a pyrimidinové báze v molekule DNA, tedy tvořit adukty. Vznik pozměněné nukleové báze může mít za následek zánik vazebného místa pro vytvoření vodíkové vazby a může vést k bodové mutaci, tedy k chybnému párování bází při přepisu genetické informace. Mutace mohou mít závažné důsledky pro život buňky i celého organismu, nejvýznamnější z nich je tvorba zhoubných nádorů. Karcinogenní potenciál strukturně rozdílných aduktů se přitom významně liší. Z toho vyplývá, že nejen množství, ale také typ aduktů s DNA je významným indikátorem poškození DNA. Určování metabolitů karcinogenních látek a stanovení aduktů s DNA může sloužit jako vnitřní ukazatel, biologický indikátor, expozice genotoxickým látkám a také jako prostředek pro sledování osudu karcinogenů v organismu i diagnostiku poškození DNA, zejména pro včasné odhalení rizika rakoviny (1).

1.1. Proces kancerogeneze:

Kancerogenezi se nazývá proces vzniku nádoru. Nádorová buňka se od normální liší tím, že je v ní geneticky podmíněnou změnou narušen regulační mechanismus jejího dělení a diferenciace. Vzniká v důsledku změny v protoonkogenech a nádory tlumících supresorových genech. Za nádor se označuje nově tvořená abnormální tkáň v mnohobuněčném organismu, jejíž buňky se dělí nekontrolovaným způsobem (2).

Vnějšími faktory vyvolávajícími mutace v DNA mohou být faktory biologické (např. onkoviry), fyzikální (např. radioaktivní záření) a chemické (karcinogeny)(2). Chemické karcinogeny jsou sloučeniny syntetické nebo i přírodního původu, které se dostávají do lidského organismu z životního nebo pracovního prostředí, jako součást potravy či jako léčiva, a vyvolávají u něj nádorová onemocnění (3).

Rozdělení chemických karcinogenů:

Mezinárodní organizací pro výzkum rakoviny bylo přes padesát rozdílných chemických sloučenin ohodnoceno jako karcinogeny vyvolávající nádorová onemocnění u člověka (4). Podle mechanismu působení mohou být tyto látky rozděleny do tří skupin (5):

- a) genotoxické karcinogeny – tvoří kovalentní adukty s DNA
- b) karcinogeny způsobující změny ve struktuře DNA - jedno- a dvouřetězcové zlomy, propojení molekul („cross-linking“) DNA-DNA, intra- i intermolekulární, nebo DNA protein „cross-linking“
- c) epigenetické karcinogeny – modifikují molekuly DNA nekovalentními interakcemi (např. látky označované jako interkaláty, které se vmezeřují do dvoušroubovité struktury DNA).

Většina karcinogenů tvořících kovalentní adukty s molekulou DNA vyžaduje metabolickou aktivaci (5). Z tzv. prokarcinogenních forem jsou přeměňovány na formy reaktivní, které jsou silnými elektrofilny, jež tvoří vlastní kovalentní vazby v DNA (2). Za nejdůležitější enzymy aktivující prokarcinogeny jsou považovány monooxygenasy se smíšenou funkcí, které obsahují hemový enzym cytochrom P450 jako terminální oxidasu (6). V některých tkáních chudých na cytochrom P450 plní tuto funkci enzymy jiné např. samostatné hemové enzymy, specifické i nespecifické, peroxidasy (6)

1.1.1. Karcinogeny a jejich působení

Karcinogenní látky můžeme rozdělit na několik skupin podle jejich původu :

- a) endogenní karcinogeny, které vznikají přirozenou metabolickou cestou z látek běžně přítomných v organismu. Jde hlavně o skupinu N-nitrosoderivátů, které vznikají z dusitanů a aminů;
- b) chemické karcinogeny, které vznikly činností člověka a v přírodě se běžně nevyskytují,
- c) přirozené karcinogeny, které jsou také součástí životního cyklu jiných organismů. Nejznámější z nich jsou aflatoxiny, produkty látkové přeměny mikroskopické houby *Aspergillus flavus*. Mohou vznikat především v nesprávně ošetřovaných potravinách, které jsou snadno houbami napadány. Patří k nejsilnějším karcinogenům, které dnes známe (7).

Z hlediska působení rozlišujeme karcinogeny okamžité (**ultimativní**) zpravidla mají velmi silný účinek; a karcinogeny, které musí procházet biologickou aktivací. Aktivační cesta byla již popsána u některých skupin látek jako jsou polycyklické aromatické uhlovodíky, aromatické aminy, azobarviva, nitrosaminy, hydraziny a některé produkty rostlin. Existuje však stále mnoho chemických látek, u nichž cesta aktivace na ultimální karcinogen není známa, proto je důležité získávat stále nové odpovědi studiem metabolických procesů , které v organismu probíhají.

1.2. Azobarviva

Azobarviva jsou charakterizována přítomností jedné nebo několika azoskupin (-N=N-) v molekule. Azoskupina je tvořena ze dvou atomů dusíku vázaných dvojnou vazbou. Azoskupina většinou spojuje různá aromatická jádra, která obsahují další funkční skupiny (8).

Azobarviva patří do skupiny azosloučenin, která se již od roku 1859, kdy byl objeven aminoazobenzen, neustále rozrůstá. K výraznému rozvoji výroby azobarviv došlo na konci 19. a na začátku 20. století. V dnešní době jsou ve vyspělých zemích ročně produkovány stovky tun jednotlivých azobarviv (v 70. letech minulého století byla roční produkce Sudanu I v USA 300 tun, azobenzenu v zemích západní Evropy 700 tun, N,N dimethyl-4-aminoazobenzenu v USA 25 tun, atd.) (9). V současnosti

jsou to nejvíce používaná organická barviva. Používají se hojně k barvení všech druhů vláken i tkanin, k barvení kaučuku i syntetických hmot, k přípravě laků, malířských i polygrafických barev, inkoustů, k barvení kosmetických i potravinářských výrobků a k mnoha dalším účelům (10, 11, 12).

1.2.1. Fyzikální a chemické vlastnosti azobarviv

Azobarviva, jejichž molekula neobsahuje polární nebo nabitě skupiny, jsou dobře rozpustná v tučích a organických rozpouštědlech. Jejich rozpustnost závisí na charakteru a množství funkčních skupin. Barevnost azobarviv je způsobena přítomností auxochromních skupin (-OH, -OR, -NH₂, -NHR) (12). Hydroxyskupina je spíše kyselého charakteru, volná či substituovaná aminoskupina azobarviva se projevuje bazicky. Samotná azoskupina má pouze slabě basický charakter (12).

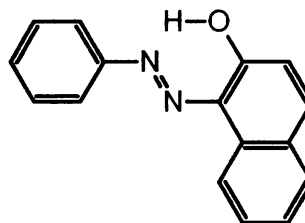
Na azoskupině může docházet k několika chemickým reakcím. Redukční činidla štěpí azoskupinu za vzniku dvou molekul primárního aminu. Reakce probíhá přes hydrazosloučeniny. Oxidačním štěpením koncentrovanou kyselinou dusičnou vzniká diazosloučenina a dinitroderivát azokomponenty. Působením čtyřmocného céru dochází u některých azobarviv k oxidačnímu štěpení na arendiazoniový ion a příslušný fenol, který je stabilizován tvorbou chinonu (13, 14).

1.2.2. Biotransformace azobarviv

Mnohá azobarviva jsou substráty biotransformačních enzymů. I. fáze biotransformace azobarviv se účastní hlavně systém oxidas se smíšenou funkcí (MFO systém), který provádí C-hydroxylaci aromatických jader azobarviv (15). Takto je do azobarviva zavedena hydroxyskupina umožňující konjugaci ve II. fázi biotransformace. Uvedená reakce je považována za hlavní cestu biotransformace azobarviv (15). Může také docházet k N-hydroxylaci primární nebo sekundární aminoskupiny aminoazobarviva za vzniku derivátu hydroxylaminu, nebo i k N-dealkylaci substituentů z terciární aminoskupiny (16). Enzymově katalyzovanou reakcí dochází rovnou k oxidačnímu či redukčnímu štěpení azoskupiny. Oxidací azoskupiny v MFO systému vzniká reaktivní benzendiazoniový ion (17). Redukčním štěpením azoskupiny vznikají dvě molekuly primárních aminů, které mohou podléhat další přeměně (např. N-oxidaci) (18). Ve II. fázi biotransformace azobarviv dochází

k tvorbě konjugátů především s kyselinou glukuronovou, sulfátem a glutathionem (19, 20).

1.2.3. Sudan I



Sudan I

Další názvy: C.I. Solvent Yellow 14;

1-(fenyldiazenyl)-2-naftol; 1-fenylazo-1-naftol

Sudan I je cihlově červené azobarvivo, které se v organických rozpouštědlech dobře rozpouští na žluto-oranžový roztok. Poprvé jej připravil C. Lieberman v roce 1883 kopulací diazotovaného anilinu s 2-naftolem v alkalickém prostředí za chladu. Absorpční maximum ethanolového roztoku je v 514 – 516 nm a kolem 479 nm u roztoku methanolového. Pro svou snadnou přípravu se velmi často používal k barvení (např. vosků, olejů, uhlovodíkových rozpouštědel, plastů a také potravin). To znamenalo velký nárůst výroby Sudanu I na stovky tun ročně. Pro podezření z karcinogenních účinků označila komise Světové zdravotnické organizace (WHO) a Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) v roce 1973 toto azobarvivo jako nevhodné pro potravinářské využití. Karcinogenita Sudanu I se později opravdu potvrdila. Sudan I způsobuje vznik nádorů jater a močového měchýře hlodavců (9). Prokázáno bylo rovněž, že Sudan I je kontaktním alergenem (pro orgány člověka a morčete). Kůže člověka se do kontaktu se Sudanem I může dostat např. prostřednictvím kosmetických přípravků, kde může být přidáván buď jako barvivo nebo být přítomen jako nečistota z jiných barviv (21). Sudan I může ve styku s kůží, vyvolávat „senzitivizaci“ (zcitlivění kůže na jiné sloučeniny), anebo alergickou reakci (kontaktní dermatitidu), jenž může přetrvávat ještě několik měsíců po přerušení kontaktu s alergenem (22, 23). V poslední době bylo zjištěno, že Sudan I byl detekován jako aditivum v potravinách obsahujících „chilli peppers“. Sudan I se proto stal středem zájmu řady laboratoří, především z hlediska vypracování senzitivních metod jeho stanovení (24, 25), a i naší laboratoře z hlediska jeho karcinogenity (26, 27).

1.2.3.1. Biotransformace Sudanu I

Po orálním podávání Sudanu I králíkům byly v moči, žluči a výkalech nalezeny konjugáty *p*-aminofenolu (44%), *o*-aminofenolu (0,5%) a anilinu (1,1%). Ve formě konjugátů se tedy převážně vylučují metabolity vzniklé azoredukci, která probíhá pravděpodobně ve střevech díky mikroflóře (9, 20). Dále byly v moči nalezeny také hydroxyderiváty :

- a) 1-(4-hydroxyfenylazo)-2-hydroxynaftalen (4'-OH Sudan I)
- b) 1-(fenylazo)-2,6-dihydroxynaftalen (6-OH Sudan I)
- c) 1-(4-hydroxyfenylazo)-2,6-dihydroxynaftalen (4',6-di OH Sudan I).

Tyto hydroxyderiváty byly nalezeny ve formě konjugátů nebo bez konjugace (1,5% přeměněného Sudanu I ve formě volného 4'-OH Sudanu I). Přesto je 80% přeměněného Sudanu I vylučováno ve formě konjugátů (O-nebo N-glukuronáty, N-acetyly, sulfáty). Močí bylo vylučováno pouze 1,2% nepřeměněného Sudanu I (9, 20, 15).

Kromě toho, že Sudan I vyvolává nádory jater a močového měchýře u potkanů, myši a králíků, je také pozitivní při Amesově testu na mutagenitu (8) a *in vivo* testu na genotoxicitu („bone marrow micronucleus assay“), sledujícím tvorbu mikrojadérek v erytrocytech produkovaných kostní dření u potkanů a myši (28, 29).

Jelikož Sudan I vyvolává nádory jater a močového měchýře, a jelikož sám není ultimativním karcinogenem je pravděpodobně v těchto orgánech metabolisován (jak detoxifikován tak také aktivován). V játrech, vzhledem k vysoké koncentraci cytochromů P450, je metabolisován právě těmito enzymy (30, 31). V močovém měchýři je koncentrace cytochromů P450 velmi nízká, ale zato se zde vyskytuje značné množství peroxidas. Je tedy pravděpodobné, že Sudan I (popř. jeho metabolity) jsou zde metabolisovány peroxidasami (30, 31, 32, 33).

Přeměna Sudanu I byla skutečně pozorována v systému peroxidas (např. křenová peroxidasa / H₂O₂). Jedná se o reakci s pH optimem v alkalické oblasti. Při pH = 4,7 dochází k přeměně 20% Sudanu I peroxidasovým systémem na čtyři produkty (především benzendiazoniový ion (BDI) a v menší míře C-hydroxyderiváty), při pH = 8,4 je přeměňováno více než 85% Sudanu I na deset produktů. Čtyři z nich jsou stejné jako při pH = 4,7, ale dalších šest produktů zatím nebylo přesně identifikováno (32, 33). Jedním z cílů předkládané diplomové práce bylo proto produkty oxidace

Sudanu I peroxidasami charakterizovat. V přítomnosti NADH v reakčním médiu dochází kromě metabolisace Sudanu I také k oxidaci samotného NADH za vzniku NAD⁺. Tato oxidace není způsobena přímou enzymovou katalýzou, ale pravděpodobně redukcí reaktivních metabolitů Sudanu I. NADH by tedy mohlo v organismu působit jako ochranné agens nukleových kyselin proti modifikaci reaktivními metabolity Sudanu I, které vznikají působením peroxidasového systému (32, 33).

1.2.3.2. Adukty Sudanu I aktivovaného cytochromy P450 a peroxidasami s DNA, RNA a nukleotidy

V průběhu metabolismu Sudanu I mikrosomálními cytochromy P450 je Sudan I oxidován na C-hydroxyderiváty (viz kapitola 1.2.3.1.). Vedle nich je ze Sudanu I tvořen i produkt jeho oxidačního štěpení, benzendiazoniový ion (BDI) (26, 30, 31, 34).

Oxidací Sudanu I cytochromy P450 dochází k tvorbě aduktů s DNA, RNA a proteiny (26, 30, 34, 35, 36, 37). BDI je reaktivním metabolitem zodpovědným za iniciaci neoplastických procesů v játrech experimentálních zvířat (potkanů). Majoritním aduktem tvořeným z BDI v DNA *in vitro* i *in vivo* je 8-fenylazoguanin (26, 30). Majoritním cytochromem P450 aktivujícím Sudan I za tvorby tohoto aduktu je lidský CYP 1A1, menší a důležitou roli hraje i CYP 3A4 (26, 27).

Tvorba aduktů s DNA, RNA a proteiny byla detekována i při aktivaci Sudanu I peroxidasami (32, 33, 36 - 40). Deoxyguanosin a guanosin jsou cílovými nukleosidy, na které je Sudan I aktivovaný peroxidasami vázán (37, 41). Naproti tomu, že majoritní adukt tvořený ze Sudanu I aktivací cytochromy P450 byl již identifikován (8-fenylazoguanin) (26, 30), adukty tvořené z tohoto karcinogenu po aktivaci peroxidasami a guanosinovými zbytky v DNA dosud nebyly strukturně charakterizovány. Dalším z cílů předkládané diplomové práce bylo tedy přispět také k této doposud stále otevřené otázce.

1.3. Peroxidasy

Schopnost některých bílkovin reagovat s peroxidem vodíku, za vzniku silného oxidantu, byla jednou z nejdříve objevených katalytických aktivit proteinů. Poprvé ji popsal Planche v roce 1810, když zkoumal zmodrání alkoholické tinktury z guaiakolové pryskyřice, působením různých rostlinných materiálů včetně extraktu kořene křenu (42). Takové reakce jsou dnes přičítány aktivitám peroxidas.

Peroxidasy, systematickým názvem (donor:hydroperoxid oxidoreduktasy, EC 1.11.1.7.) jsou enzymy, katalyzující oxidoredukční reakce. Enzymy, které redukují peroxid vodíku (nebo jiné hydrogenperoxydy) za současné oxidace jiné látky (endogenní nebo xenobiotika). Funkcí společnou pro všechny peroxidasy je schopnost detoxikovat peroxid vodíku. Spektrum látek, které se spoluúčastní rozkladu peroxidu vodíku je velmi široké. Svou širokou substrátovou specifitou se peroxidasy blíží MFO systému obsahujícímu cytochrom P450. Substráty mohou být látky organické i anorganické. Mezi nejlepší substráty peroxidas však patří fenoly a aromatické aminy (32, 43).

Produkty reakcí katalyzovaných peroxidasami jsou ještě nespecifičtější v porovnání s MFO systémem. To znamená, že produkty tvořené při katalýze peroxidasami jsou ještě rozmanitější.

Typickou vlastností peroxidas je velké množství různých typů reakcí, kterými substráty přeměňuje :

1. oxidace halogenidů (myeloperoxidasa)
2. halogenace a dehalogenace (halogenperoxidasy, thyroid peroxidasa)
3. dekarboxylační reakce (např. u kyseliny indolyloctové)
4. oxidační štěpení azoskupiny (vzniká diazoniový ion)
5. oxidační polykondenzace fenolu a jeho derivátů (takto vzniká lignin - podpůrná struktura dřeva a tuhých částí rostlin)
6. oxidační kondenzace aromatických aminů
7. klasické peroxidasové redoxní reakce (hlavně u hydrofobních látek)

1.3.1. Klasifikace a charakterizace peroxidas

Pro peroxidasy je charakteristická jednoelektronová oxidace. Může také dojít k dehydrogenaci. Jedním elektronem redukována forma peroxidasy reaguje s peroxidem vodíku za vzniku oxyperoxidasy. Tato forma pak může katalyzovat oxygenační či hydroxylační reakce.

Jednotlivé peroxidasy jsou označovány podle zdroje, z něhož se získávají (křenová peroxidasa, myeloperoxidasa, laktoperoxidasa, eosinofilperoxidasa, peroxidasa z podzemnice olejné), podle substrátu, který přeměňují (chlorperoxidasa, bromperoxidasa, thyroidperoxidasa, glutathionperoxidasa, ligninperoxidasa, cytochrom c peroxidasa, askorbátperoxidasa, thioredoxinperoxidasa, NADH peroxidasa), podle charakteristické prosthettické skupiny (manganperoxidasa), a nebo podle vznikajícího produktu (prostaglandin H synthasa).

Peroxidasy se dělí do dvou základních superrodin :

- a) superrodina rostlinných peroxidas
- b) superrodina živočišných peroxidas

Na základě sekvenční homologie, Welinder navrhl rozdělení superrodiny rostlinných peroxidas do tří tříd :

třída I – intracelulární peroxidasy prokaryotického původu

třída II – intracelulární peroxidasy hub

třída III – sekreční rostlinné peroxidasy (44, 45)

1.3.1.1. Peroxidasy rostlin, hub a bakterií

třída I

Do této třídy patří například kvasinková cytochrom c peroxidasa, bakteriální katalasa-peroxidasa. Peroxidasy, které patří do této skupiny neobsahují disulfidické můstky, sacharidy, Ca^{2+} ani signální peptid pro sekreci (46).

třída II, III

Ačkoliv jsou peroxidasy II. a III. třídy odlišně lokalizovány, obsahují cysteylové zbytky a tvoří tak disulfidické můstky (zajištění stability proteinu) (44 a 46), signální

peptid pro sekreci (44), 2 Ca^{2+} , které jsou nezbytné pro správné strukturní uspořádání v okolí hemu (47) a na povrchu jsou glykosylovány (44). Peroxidasy hub (třída II), až na jednu výjimku (1 izoenzym ligninperoxidasa), neobsahují tyrosylové zbytky (46).

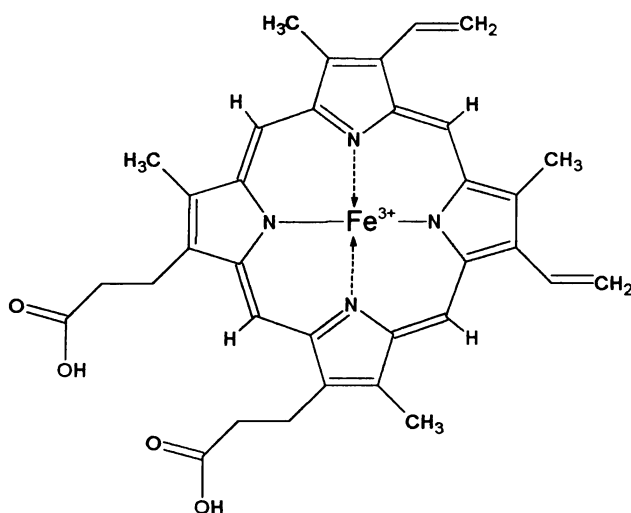
Do II. třídy řadíme například ligninperoxidasu, do třídy II také patří asi nejznámější a nejprostudovanější křenová peroxidasa (horseradish peroxidase) (HRP). Porovnání aminokyselinové sekvence ukazuje, že hemové peroxidasy rostlin, hub a bakterií jsou evolučně příbuzné (44, 45, 47).

1.3.1.2. Živočišné peroxidasy

Jedná se o úzce příbuzné hemové peroxidasy, které byly detekovány ve žlázách a žlázových sekretech. Příkladem jsou laktoperoxidasa (LPO), thyroïdperoxidasa, myeloperoxidasa (MPO) a prostaglandin endoperoxid synthasa (prostaglandin H synthasa) (PHS) (48).

1.3.1.3. Dělení peroxidas dle struktury

Jiné třídění peroxidas vychází z jejich struktury. Peroxidasy jsou většinou hemoglykoproteiny (49), jejichž prosthetickou skupinu tvoří převážně ferriprotoporfyrin IX. (Obr.1). Železo této skupiny je pentakoordinované (50, 51), přičemž pátý ligand tvoří dusík histidylového zbytku proteinové části enzymu. Existují peroxidasy s pozměněným porfyrinovým skeletem nebo dokonce může i chybět. V takových peroxidasach jsou přítomny například ionty manganu (Mn^{2+}) nebo vanadu (V^{5+}) (52).



Obr. 1. Ferriprotoporfyryl IX

Právě podle charakteru aktivního místa jsou peroxidasy členěny do tří skupin na :

- hemové peroxidasy
- vanadové peroxidasy
- ostatní peroxidasy

Obsah sacharidů se u jednotlivých peroxidas značně liší. Relativní molekulová hmotnost funkční peroxidasy se pohybuje v rozmezí 42-158 kDa (52).

Proteinovou část enzymu tvoří jeden nebo více polypeptidových řetězců. Řada peroxidas tvoří kovalentní dimery spojené disulfidickými můstky (např. myeloperoxidasa, prostaglandin H synthasa) (53).

O peroxidasach je obecně známo, že se vyskytují ve velkém množství forem (pravděpodobně izoenzymů). Příkladem může být křenová peroxidasa, která se vyskytuje ve 14 formách, laktoperoxidasa v 6 až 10, myeloperoxidasa ve 3 (52, 54, 55). Jedná-li se skutečně o izoenzymy, které jsou dány i geneticky podmíněnými rozdíly v primární sekvenci aminokyselin nebo pouhé formy vzniklé posttranslačními modifikacemi, není známo. Uvažuje se, nejedná-li se o arteficiální rozdíly způsobené extrakcí, izolací či stanoveními (56).

1.3.2. Lokalizace peroxidas

1.3.2.1. Rostlinná buňka

V rostlinných tělech je zastoupení peroxidas bohaté. Mohou být buď volné (obsažené v cytoplazmě, vakuolách, mezibuněčném prostoru) nebo vázané (v buněčné stěně, plazmatické membráně nebo organelových membránách). Vazba může být iontová, ale také kovalentní. Distribuce souvisí s bazicitou izoenzymů. Ve volné formě jsou především aniontové izoenzymy, zatímco kationtové jsou spíše vázané (57).

1.3.2.2. Živočišná buňka

Aktivita peroxidas živočišných buněk byla zjištěna v cisternách endoplazmatického retikula a v Golgiho aparátu. Prostřednictvím tohoto aparátu se peroxidasy transportují a zároveň je zde ukončena jejich biosyntéza glykosylací.

1.3.2.3. Živočišné tkáně

V živočišných tkáních se peroxidasy vyskytují v menší míře než u rostlin. Peroxidasa je však hojněji zastoupena v kostní dřeni, mozku a myelinových pochvách nervů (myeloperoxidasa). Je přítomna také v granulocytech a monocytech, kde zodpovídá za baktericidní schopnosti těchto buněk. Buňky štítné žlázy obsahují thyroïdperoxidasu, která se účastní biosyntézy hormonu thyroxinu. Mléčné a slinné žlázy obsahují laktoperoxidasu, která rovněž vykazuje baktericidní účinky. Močový měchýř, prostata a semenné vajíčky jsou bohaté hlavně na prostaglandin H syntasus. Tento enzym je zapojen do biosyntézy prostaglandinů, tromboxanů a prostacyklinů.

1.3.2.4. Rostlinná pletiva

Všechna rostlinná pletiva (kořeny, stonky, listy, jehlice atd.) obsahují peroxidasy. Je zajímavé, že peroxidasová aktivita v rostlinách se zvyšuje v průběhu stárnutí a jako reakce na stres (virové mikrobiální infekce, zasolení atd.) (58). Další funkcí peroxidas v rostlinách je zapojení do regulace růstu. Nižší růst je spojen s vyšší peroxidasovou aktivitou. Peroxidasy zřejmě soustavou reakcí regulují hladinu

růstového hormonu auxinu (54). Jsou rovněž klíčovými molekulami v procesech rychlé adaptace rostlin při změně vnějšího prostředí (59).

Peroxidasy lokalizované v buněčné stěně se podílejí na vychytávání volných radikálů, které ničí membrány. Hrají také významnou roli při všech oxidačně - kondenzačních procesech. Při růstu buněčné stěny jsou do ní upevňovány monomery, které se prostřednictvím peroxidasy řetězí, pak zesítují a tak formují matrix buněčné stěny. Jiné peroxidasy, sekretované dřevokaznými houbami (*Phanerochate chrysosporium*) (60) jsou zase schopné degradovat lignin na nízkomolekulární látky využitelné pro jejich metabolismus.

Rostlinné peroxidasy vykazují jasnou příbuznost, jak vyplývá z jejich aminokyselinových sekvencí. Peroxidasy z křenu, tuřínu, tabáku a brambor jsou homologní v rozmezí 36-50% (61). Mezi kationtovou peroxidasou z ředkve a křenovou peroxidasou typu C byla dokonce nalezena 73-81% homologie. Kationtové izoenzymy peroxidasy jsou více konzervovány během evoluce než aniontové.

1.3.3. Reakce katalyzované peroxidasami

1.3.3.1. Reakce využívající H_2O_2 bez přítomnosti O_2

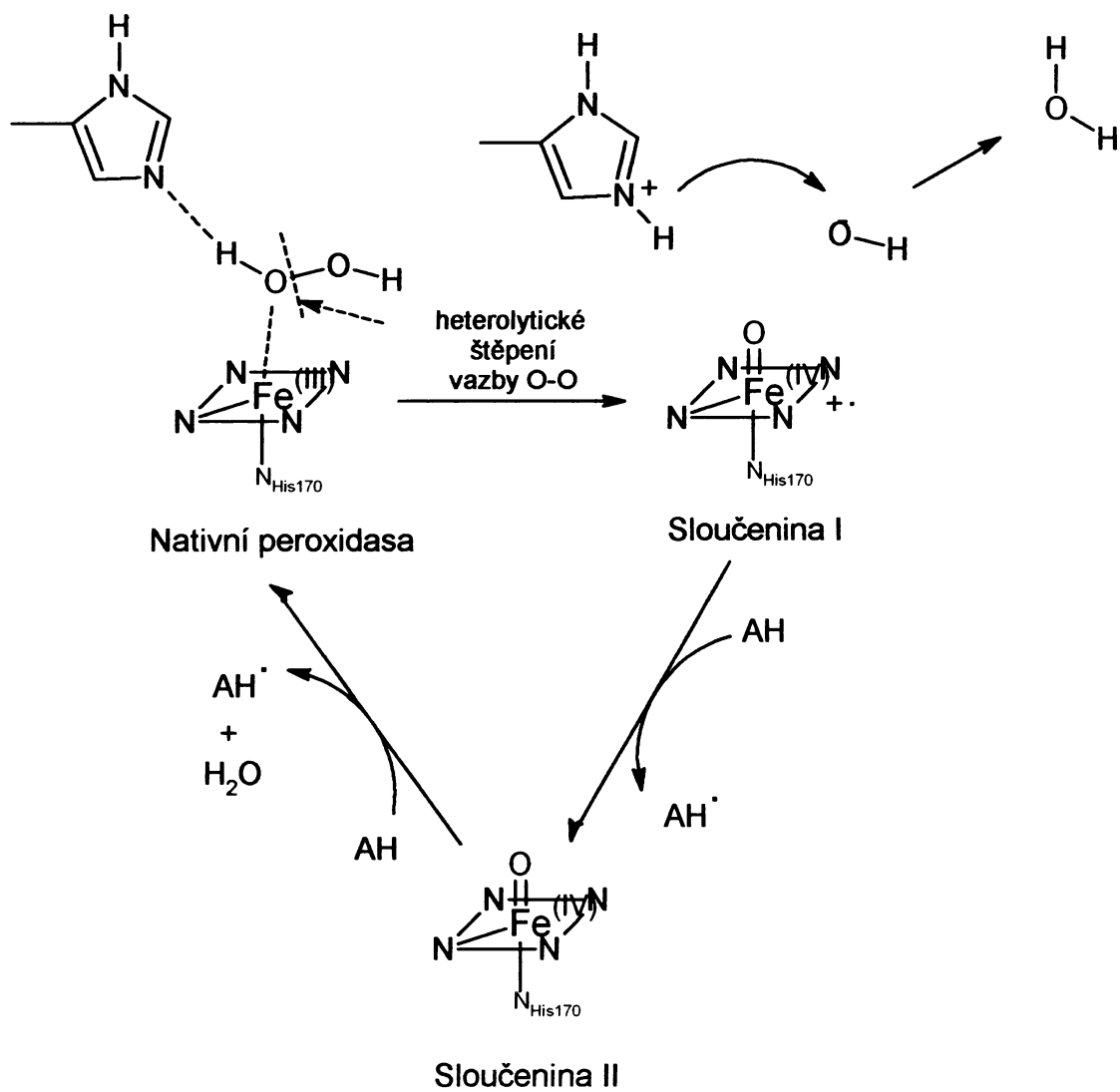
Navázání peroxidu vodíku nebo jiného peroxidu na nativní peroxidasu se enzym aktivuje. Vzniká Sloučenina I, která je o dva oxidační ekvivalenty nad nativním enzymem (62, 63) (Obr. 2). Tato sloučenina nese aktivovaný kyslík. V nativní peroxidase je železo pentakoordinované (50, 51), proximální ligand je dusík histidinu. Po reakci s peroxidem vodíku vzniká ferryIporfyrinový π - kation radikál (Sloučenina I), ve kterém je na místě šestého ligandu vázán aktivovaný kyslík. Protože železo v oxidačním čísle V není stálé, vyskytuje se ve Sloučenině I v oxidačním čísle IV a chybějící ekvivalent je přítomný buď na hemu (případ Sloučeniny I) nebo na aminokyselinovém zbytku proteinu - nejčastěji Trp, Tyr.

Reakcí Sloučeniny I se substrátem dojde k „vytržení“ elektronu ze substrátu a vzniká Sloučenina II (62, 63) a radikál substrátu. Tímto elektronem se doplní deficit na porfyrinovém skeletu nebo na aminokyselinovém zbytku. Bylo zjištěno, že Sloučenina I oxiduje substrát 10 - 100 krát rychleji než Sloučenina II (64).

Cyklus se uzavírá reakcí Sloučeniny II s další molekulou substrátu, přičemž se obnoví peroxidasa v základním stavu (Obr. 2)

Kinetika katalýzy peroxidasami odpovídá modifikovanému ping - pongovému mechanismu, kterého se účastní dvě molekuly redukčního a jedna molekula oxidačního substrátu (52, 65). Oxidace substrátu peroxidasami nastane dvěma jednoelektronovými přenosy. Existují však i výjimky. Bylo zjištěno, že jodid je oxidován Sloučeninou I thyroid peroxidasy reakcí přenášející dva elektrony. V tomto případě není Sloučenina II intermediát. Podobně mohou být oxidovány aromatické sulfidy na sulfoxidy (66).

Stabilita Sloučeniny I závisí na množství peroxidu vodíku a přítomnosti dalších substrátů. Bez redukčního substrátu je peroxidasa velkým množstvím peroxidu degradována.



Obr. 2. Základní reakční mechanismus peroxidasy v přítomnosti H₂O₂, se zobrazením funkce histidylového zbytku (67)

2. CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem předkládané diplomové práce bylo přispět k poznání oxidace karcinogenního azobarviva Sudanu I křenovou peroxidasou a participace této sloučeniny na tvorbě aduktů s deoxyguanisinem a guanosinem. Diplomová práce byla řešena jako součást grantu GA UK (241/2001).

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Použité přístroje

analytické váhy (Pesa, 40SM – 200A)

předvážky (Kern EW 600 – 2M)

pH – metr (ATI Orion, model 370 s kombinovanou elektrodou)

centrifuga (Sanyo Microcentaur MSE, úhlový rotor)

centrifuga (MLW T52,2 s výkyvným rotorem)

sonikátor Teson (Tesla)

inkubátor 624 Environmental Incubator Shaker (New Burnsvik Scientific)

míchačka (Minishaker MS 1) (Scholler pharma Prague)

spektrofotometr (Diod Array 8453, Hewlett – Packard)

vakuová miniodparka DNA (Speed Vac) (DNA 110, Savant)

Finnigan MAT Incos 50 (Scientific Instrument Services)

Esquire 3000 (Bruker Daltonics)

Degasys DG – 1210 (Dionex Softron)

HPLC Pump Series P 580 (Dionex Softron)

ASI – 100 Automated Sample Injection (Dionex Softron)

Column Oven LCO 101 (ECOM spol. s.r.o.)

Detektor UVD 170S/340S (Dionex Softron)

3.2. Použitý materiál a chemikálie

Chemikálie a materiál, které byly použity v experimentech, pocházejí z těchto zdrojů :

FLUKA, Švýcarsko

Peroxidase from horseradish, methanol (MetOH)

LACHEMA BRNO, Česká republika

Amoniak, dihydrogen-fosforečnan sodný dihydrát, hydrogen-fosforečnan sodný dodekahydrát, ethanol, ethylester kyseliny octové, methanol, hydroxid sodný, kyselina chlorovodíková, peroxid vodíku koncentrovaný, N-butylalkohol, N-propylalkohol, tetraboritan sodný dekahydrát, hexan, diethyléter

MERCK, Německo

Tenké vrstvy silikagelu pro TLC (60 F₂₅₄), ethylester kyseliny octové

SERVA HEIDELBERG, Německo

2'-deoxyguanosin

SIGMA, USA

Guanosin 5' monofosfát, DMSO

BRITISH DRUG HOUSES, Poole, Velká Británie

Sudan I

KAVALIER, Česká republika

hliníkové desky s 1mm vrstvou silikagelu pro TLC

3.3. Použité metody

3.3.1. Oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou

Tvorba produktů oxidace Sudanu I peroxidasou křenu selského (HRP) za přítomnosti peroxidu vodíku jako dalšího substrátu probíhala v inkubační směsi o celkovém objemu 70 ml o složení 100 μM Sudan I (zásobní roztok 5 mM v methanolu), 0,5 μM HRP a 200 μM H_2O_2 . Směs byla doplněna do celkového objemu sodno-fosfátovým pufrem (pH=8,4) do výsledné koncentrace 10 mM.

Inkubace byla prováděna paralelně ve čtyřech Erlen-Mayerových baňkách. Do každé baňky byl přidán sodno-fosfátový pufr a roztok HRP. Směs byla preinkubována při 37°C 10 minut. Poté byl rychle přidán roztok H_2O_2 a roztok Sudanu I. Inkubační směs byla dokonale promíchána a inkubována 20 minut za stejných podmínek jako při preinkubaci. Reakce byla zastavena přidáním 15 ml ethylacetátu. Sudan I i jeho metabolity byly extrahovány do ethylacetátu. Po důkladném protřepání směsi byl proces oddělování vodné a organické fáze urychlen odstředěním v centrifuzě při 3000 RPM po dobu 5 minut. Po centrifugaci byla z reakční směsi oddělena organická fáze s extrahovanými produkty a extrakce vodné fáze 10 ml ethylacetátu byla opakována. Spojené organické fáze byly odpařeny na vakuové odparce DNA SpeedVac do sucha.

3.3.2. Separace produktů oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou na tenké vrstvě

Odparek obsahující nezreagovaný Sudan I a jeho oxidační produkty se rozpustil v minimálním množství methanolu a byl aplikován na tenkou vrstvu silikagelu (1 mm) na hliníkové desce. Jednotlivé vzorky byly nanášeny 2 cm od dolního okraje desky a 1,5 cm od sebe, nebo v jedné „čáře“ pro separaci většího množství metabolitů. Poté byla deska se vzorky důkladně vysušena. Produkty oxidace Sudanu I byly separovány ve vyvíjecím tanku směsí rozpouštědel diethyléter:hexan v poměru 3:1. Metabolity Sudanu I byly mechanicky separovány a extrahovány ze

silikagelu do malého množství methanolu a následně odpařeny a uchovány při (-18°C) a bez přístupu světla pro analýzu hmotnostní spektrometrií.

3.3.3. Rozdělení produktů oxidace Sudanu I pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

K separaci produktů oxidace Sudanu I byla použita metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC).

Chromatografie je separační proces, při kterém se látky dělí mezi stacionární a mobilní fázi na základě fyzikálně-chemických interakcí. Separace slouží ke dvěma účelům. Buď se používají pro izolaci čistých látek – preparativní chromatografie, nebo se látky dělí pro analytické stanovení - analytická chromatografie. Výhodou HPLC je možnost určovat v množstvích řádu nanogramů až pikogramů (68).

Přístroj používaný k analýze sestává z „degaséru“, pumpy, automatického dávkovače vzorku, zařízení pro vyhřívání kolony, detektoru a počítače na vyhodnocení a zpracování dat. Pro zpracování dat byl použit program Chromeleon(c) Dionex 2001; Version 6. 40 SP2 Build 731. Pro separace byly užity kolony : Watrex Nucleosil 250*8mm,C18; Tessek Separon Hema S 1000 250*8 mm, C18 (Česká republika); Tessek Separon SGX Phenyl 250*8 mm, C18 (Česká republika); Machery – Nagel Nucleosil 100 250/4, C18 (Německo).

Vzorky připravené inkubací a odpařené na přístroji DNA Speed Vac byly rozpuštěny v minimálním množství methanolu. Vzorek byl aplikován na kolonu pomocí „autosampleru“. Množství vzorku aplikovaného na kolonu se pohybovalo v objemu od 40 µl do 250 µl vzorku. Kolona byla vyhřívána na 37°C. Složení mobilní fáze odpovídalo 75% methanolu ve vodě, a pomocí gradientu se měnilo složení mobilní fáze až na 100% methanolu. Průtoková rychlost mobilní fáze odpovídala 0,3 ml/min, v závislosti na použitém gradientu pak byla zvýšena až na 1,5 ml/min. Mobilní fáze byly před použitím „sonikovány“ pro odstranění vzduchu. K detekci jednotlivých složek vzorkové směsi bylo použito vlnových délek: 215 nm, 254 nm, 333 nm a 480 nm. Jednotlivé frakce vzorku byly „sbírány“ do plastových

zkumavek (Eppendorf) a následně odpařeny na přístroji DNA SpeedVac, a poté byly uchovány při teplotě -18°C pro následnou analýzu.

3.3.4. Analýza produktů Sudanu I pomocí hmotnostní spektrometrie

Charakterizace neznámých metabolitů Sudanu I byla provedena pomocí hmotnostní spektrometrie. Hmotnostní spektra byla měřena na katedře organické chemie PŘF UK RNDr. M. Štíchou na přístroji Esquire 3000 Bruker Daltonics. Techniky APCI (chemická ionizace za atmosferického tlaku) a ESI (ionizace „elektrosprejem“) byly použity v tomto případě analýzy

3.3.5. Analýza produktů Sudanu I pomocí nukleární magnetické rezonance

Charakterizace neznámých produktů Sudanu I aktivovaného peroxidasou byla provedena pomocí ^1H NMR. Analýza byla měřena na katedře organické chemie PŘF UK Doc. J. Sejbalem na přístroji Varian UNITY-INOVA 400FT při 400 MHz

3.3.6. Aktivace Sudanu I peroxidasou a vazba reaktivních metabolitů na deoxyguanosin a guanosin

Tvorba aduktů peroxidasou aktivovaného Sudanu I s deoxyguanosinem a guanosinem probíhala v inkubační směsi o celkovém objemu 1 ml ve složení 100 - 600 μM Sudan I, 3 μM HRP, 1000 μM H_2O_2 a 500–5000 μM nukleosid (guanosin nebo deoxyguanosin). Směs byla doplněna do celkového objemu fosfátovým pufrům na koncentraci 10 mM (pH=8,4).

Inkubace byla prováděna paralelně ve dvou plastových zkumavkách (Eppendorf). Do každé byl přidán fosfátový pufr, roztok příslušného nukleosidu a roztok HRP. Směs byla preinkubována při 37°C 10 minut. Pak byl rychle přidán roztok H_2O_2 a roztok Sudanu I. Inkubační směs byla promíchána a inkubována 20 minut za stejných podmínek jako při preinkubaci. Reakce byla zastavena přidávkem 0,5 ml

ethylacetátu. Sudan I i jeho metabolity byly extrahovány do ethylacetátu. Po důkladném protřepání směsi byl proces oddělování vodné a organické fáze urychlen odstředěním v centrifuze při 3000 RPM po dobu 5 minut. Po centrifugaci byla oddělena organická fáze a extrakce vodné fáze ethylacetátem byla opakována. Spojené organické fáze byly odpařeny na přístroji DNA SpeedVac.

3.3.7. Chromatografie aduktů na TLC

K separaci aduktů Sudanu I s nukleosidy po aktivaci peroxidasou byla použita chromatografie na silikagelu 60 F₂₅₄. Vzorek byl nanesen pomocí mikropipety (2,5 µl na skvrnu) a následně vyvinut v chromatografickém boxu mobilní fází. Mobilní fáze obsahovala tyto chemikálie: n-butanol, n-propanol, koncentrovaný amoniak a destilovanou vodu v poměru 16:12:2:10 (v/v).

Po vyjmutí z chromatografického boxu byl chromatogram vysušen. Skvrny Sudanu I, jeho metabolitů a aduktů s nukleosidy absorbují ve viditelné oblasti, tudíž byly patrné pouhým okem. Skvrna odpovídající nezreagovanému nukleosidu byla detekována pomocí UV lampy při 254 nm, jako tmavá skvrna zhášející fluorescenci barviva fixovaného na silikagelu. Barevné zóny byly z desek mechanicky odstraněny a extrahovány 200 µl směsí koncentrovaného roztoku NH₃ s methanolem 1:50 (v/v). Silikagel byl odstraněn centrifugací (13000 RPM, 3 minuty). Výsledný extrakt byl odpařen na přístroji DNA SpeedVac a použit pro re-chromatografii. Skvrny odpovídající aduktům byly opět z TLC vrstvy extrahovány směsí koncentrovaného roztoku NH₃ a methanolu 1:50 (v/v).

3.3.8. UV/VIS a hmotnostní spektrometrie aduktů aktivovaného Sudanu I s deoxyguanosinem a guanosinem

Sloučeniny odpovídající aduktům aktivovaného Sudanu I s deoxyguanosinem a guanosinem byly analyzovány hmotnostní spektrometrií na přístroji Finnigan MAT Incos 50, který je plně automatizovaný a zahrnuje hmotnostní spektrometr a datový systém napojený na plynový chromatograf Varian 3400 GS, a charakterizovány UV/VIS spektry pomocí spektrofotometru Diod Array od firmy Hewlett Packard.

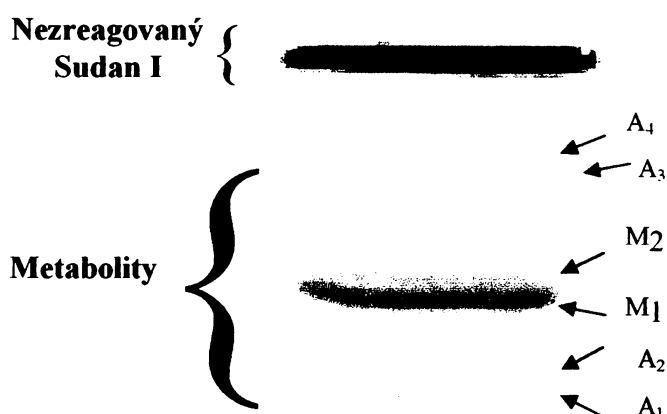
4. Výsledky

4.1. Oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou

Sudan I je oxidován křenovou peroxidasou v reakci, kde byl jako další substrát použit peroxid vodíku. Koncentrace peroxidu vodíku v inkubační směsi byla 200 μM . Jeho koncentrace tedy byla „dvojnásobná“ oproti Sudanu I (100 μM). Produkty oxidace byly z reakční směsi extrahovány ethylacetátem a dále separovány. Uvedené rozpouštědlo bylo pro extrakci použito vzhledem k hydrofobním vlastnostem Sudanu I, který je pravděpodobně ještě obsažen v reakční směsi spolu s metabolity, o jejichž hydrofobicitě lze rovněž uvažovat. Sudan I a jeho metabolity byly separovány pomocí tenkovrstvé chromatografie (TLC) na silikagelu a pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Obrázek 3. ilustruje separaci Sudanu I od jeho oxidačních produktů pomocí TLC na silikagelu.

4.1.1. Separace produktů oxidace Sudanu I peroxidasou pomocí TLC

Pilotní separační experimenty, při nichž byly použity tenké vrstvy silikagelu ukázaly, že Sudan I je přeměňován křenovou peroxidasou za vzniku dvou majoritních produktů M_1 a M_2 a čtyř metabolitů minoritních (A_1 , A_2 , A_3 a A_4) (Obr. 3.). Dva majoritní metabolity Sudanu I vzniklé peroxidasovou reakcí byly použity pro další charakterizaci.



Obr. 3. Separace produktů oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou. Experimentální podmínky: 100 μM Sudan I, 0,5 μM HRP, 200 μM H_2O_2 a sodno-fosfátový pufr, $\text{pH}=8,4$, jehož výsledná koncentrace v inkubační směsi byla 10 mM. Rozpouštědlová soustava pro vyvíjení TLC se skládala z diethylétheru a hexanu v poměru 3:1.

4.1.2. Separace produktů oxidace Sudanu I peroxidasou pomocí HPLC

K efektivnější separaci produktů oxidace Sudanu I peroxidasou byla užita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). V průběhu experimentální práce byla vyvinuta originální separační soustava pro HPLC efektivně separující Sudan I od jeho oxidačních produktů. Eluce byla prováděna pomocí gradientu methanolu v destilované vodě.

Separací směs pro HPLC byla míchána ze dvou fází A (75% MetOH v destilované vodě) a B (100% MetOH). Mobilní fáze byla připravena podle programu uvedeném v tabulce 1. a). V průběhu analýzy se měnila také průtoková rychlost v závislosti na programu uvedeném v tabulce 1.b). Při takto vytvořených podmínkách docházelo k nejefektivnější separaci produktů oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou.

Tab. 1. Program gradientové eluce metabolitů Sudanu I

a) závislost na složení mobilní fáze (A-75% MetOH v destilované vodě, B-100% MetOH)

b) závislost na rychlosti průtoku

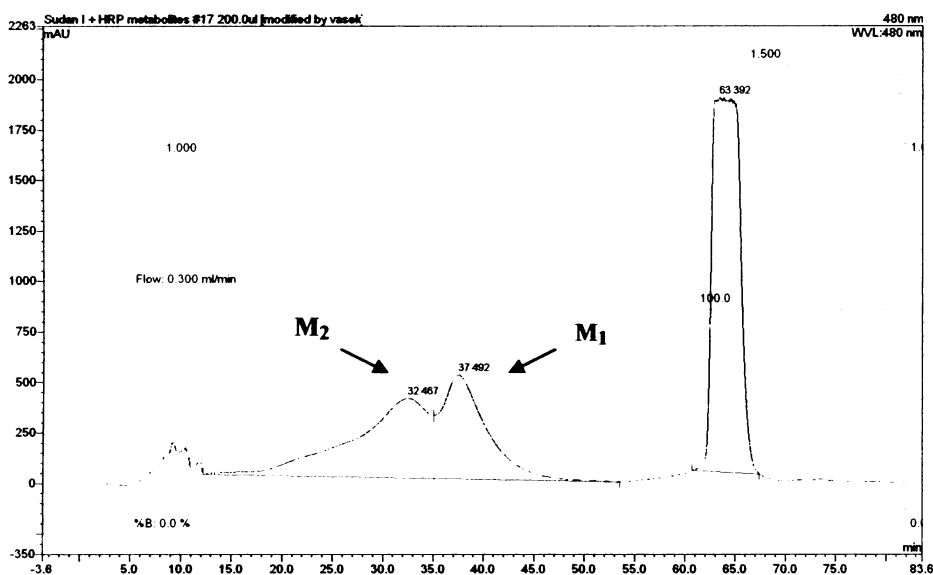
a)

Time (min)	%A	%B
0 – 51	100	0
51 – 61	0	100
61 – 81	0	100
81 – 82	100	0
82 – 83	100	0

b)

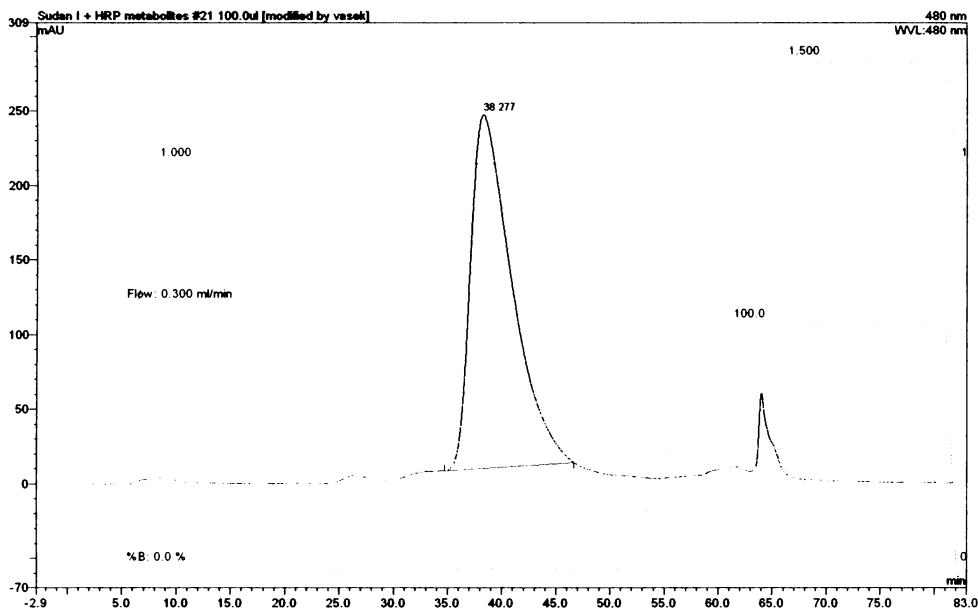
Time (min)	Flow (ml/min)
0 - 7	0,3
7 - 8	1,0
8 - 54	1,0
54- 66	1,5
66 - 81	1,5
81 - 82	0,3
82 - 83	0,3

Vysokoučinnou kapalinovou chromatografií byly danou rozpouštědlovou soustavou separovány dva majoritní metabolity Sudanu I, metabolity M_1 a M_2 . Eluovány byly v retenčních časech 32,46 minut a 37,49 minut. Residuální Sudan I byl eluován v čase 63,39 minut (Obr. 4.).

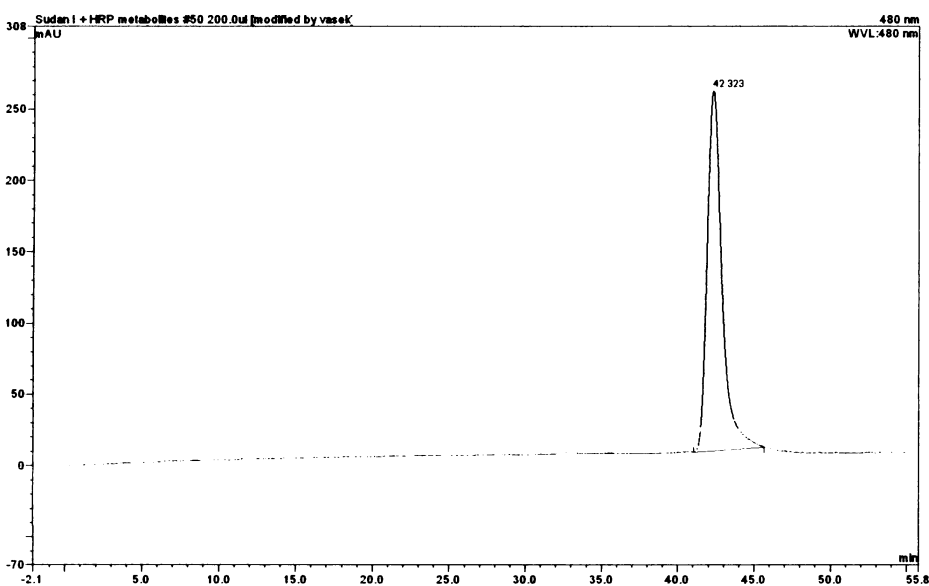


Obr. 4. Separace produktů oxidace Sudanu I pomocí HPLC. Podmínky HPLC: 75% - 100% methanol, průtoková rychlost 0,3 – 1,5 ml/min, $t = 37^{\circ}\text{C}$, aplikovaný objem vzorku na kolonu byl 200 μl , délka programu s gradientem 83 minut. Majoritní produkty oxidace Sudanu I jsou eluovány v retenčních časech 32,46 minut a 37,49 min.

Metabolit M₁ byl dále pomocí stejné metody re-chromatografován (Obr. 5.). Gradientovou elucí byl získán preparát, který neobsahoval ani metabolit M₂, ani residuální Sudan I (Obr. 5.). Chromatografická čistota tohoto preparátu (HPLC, isokratická eluce, 75% MetOH v destilované vodě) (Obr. 6.) byla 99,5 %. V případě metabolitu M₂, který byl při re-chromatografii nestabilní, byl pro další charakterizaci použit preparát získaný primární separací pomocí HPLC (Obr. 4.).



Obr. 5. Re-chromatografie (HPLC) metabolitu M_1 tvořeného ze Sudanu I peroxidasou (gradientová eluce). Podmínky HPLC: 75% - 100% methanol, průtoková rychlost 0,3 – 1,5 ml/min, $t = 37^\circ\text{C}$, aplikovaný objem vzorku na kolonu byl 200 μl , délka programu s gradientem 83 minut.



Obr. 6. Chromatogram metabolitu M_1 tvořeného ze Sudanu I peroxidasou dvakrát purifikovaného pomocí HPLC (isokratická eluce). Podmínky HPLC: 75% MetOH, průtoková rychlost 1 ml/min, $t = 37^\circ\text{C}$, aplikovaný objem vzorku na kolonu byl 200 μl , délka programu s isokratickou elucí byla 55 minut.

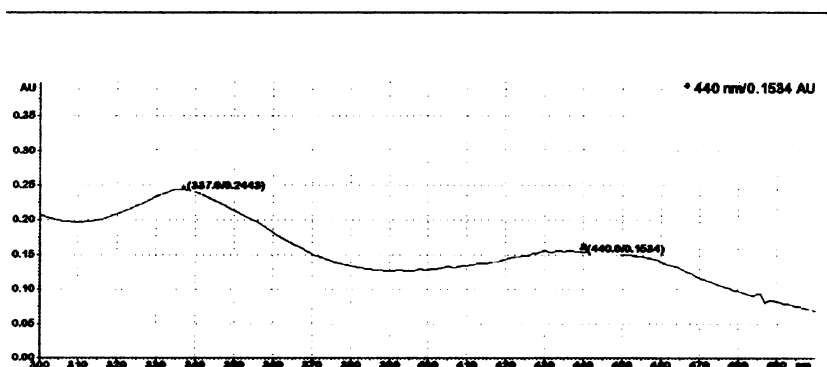
4.2. Spektrální charakterizace majoritních produktů oxidace Sudanu I peroxidasou

4.2.1. Charakterizace majoritních metabolitů Sudanu I pomocí UV/VIS spektrometrie

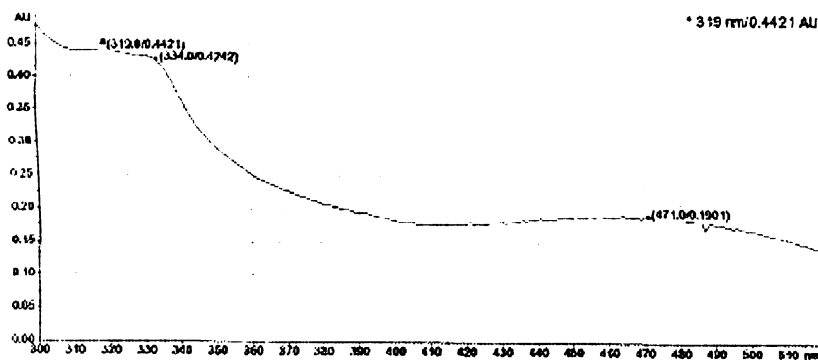
UV/VIS spektra majoritních metabolitů Sudanu I (M_1 a M_2) získaných separací inkubační směsi pomocí HPLC jsou uvedena na obrázcích 7. a 8.

Významné absorpční maximum metabolitu M_1 (Obr. 7.) ležící v okolí 340 nm odpovídá hodnotě azoskupiny (338 nm). Široký absorpční pás mezi 430 a 480 nm svědčí o přítomnosti struktury parentálního Sudanu I v metabolitu M_1 .

Také v případě metabolitu M_2 byl pozorován silný absorpční pás ve viditelné oblasti spektra s maximem okolo 470 nm (Obr. 8.). Ten ukazuje na přítomnost celé molekuly Sudanu I. Významné absorpční maximum metabolitu M_2 ležící v okolí 330 nm odpovídá hodnotě azoskupiny (338 nm).



Obr. 7. UV-VIS spektrum metabolitu Sudanu I M_1 tvořeného peroxidasou



Obr. 8. UV-VIS spektrum metabolitu Sudanu I M_2 tvořeného peroxidasou

4.2.2. Charakterizace majoritních produktů oxidace Sudanu I pomocí hmotnostní spektrometrie

Pro další charakterizaci metabolitů Sudanu I byla využita hmotnostní spektrometrie [APCI (chemická ionizace za atmosferického tlaku) a ESI (ionizace elektrosprejem)] v laboratoři katedry organické chemie PŘF UK, Dr. Martinem Štíchou.

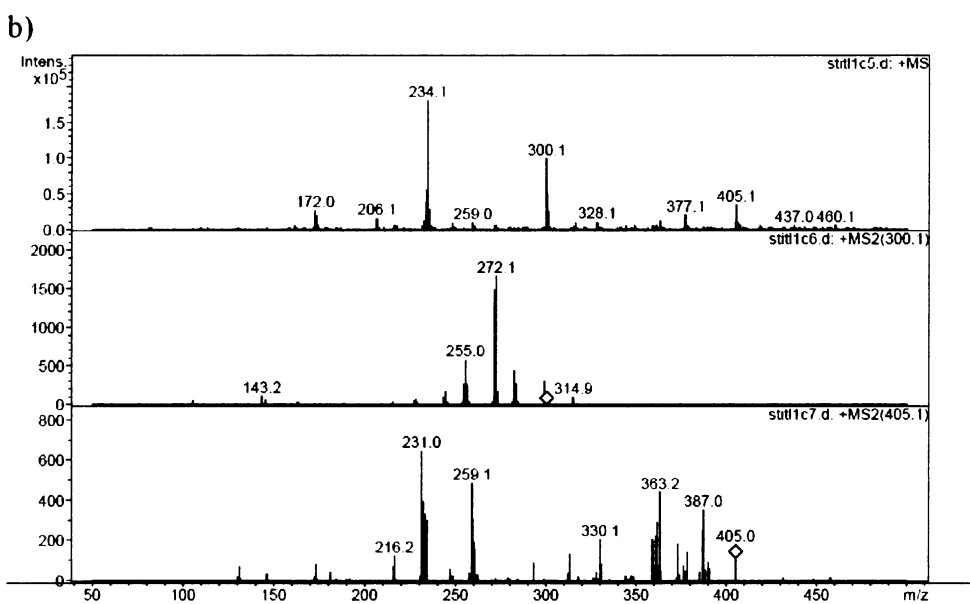
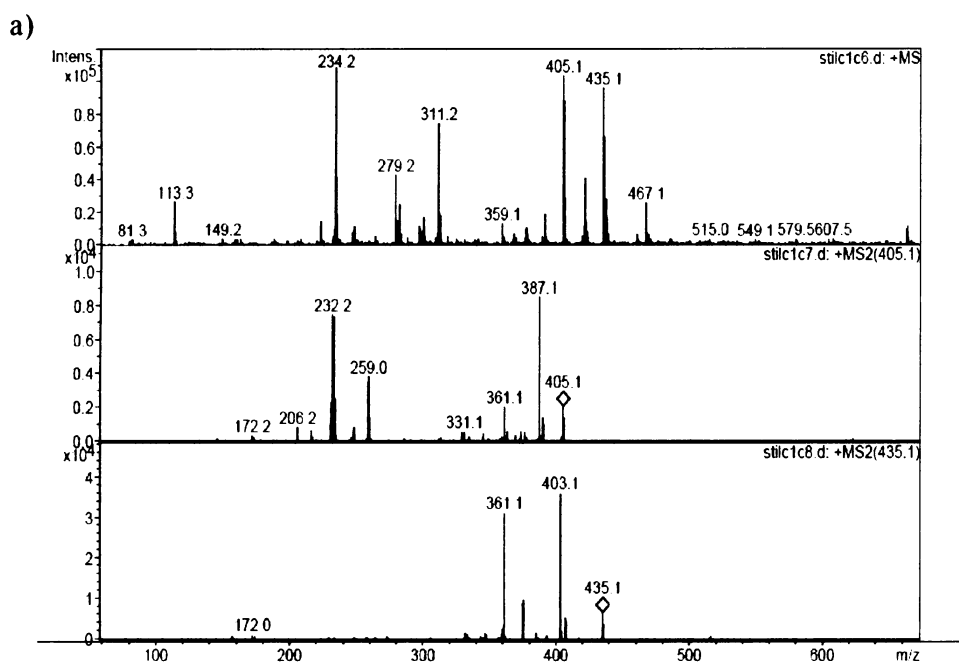
Obě metody použité k charakterizaci metabolitů Sudanu I tvořených peroxidasou (metabolity M_1 a M_2) nevedly k určení jejich finální struktury. Tato skutečnost pravděpodobně vyplývá z jejich nízké stability. Hmotnostní spektra obou metabolitů Sudanu I izolovaných pomocí TLC a HPLC a analyzovaných danými metodami jsou uvedeny v obrázcích 9.-12.

Signál s hodnotou 247,1 m/z v hmotnostním spektru metabolitu M_1 (ESI, pozitivní ionizace) (Obr. 10. a) indikuje přítomnost fragmentu odpovídajícího molekulové hmotnosti parentální molekuly Sudanu I. Fragment o hodnotě 405,0 m/z však indikuje přítomnost molekulového iontu sestávajícího z molekuly Sudanu I a další molekuly této sloučeniny, u které byl odštěpen benzenový kruh obsahující jeden atom dusíku (Obr. 10. b). Další z významných fragmentů detekovaný v obou typech hmotnostních spekter vykazuje hodnotu 387,1 m/z. Ta odpovídá dalšímu fragmentovanému iontu, ze kterého je oproti předchozímu, výše uvedenému iontu,

odštěpen ještě další atom dusíku. Všechny tyto skutečnosti svědčí o možnosti tvorby dimeru Sudanu I, vzniklého jednoelektronovou oxidací Sudanu I peroxidasou, jako metabolitu M_1 . Tvorba fragmentu o molekulové hmotnosti 232,1 m/z, odpovídající iontu Sudanu I zbaveného hydroxylové skupiny naznačuje, že hydroxylovaná skupina je stěžejní pro tvorbu předpokládaného dimeru. Primárně tvořený radikál Sudanu I jednoelektronovou oxidací peroxidasami, jehož tvorba byla prokázána v předchozích studiích (41, 70), může totiž atakovat další molekulu Sudanu I za tvorby dimeru. Molekulární „peak“ dimeru (494 m/z), který by plně potvrdil jeho tvorbu však žádnou z metod pro metabolit M_1 detekován nebyl (Obr. 9. a 10.).

Charakterizace dalšího produktu oxidace Sudanu I peroxidasou, metabolitu M_2 , hmotnostními analýzami jasně ilustruje, že tímto metabolitem je dimer Sudanu I. Jak v pozitivním tak negativním modu hmotnostní analýzy APCI byly detekovány „peaky“ odpovídající iontu dimeru Sudanu I (hodnoty m/z 493 a 495) (Obr. 11. c, 12. a). Navíc fragmenty o m/z 143, 159, 172, 233 (234), 247, 389 (391), 417 (419), detekované použitými hmotnostními analýzami, které odpovídají iontům postupného štěpení dimeru Sudanu I a této molekuly samotné, podporují tvorbu dimeru (Obr. 11. a, c, 12. a, b). Fragmentace molekuly Sudanu I s vyznačenými hodnotami molekulových hmotností je uvedena na obrázku 13. Ani v případě tohoto metabolitu (M_2), ani u metabolitu M_1 však nemůžeme odhadnout, v jakých polohách jsou obě molekuly Sudanu I v dimeru vázány (Obr. 14.). Vzhledem k odlišným vlastnostem, které jsou ilustrovány UV/VIS spektry i rozdílnými chromatografickými vlastnostmi obou metabolitů při TLC a HPLC, musí však být polohy vazby obou molekul Sudanu I v těchto metabolitech jednoznačně odlišné.

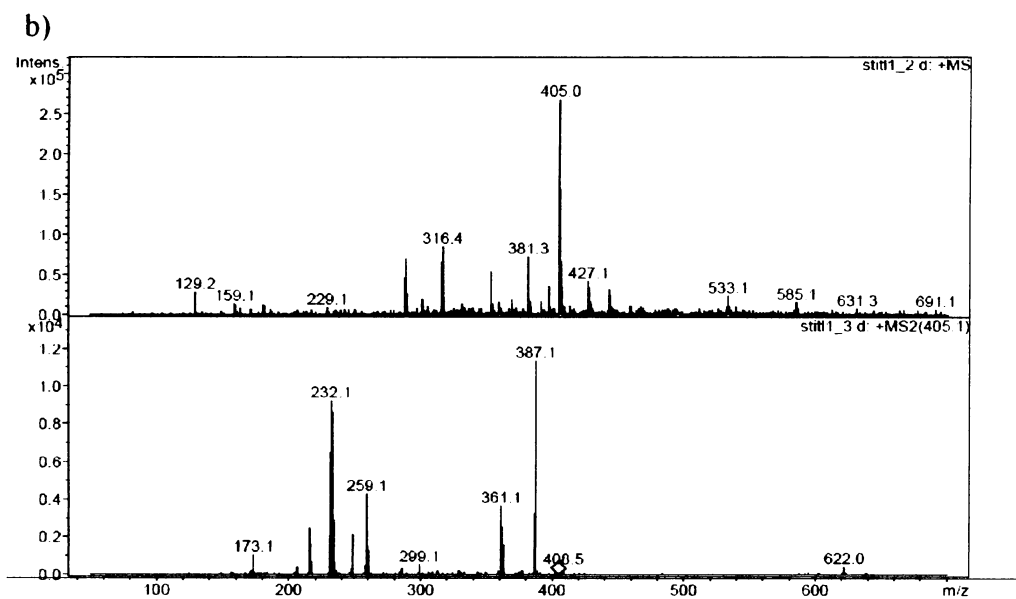
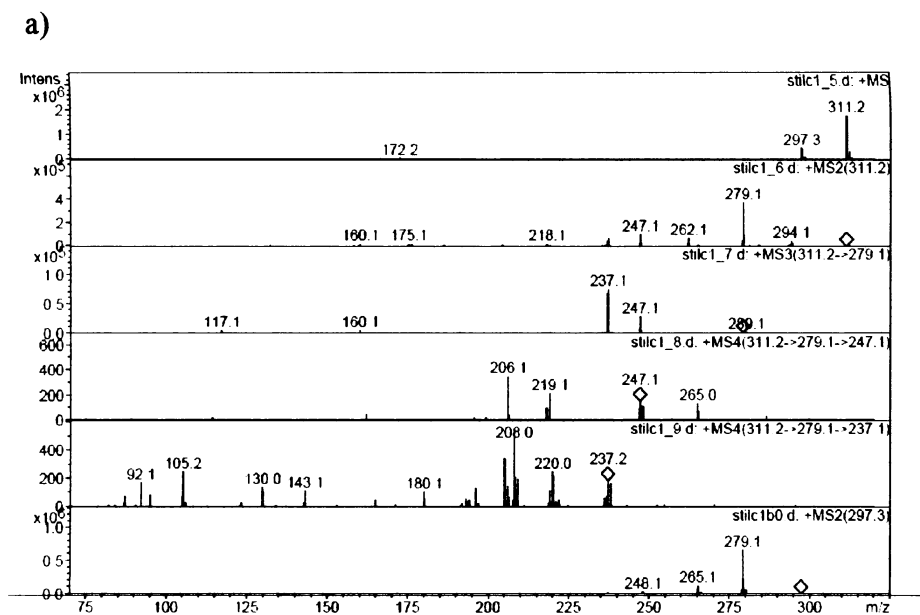
Možnost identifikace struktur dimerů Sudanu I tvořených jeho oxidací peroxidasou pomocí NMR nevedla k pozitivním výsledkům. Důvody jsou především v nedostatečném množství připravených metabolitů a jejich nestabilitě.



Obr. 9. Hmotnostní spektra metabolitu M_1 tvořeného oxidací Sudanu I peroxidasou detekovaná metodou APCI.

a) Metabolit M_1 získaný pomocí HPLC (pozitivní ionizace)

b) Metabolit M_1 získaný pomocí TLC (pozitivní ionizace)

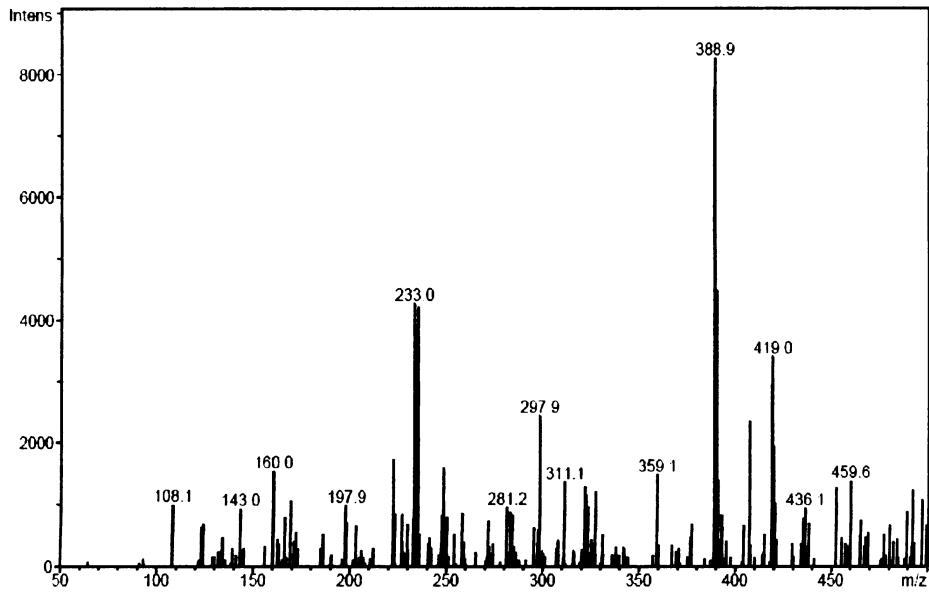


Obr. 10. Hmotnostní spektra metabolitu M_1 tvořeného oxidací Sudanu I peroxidasou detekovaná metodou ESI.

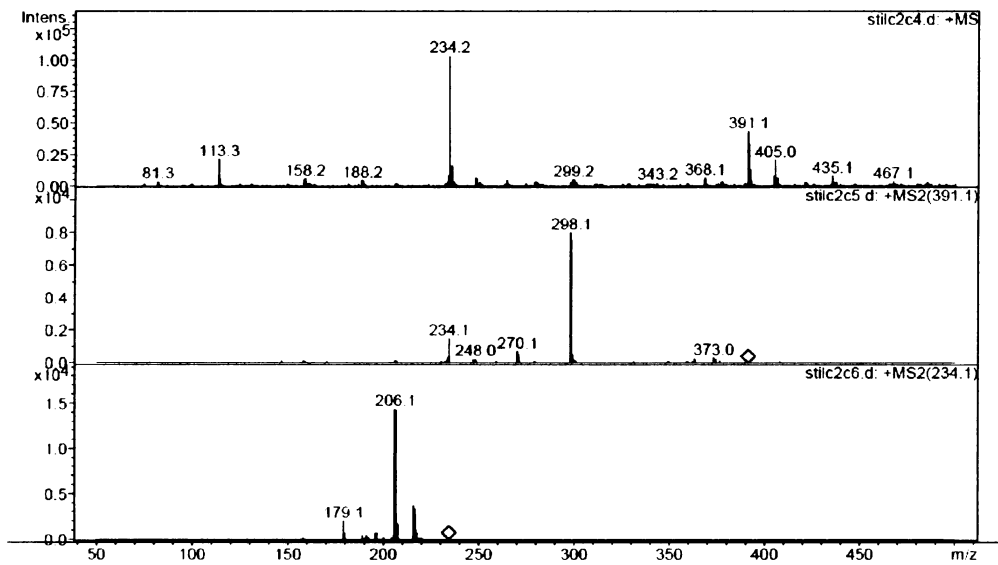
a) Metabolit M_1 získaný pomocí HPLC (pozitivní ionizace)

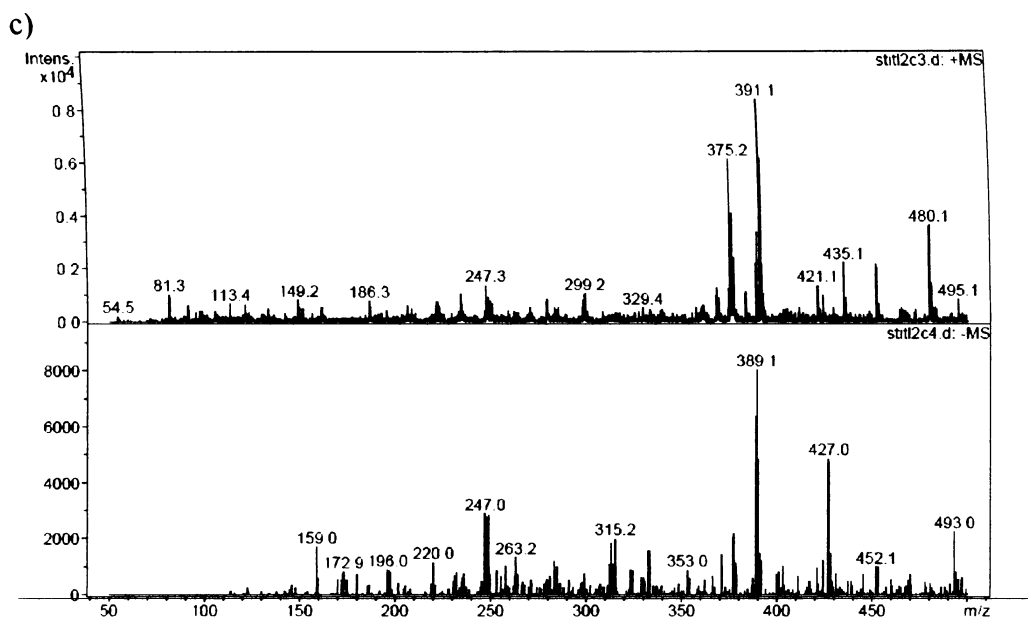
b) Metabolit M_1 získaný pomocí TLC (pozitivní ionizace)

a)



b)

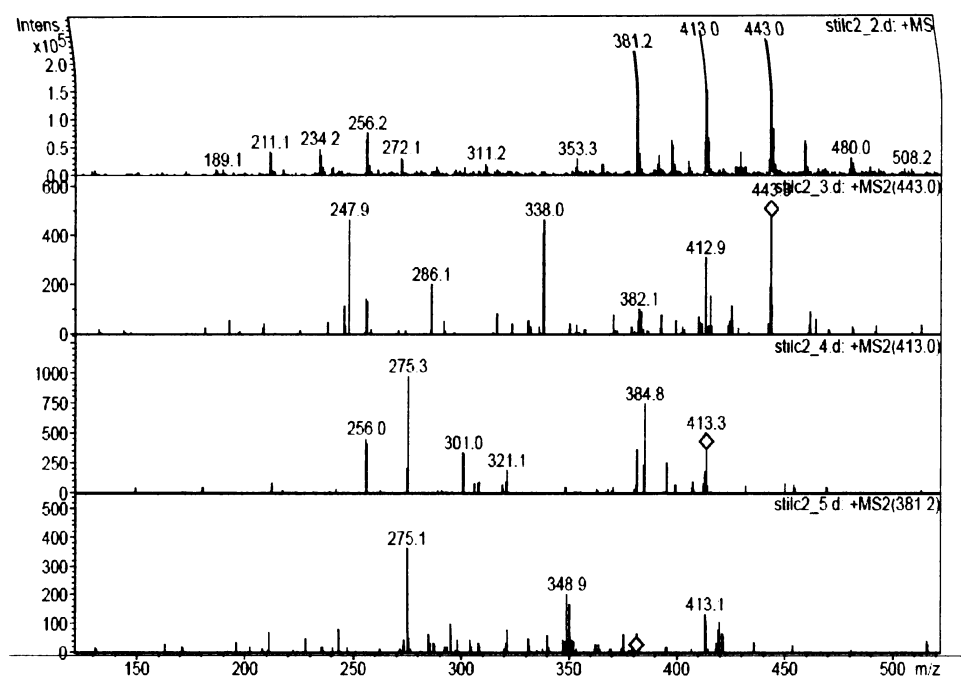




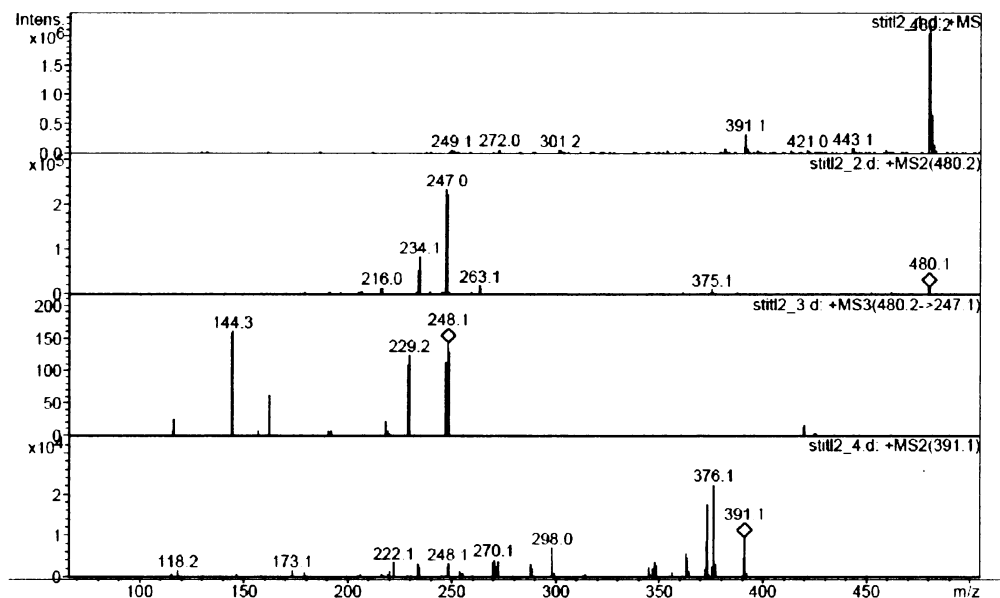
Obr. 11. Hmotnostní spektra metabolitu M₂ tvořeného oxidací Sudanu I peroxidasou detekovaná metodou APCI .

- a) Metabolit M₂ získaný pomocí HPLC (negativní ionizace)
- b) Metabolit M₂ získaný pomocí HPLC (pozitivní ionizace)
- c) Metabolit M₂ získaný pomocí TLC (pozitivní ionizace)

a)



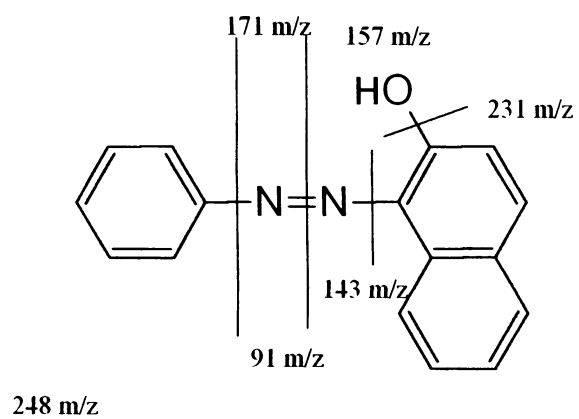
b)



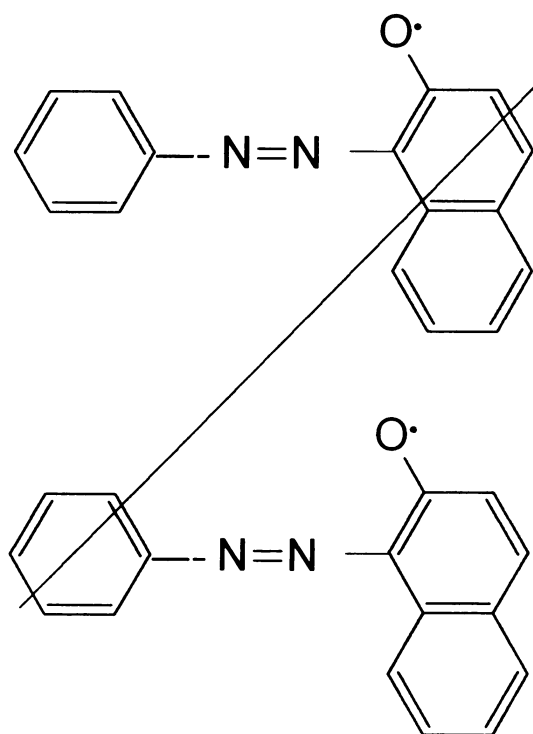
Obr. 12. Hmotnostní spektra metabolitu M_2 tvořeného oxidací Sudanu I peroxidasou detekovaná metodou ESI .

a) Metabolit M_2 získaný pomocí HPLC (pozitivní ionizace)

b) Metabolit M_2 získaný pomocí TLC (pozitivní ionizace)



Obr. 13. Schéma fragmentace molekuly Sudanu I



Obr. 14. Dimer Sudanu I

4.3. Efektivita tvorby aduktů aktivovaných Sudanem I s deoxyguanosinem a guanosinem

Sudan I oxidovaný peroxidasou (jak je výše uvedeno byla modelově použita rostlinná peroxidasa křenu selského) tvoří adukty s deoxyguanosinem a guanosinem, které byly z reakční směsi extrahovány postupem popsáním v kapitole 3.3.7.

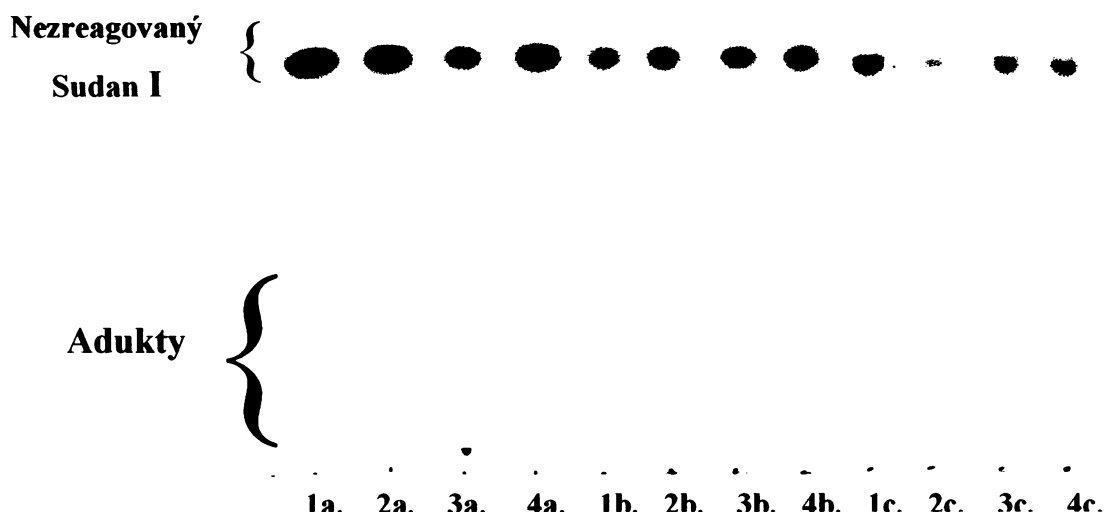
Vedle extrakce Sudanu I, jeho metabolitů a modifikovaných nukleosidů dochází i k částečné extrakci nemodifikovaných nukleosidů. Hydrofobní molekula Sudanu I navázaná na cílovém nukleosidu uděluje výslednému aduktu hydrofobní vlastnosti, modifikovaný nukleosid je pak tedy spolu se Sudanem I a jeho metabolity extrahován do ethylacetátu. Normální nemodifikované nukleosidy zůstávají převážně ve vodné fázi.

Adukty byly od Sudanu I a jeho metabolitů separovány pomocí tenkovrstvé chromatografie na silikagelu.

Míra tvorby aduktů guanosinu a deoxyguanosinu se Sudanem I aktivovaným peroxidasou byla sledována za rozdílných experimentálních podmínek. Peroxid vodíku byl vždy přidáván v nadbytku a jeho koncentrace byla 1000 μM .

4.3.1. Vliv pH na tvorbu aduktů

Efektivita tvorby aduktů byla sledována při různých hodnotách pH (pH 8, 9 a 10). Nejvíce aduktů Sudanu I s deoxyguanosinem vznikalo při pH 8 a 9, podobně i u tvorby aduktů s guanosinem byl tento rozsah pH nejefektivnější (Obr. 15.). Pro další inkubace bylo tedy zvoleno pH 8,5.



Obr. 15. Vliv pH na efektivitu tvorby aduktů aktivovaného Sudanu I s guanosinem a deoxyguanosinem

Vzorek č. 1: kontrola bez nukleosidů

č. 2 : adukty s deoxyguanosinem

č. 3 : adukty s guanosinem

č. 4 : kontrola

Sada vzorků 1a. až 4a. byla inkubována při pH 8

Sada vzorků 1b. až 4b. byla inkubována při pH 9

Sada vzorků 1c. až 4c. byla inkubována při pH 10

4.3.2. Vliv koncentrace Sudanu I na tvorbu aduktů

Sudan I byl přidáván v různých koncentracích od 100 μM do 600 μM (Obr. 16.). Pro efektivní tvorbu aduktů byla zjištěna jako optimální koncentrace 600 μM Sudanu I. Při té docházelo k velké produkci aduktů [co do množství i co do počtu (až 6 aduktů), viz. Obr. 16. – 18.], aniž by docházelo k precipitaci Sudanu I po jeho přidání do reakční směsi.



Obr. 16. Vliv koncentrace Sudanu I na efektivitu tvorby aduktů guanosinu a deoxyguanosinu

Vzorek č. 1: kontrola bez nukleosidů

č. 2 : adukty s deoxyguanosinem

č. 3 : adukty s guanosinem

č. 4 : kontrola

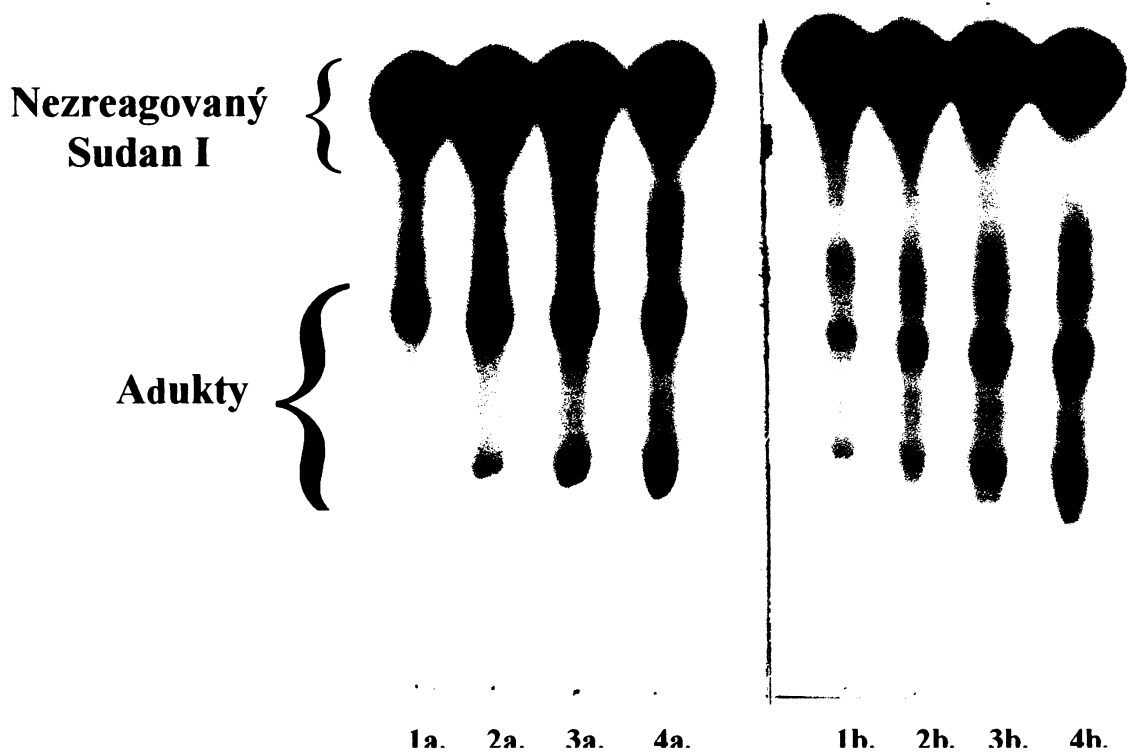
Sada vzorků 1a. až 4a. byla inkubována při koncentraci Sudanu I - 100 μM

Sada vzorků 1b. až 4b. byla inkubována při koncentraci Sudanu I – 300 μM

Sada vzorků 1c. až 4c. byla inkubována při koncentraci Sudanu I – 600 μM

4.3.3. Vliv koncentrace nukleosidů na tvorbu aduktů s aktivovaným Sudanem I

Vliv rozdílné koncentrace jednotlivých nukleosidů (guanosinu a deoxyguanosinu) na efektivitu tvorby aduktů s aktivovaným Sudanem I byla testována v rozsahu koncentrací 500 - 5000 μM . U takto vysokých koncentrací nukleosidů nebylo možné připravit dostatečně koncentrovaný zásobní roztok, navážené množství bylo tedy rozpouštěno přímo v inkubační směsi. Jako optimální se ukázala nejvyšší možná koncentrace (5000 μM) guanosinu nebo deoxyguanosinu. Při této koncentraci nukleosidů bylo množství (i počet) aduktů nejvyšší (Obr. 17.).



Obr. 17. Vliv koncentrace nukleosidů na efektivitu tvorby aduktů guanositu a deoxyguanositu s aktivovaným Sudanem I

Vzorky č. 1a. - 4a.: adukty s deoxyguanositem

Vzorky č. 1b. - 4b.: adukty s guanositem

Vzorky 1 – koncentrace nukleosidu 500 μM

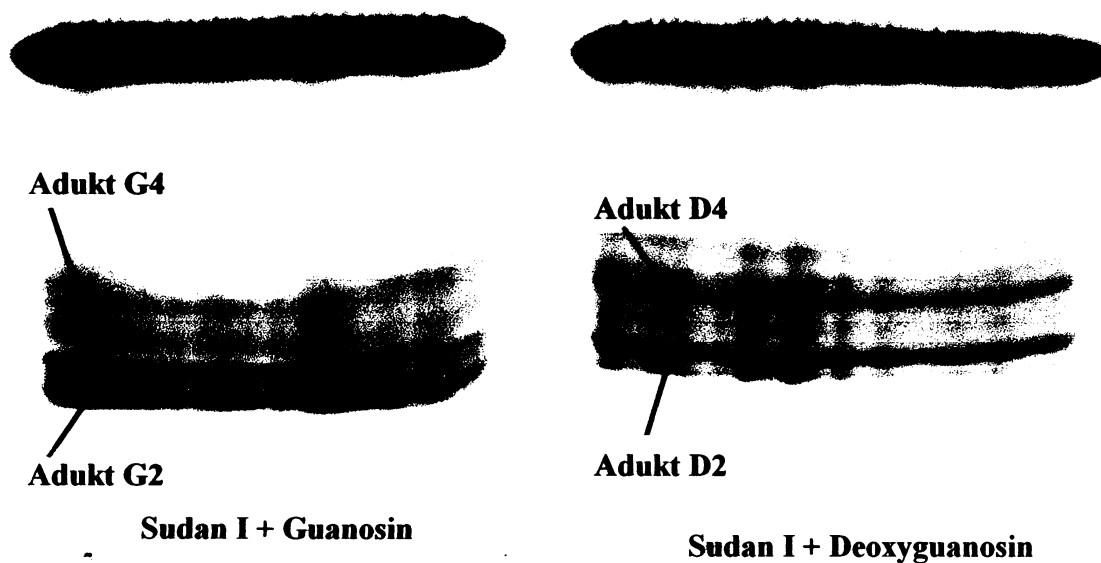
Vzorky 2 – koncentrace nukleosidu 1000 μM

Vzorky 3 – koncentrace nukleosidu 2000 μM

Vzorky 4 – koncentrace nukleosidu 5000 μM

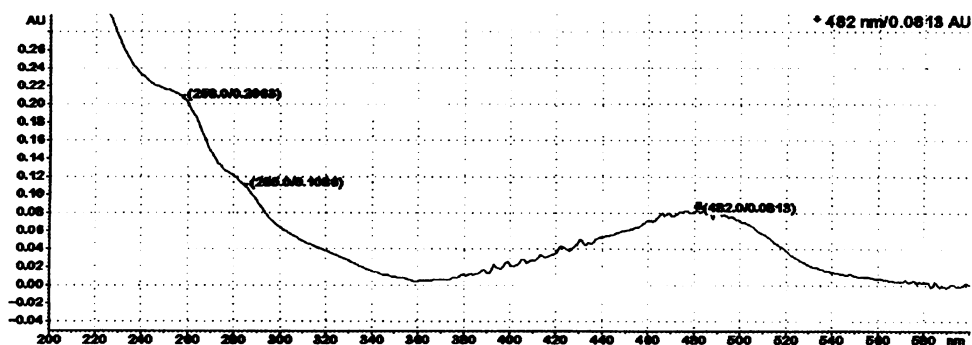
4.4. Charakterizace aduktů peroxidasou aktivovaného Sudanu I s guanosinem a deoxyguanosinem

Dva majoritní adukty tvořené ze Sudanu I aktivovaného peroxidasami s guanosinem (označované G2 a G4) a analogicky dva adukty tvořené s deoxyguanosinem (D2 a D4) (Obr. 18.) byly v dalších experimentech částečně charakterizovány. K těmto studiím byly použity metody hmotnostní a UV/VIS spektrofotometrie. K charakterizaci aduktů však bylo nutné připravit je v dostatečném množství nutném k uvedeným analýzám. Příprava a separace aduktů Sudanu I aktivovaného peroxidasami s deoxyguanosinem a guanosinem byla tedy prováděna v semipreparativním uspořádání (Obr. 18.). Jelikož separace jednotlivých aduktů nebyla v jediném kroku dostatečně efektivní, byla TLC opakována dvakrát, čímž bylo dosaženo více než 95 %-ní čistoty.

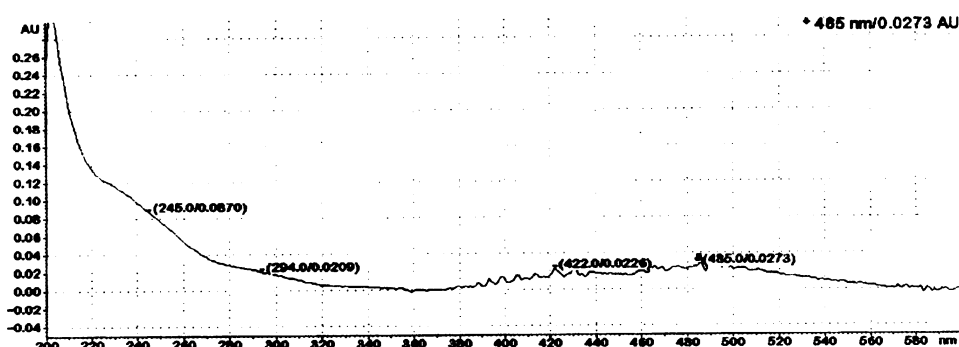


Obr. 18. Separace aduktů Sudanu I s guanosinem a deoxyguanosinem pomocí TLC na silikagelu

Adukty G2 a D2 připravené z guanosinu a deoxyguanosinu vykazovaly silný absorpční pás ve viditelné oblasti spektra s maximem okolo 480 nm (Obr. 19. a 21.). Taková spektra indikují, že na oba nukleosidy je vázána celá molekula Sudanu I. Ten totiž v této části spektra vykazuje obdobný absorpční pás (69).

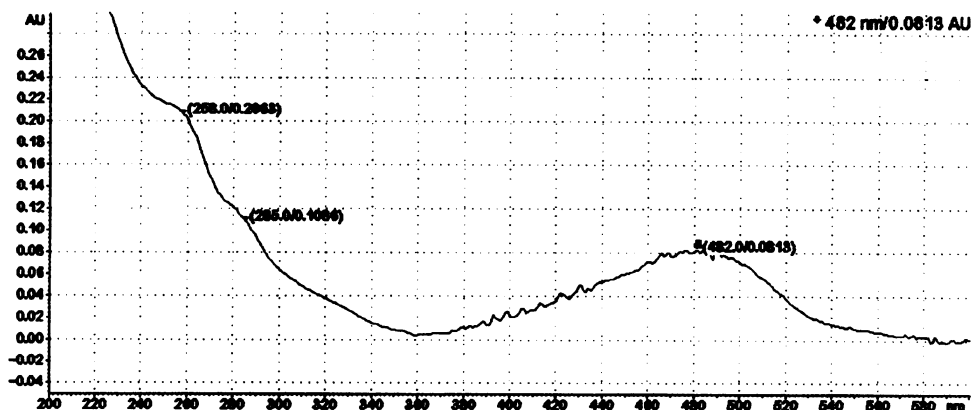


Obr. 19. UV-VIS spektrum aduktu G2 s guanosinem

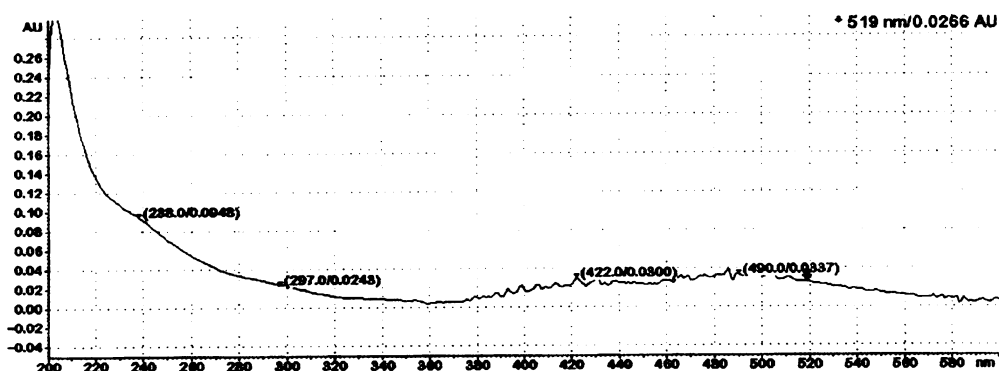


Obr. 20. UV-VIS spektrum aduktu G4 s guanosinem

Také v případě aduktů G4 a D4 byl tento pás patrný, i když byl výrazně slabší. Vedle něho však byla zřetelná i absorpce v oblasti kolem 422 nm (Obr. 20. a 22.). Z těchto výsledků vyplývá, že také v těchto aduktech je na guanosin či deoxyguanosin vázána struktura blízká Sudanu I. Opakovanou chromatografií byla u tohoto aduktu navíc zjištěna nestabilita. Již za laboratorní teploty dochází k jeho konverzi na adukt G2 popř. D2.



Obr. 21. UV-VIS spektrum aduktu D2 s deoxyguanosem

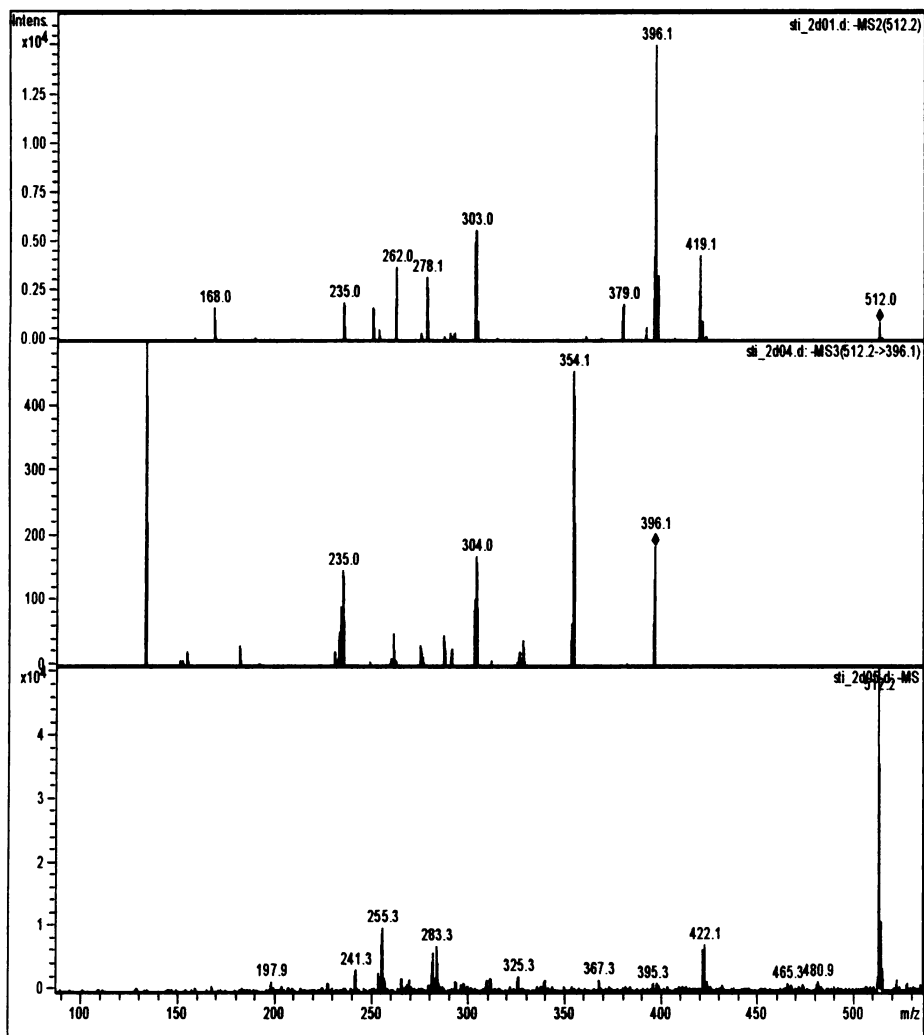


Obr. 22. UV-VIS spektrum aduktu D4 s deoxyguanosem

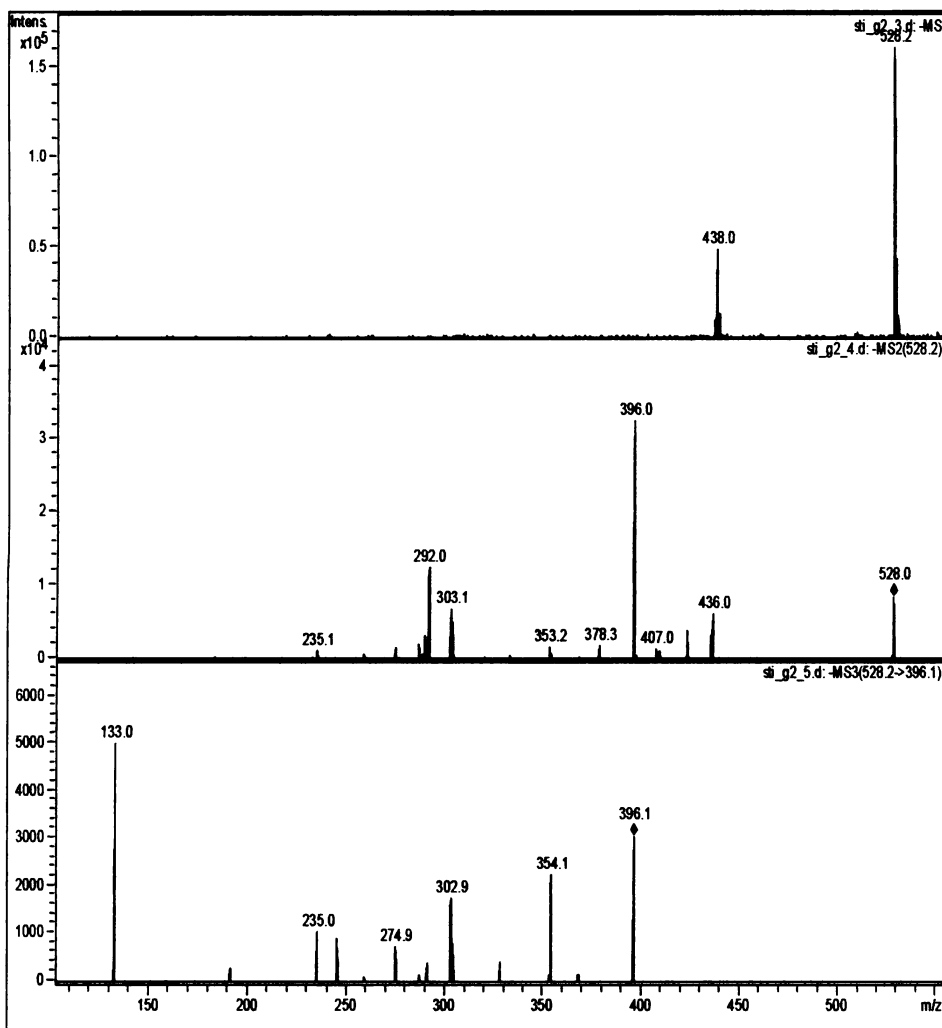
Abychom potvrdili uvedené předpoklady, oba typy aduktů byly analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie (ionozace elektrosprejem). Ze spekter aduktů (Obr. 23. – 26.) vyplývá, že první typ aduktů (G2 a D2) skutečně obsahuje vázanou celou molekulu Sudanu I. Hmotnostní píky molekul aduktů G2 a D2 odpovídají molekule Sudanu I vázané na guanosen (m/z 528,2) (Obr. 24.), či na deoxyguanosen (m/z 512,2) (Obr. 23.), což je zcela ve shodě s výsledky spektrofotometrických měření. Navíc posun v hmotnosti o 16 jednotek odpovídá absenci kyslíkového atomu

v sacharidové části molekuly aduktu s deoxyguanosinem. Tímto je navíc prokázána přítomnost tohoto sacharidu v aduktech G2 a D2.

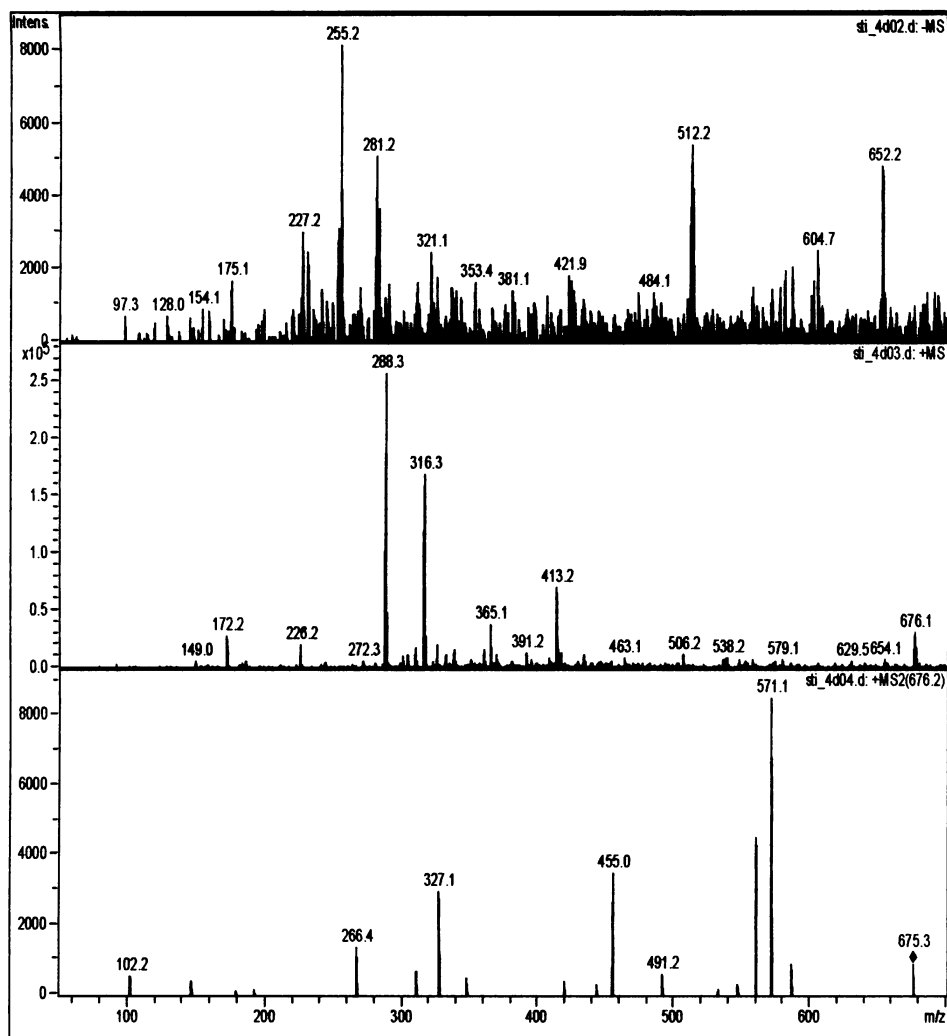
Molekulové hmotnosti aduktů D4 a G4 (Obr. 25. a 26.) stanovené pomocí hmotnostní spektrometrie byly výrazně vyšší než by odpovídalo součtu hmotností Sudanu I a guanosinu či deoxyguanosinu (G4: m/z 692,2 a D4: m/z 676,1). Opět byl v obou aduktech identifikován posun o 16 jednotek mezi guanosinem a deoxyguanosinem, což svědčí o přítomnosti ribosy resp. deoxyribosy v uvedených aduktech. O jakou frakci molekuly Sudanu I o hmotnosti m/z 164 je majoritní hmotnostní pík zvětšen nelze rozhodnout.



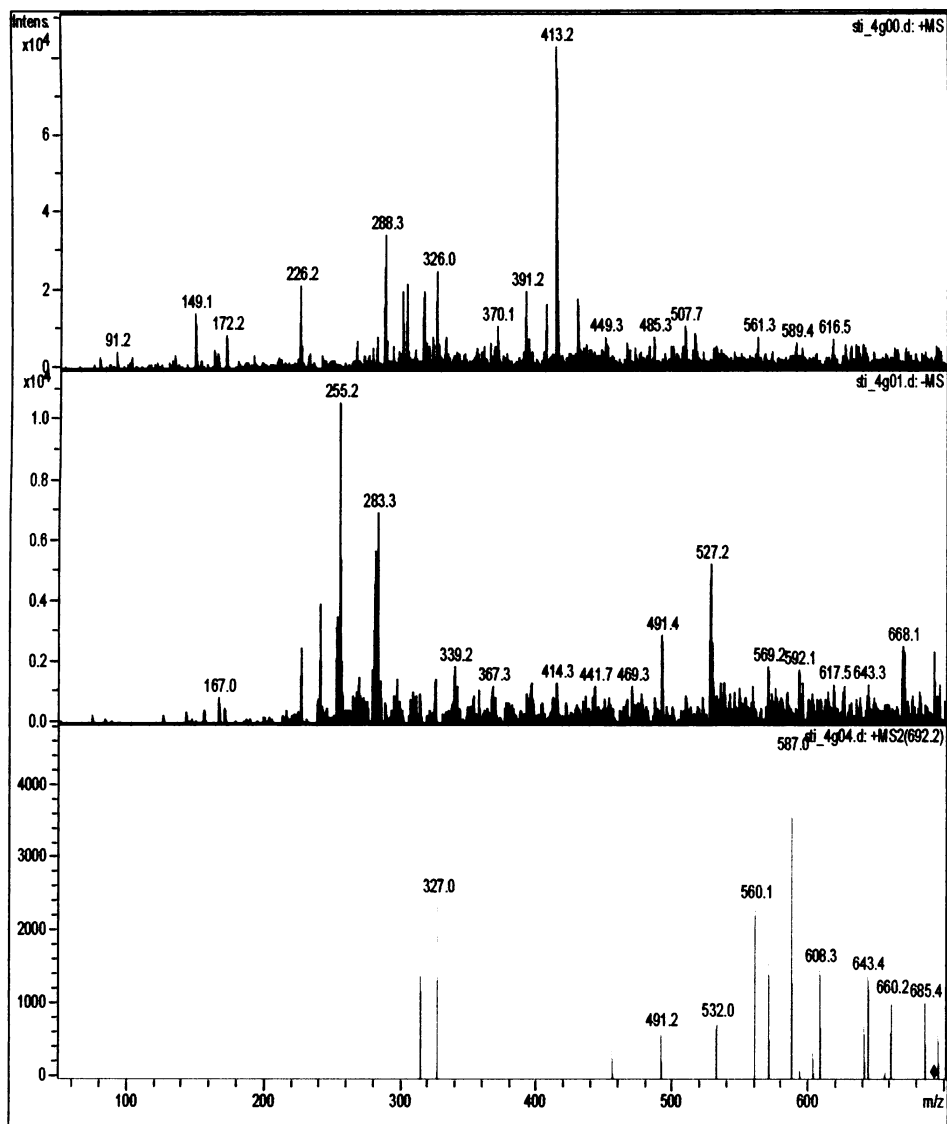
Obr. 23. Hmotnostní spektrum aduktu D2 s deoxyguanosinem



Obr. 24. Hmotnostní spektrum aduktu G2 s guanosinem



Obr. 25. Hmotnostní spektrum aduktu D4 s deoxyguanosinem



Obr. 26. Hmotnostní spektrum aduktu G4 s guanosinem

Výsledky hmotnostních analýz prokazují vazbu aktivovaného Sudanu I na deoxyguanosin a guanosin. Neposkytují však bližší charakterizaci aduktů. Takové studie budou předmětem dalších výzkumů v laboratoři katedry biochemie, kde byla předkládaná diplomová práce vypracována.

5. Diskuse

Předkládaná diplomová práce se zabývala studiem oxidace karcinogenního azobarviva Sudanu I peroxidasou a jeho vazbou na deoxyguanosin a guanosin.

Sudan I je azobarvivem široce používaným pro barvení řady materiálů denní potřeby. Jeho používání může tedy rezultovat i v expozici lidské populace. V poslední době bylo navíc zjištěno, že Sudan I byl detekován jako aditivum v potravinách obsahujících „chilli peppers“. Sudan I se proto stal středem pozornosti řady laboratoří především z hlediska vypracování senzitivních metod jeho stanovení (24, 25). V laboratoři, kde byla diplomová práce vypracována došlo také k zintenzivnění studia Sudanu I, a to z hlediska jeho karcinogenity (26, 27). Sudan I je karcinogenem vyvolávajícím tvorbu nádorů jater a močového měchýře (30, 31). Ačkoliv dosud nebyl prokázán jako karcinogen pro člověka, je i pro tento organismus rizikovou sloučeninou. Tato skutečnost vyplývá z poznatků zjištěných nedávno v laboratoři, kde byla tato diplomová práce vypracována. Zjištěno totiž bylo, že Sudan I je metabolicky nejen detoxifikován, ale i aktivován lidskými enzymovými systémy, což může vést k iniciaci nádorových procesů (26, 27). Studium karcinogenity Sudanu I je proto nyní ještě aktuálnější než dříve, jak bylo výše uvedeno.

Přestože Sudan I není sám ultimativním karcinogenem, jeho expozice vede ke vzniku nádorů jater a močového měchýře. V těchto orgánech je metabolisován (jak detoxifikován tak aktivován). V játrech, vzhledem k vysoké koncentraci cytochromů P450, je metabolisován právě těmito enzymy (30, 31). V močovém měchýři je koncentrace cytochromů P450 velmi nízká, oproti značnému množství peroxidas (PHS a nespecifické peroxidasy). Je tedy pravděpodobné, že Sudan I i jeho metabolity jsou zde metabolisovány peroxidasami (30, 31, 32, 33).

V průběhu metabolismu Sudanu I mikrosomálními cytochromy P450 je ze Sudanu I vedle C-hydroxy derivátů tvořen také benzendiazoniový ion (BDI) (26, 30, 31, 34). Zjištěno navíc bylo, že v průběhu oxidace Sudanu I cytochromy P450 dochází i k tvorbě aduktů s DNA, RNA a proteiny (26, 30, 34, 35, 36, 37). BDI je reaktivním metabolitem zodpovědným za tvorbu aduktů s DNA a tedy také za iniciaci neoplastických procesů v játrech potkanů (26, 30).

Tvorba aduktů s DNA, RNA i proteiny byla detekována i při aktivaci Sudanu I peroxidasami (32, 33, 36 - 41). Deoxyguanosin a guanosin jsou cílovými nukleosidy, na které je Sudan I aktivovaný peroxidasami vázán (37, 39). V předkládané diplomové práci bylo studium oxidace Sudanu I peroxidasou a následné tvorby aduktů s deoxyguanosinem a guanosinem rozšířeno. Pro peroxidasy je charakteristická jednoelektronová oxidace (oxidace radikálová). V práci byla vybrána jako model křenová peroxidasa. Je to rostlinná peroxidasa, ale svou funkcí odpovídá živočišným peroxidasám například laktoperoxidase nebo myeloperoxidase. V diplomové práci bylo zjištěno, že křenová peroxidasa efektivně oxiduje Sudan I za tvorby několika metabolitů. Jedním z cílů diplomové práce bylo alespoň některé z těchto metabolitů částečně charakterizovat. Dva majoritní produkty oxidace Sudanu I byly charakterizovány UV/VIS spektrometrií, hmotnostní spektrometrií a nukleární magnetickou rezonancí. Vzhledem k tomu, že pro charakterizaci bylo nutné připravit produkty oxidace Sudanu I ve větším množství a v dostatečné čistotě, byly v práci takové postupy vyvinuty. Použita byla tenkovrstvá chromatografie (TLC) a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Uvedenými postupy byly připraveny dva majoritní metabolity Sudanu I tvořené peroxidasou ve vysoké čistotě. Analýza UV/VIS spektry a hmotnostní spektrometrií rovněž jako nukleární magnetickou rezonancí nevedla k totální charakterizaci metabolitů Sudanu I. Metodou hmotnostní spektrometrie jsme zjistili, že se jedná pravděpodobně o molekuly dimerů Sudanu I. V hmotnostních spektrech byly nalezeny fragmenty štěpení jak molekuly dimeru Sudanu I, tak molekuly Sudanu I samotného. V některých spektrech byl nalezen i molekulární „peak“ dimeru Sudanu I.

Uspořádání vazby obou molekul Sudanu I v molekule dimeru je neznámé. Z výsledků hmotnostních analýz o přesné struktuře totiž nelze přesně rozhodnout. Další charakterizace molekul dimerů Sudanu I jako metabolitů Sudanu I vzniklých reakcí katalyzovaných peroxidasami je předpokládána pro další fázi výzkumu v laboratořích katedry biochemie. Výsledky získané prací však jednoznačně podporují již dříve získaný poznatek, že Sudan I je peroxidasami oxidován jednoelektronovou oxidací za tvorby radikálů, které pak reagují neenzymově podle prostředí, ve kterém se vyskytují (33, 36, 37, 39, 41, 70). První z možností neenzymové reakce je atak další molekuly Sudanu I radikálem Sudanu I za tvorby

dimeru. Další možnou reakcí je reakce radikálů s nukleofily, které jsou přítomné v prostředí, kde radikály vznikají. V buňkách organismů jsou takovými nukleofily nukleofilní centra DNA, RNA či proteinů (33, 36, 37, 39, 41). Skutečně, v dřívějších studiích byla prokázána vazba Sudanu I aktivovaného peroxidasami na adeninové a guaninové báze DNA a RNA (37, 41, Stiborová, ústní sdělení). Majoritní bázi, kterou je aktivovaný Sudan I modifikován je guanin (37, 41). Struktura aduktů však nebyla určena.

Dalším úkolem diplomové práce bylo proto připravit a následně charakterizovat adukty Sudanu I s deoxyguanosinem a guanosinem. V práci byly určeny optimální podmínky pro přípravu a izolaci aduktů Sudanu I aktivovaného křenovou peroxidasou s deoxyguanosinem a guanosinem. Nejvíce bylo uvedených aduktů tvořeno při pH 8,5, při 1 mM koncentraci H₂O₂, 5 mM koncentraci guanosinu či deoxyguanosinu a 0,6 mM koncentraci Sudanu I. Navíc byly vyvinuty i postupy izolace a purifikace sledovaných aduktů. Extrakce ethylacetátem se ukázala jako vhodný krok pro oddělení většiny nemodifikovaného deoxyguanosinu a guanosinu od jejich aduktů se Sudanem I. K neefektivnější separaci směsi aduktů pak docházelo pomocí TLC na silikagelu při použití mobilní fáze složené z n-butanolu, n-propanolu, koncentrovaného amoniaku a destilované vody v poměru 16:12:2:10 (v/v). Použití HPLC pro separaci aduktů se nejevilo perspektivní vzhledem k nespecifické sorpci aduktů na chromatografický nosič (výsledky těchto experimentů nejsou v diplomové práci uvedeny). Připravené purifikované adukty byly charakterizovány pomocí UV/VIS spektrometrie a hmotnostní spektrometrie. UV/VIS spektra vykazovala silný absorpční pás v oblasti okolo 480 nm. Taková spektra indikují, že na oba guaninové nukleosidy je vázána celá molekula Sudanu I. Ten v této oblasti vykazuje obdobný absorpční pás. Adukty byly dále charakterizovány pomocí hmotnostní spektrometrie. Tato metoda plně potvrdila výsledky spektrofotometrických měření, že adukty skutečně obsahují ve své struktuře molekulu Sudanu I. Prokázala se i přítomnost sacharidu v aduktech. Analýzy však neukázaly polohy vazeb, kterými aktivovaný Sudan I atakuje molekulu guanosinu.

V současnosti probíhá analýza získaných purifikovaných aduktů pomocí NMR. Vzhledem k tomu, že analýzy ještě nejsou dokončeny, nejsou dosud získané výsledky v této diplomové práci ani prezentovány.

Určení přesné struktury jak metabolitů oxidace Sudanu I i aduktů Sudanu I s deoxyguanosinem a guanosinem jsou předmětem dalšího studia v naší laboratoři.

6. Závěr

Cílem předkládané diplomové práce bylo přispět k poznání oxidace karcinogenního azobarviva Sudanu I křenovou peroxidasou a tvorby aduktů jeho metabolitů s deoxyguanosinem a guanosinem. Z výsledků diplomové práce je patrné, že se cíle podařilo splnit. V práci bylo zjištěno, že :

- Sudan I je efektivně oxidován křenovou peroxidasou. Pomocí TLC byly detekovány a separovány dva majoritní metabolity M_1 a M_2 a čtyři metabolity minoritní (A_1 , A_2 , A_3 , A_4).
- Pro efektivnější separaci produktů oxidace Sudanu I peroxidasou byla užitá metoda HPLC.
- Dva majoritní metabolity oxidace Sudanu I peroxidasou (M_1 a M_2) byly charakterizovány UV/VIS a hmotnostní spektrometrií. UV/VIS spektrometrie potvrdila přítomnost struktury parentálního Sudanu I v obou majoritních metabolitech. Hmotnostní spektrometrie částečně charakterizovala oba majoritní metabolity Sudanu I. K charakterizaci byly použity metody ESI a APCI. Signály odpovídající molekulovým hmotnostem dimeru Sudanu I (494 m/z), fragmentů takové molekuly a Sudanu I samotného (247 m/z) indikují, že oba metabolity Sudanu I tvořené peroxidasou jsou dimery Sudanu I. Vazba obou molekul Sudanu I v molekulách dimerů však dosud nebyla určena.
- Sudan I je aktivován křenovou peroxidasou za tvorby aduktů s deoxyguanosinem a guanosinem.
- Byly nalezeny optimální podmínky pro přípravu a izolaci aduktů Sudanu I aktivovaného peroxidasou s deoxyguanosinem a guanosinem.
- Nejvíce uvedených aduktů bylo tvořeno při pH 8,5, při 1 mM H_2O_2 , 5 mM koncentraci guanosinu či deoxyguanosinu a 0,6 mM koncentraci Sudanu I.
- K nejefektivnější separaci směsi aduktů docházelo pomocí TLC na silikagelu, při použití mobilní fáze složené z n-butanolu, n-propanolu, koncentrovaného amoniaku a destilované vody v poměru 16:12:2:10 (v/v).
- Pomocí UV/VIS a hmotnostní spektrometrie byla částečně určena struktura dvou majoritních aduktů Sudanu I s oběma nukleosidy.

Diplomová práce přináší původní vědecké poznatky, které otevírají nové úhly pohledu na mechanismus oxidace karcinogenního azobarviva Sudanu I křenovou peroxidasou a tvorby aduktů jeho metabolitů s deoxyguanosinem a guanosinem.

7. Seznam literatury

1. Linhart, I., Novák, J.: Chemické listy 96, 271(2002)
2. Stiborová, M., Mikšanová, M.: Živa, 4, 146 (1999)
3. Doll, R., Peto, R.: J. Natl. Cancer Inst., 66, 1191(1981)
4. IARC : Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Overall Evaluations of Carcinogenicity. Updating of IARC Monographs Volumes 1 to 42, suppl. 7, IARC, Lyon, 224 (1987)
5. Stiborová, M.: Bull. Čs. Spol. Biochem. Mol. Biol., 27 (2), 82(1999)
6. Rendic, S., DiCarlo, F. J.: Drug Metab. Rev. 29, 413 (1997)
7. Dipple, A., Michejda, Ch.J., Weisburger, E.K.: Mechanism of cell Transformation by Carcinogenic Agents, (Ed. Grunberg, D. and Goff, S.), Pergamon Books Ltd., New York, 1 (1987)
8. Ashby, J., Tennant, R.W.: Mut.Res. 27, 229 (1991)
9. IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risk of chemicals to Man I, Some aromatic azocompounds. Vol. 8., International Agency for Research on Cancer, Lyon, 125 (1975)
10. Dawson, J.H.: Science 240, 433 (1998)
11. Ortiz de Montellano, P.R., Stearus, R.A.: J. Am. Chem. Soc. 109, 3415 (1987)
12. Kogan, J.M.: Chemie azobarviv, SNTL Praha (1960)
13. Matřka, M., Pípalová, B.: Collect. Czech. Chem. Commun. 47, 2711 (1982)
14. Matřka, M., Pípalová, B.: Collect. Czech. Chem. Commun. 47, 2746 (1982)
15. Child, J.J., Clayson, D.B.: Biochem. Pharmacol. 15, 1247 (1972)
16. Wislocki, P.G., Miwa, G.T., Lu, A.Y.H.: Enzymatic Basis of Detoxification I (Ed. Jakoby, W.B.), Academic Press, New York, 135 (1980)
17. Dunn, D.L., Lubel, R.A., Prough, R.A.: Cancer Res. 39, 4555(1987)
18. Chung, K.T., Fulk, G.E., Andrews, A.W.: Appl. Environ. Microbiol. 42, 641 (1981)
19. Ferayama, H.: Methods Canc. Res. 1, 399 (1976)
20. Daniel, J.W.: Toxikol. Appl. Pharm. 4, 572 (1978)

21. Kozuka, I., Goh, C.L., Doi, T., Yioshikawa, K.: *Ann. Med. Singapore*: 17, 492 (1988)
22. Kozuka, T., Tashiro, M., Sano, S., Fujimoto, K., Nakamura, Y., Hashimoto, S., Nakamianami, G.: *Cotact Dermatitis* 6, 330 (1980)
23. Fujimoto, K., Hashimoto, S., Kozuka, T., Tashiro, M., Sano, S.: *Contact Dermatitis* 12, 15 (1985)
24. Calbiani, F., Careri, M., Elviri, L., Mangia, A., Zagnoni, I.: *J. Chromatography A*, 127, 1058 (2004)
25. Di Donna, L., Maiuolo, L., Mazzotti, F., De Luca, D., Sindona, G.: *Anal. Chem.* 76, 5104 (2004)
26. Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Hodek, P., Frei, E.: *Cancer Res.*, 62, 5678 (2002)
27. Martínek, V., Stiborová, M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 67, 1883 (2002)
28. Elliott, B.M., Griffiths, K., Mackay, J.M., Wade, J.D.: *Mutagenesis* 12, 255 (1997)
29. Wakata, A., Miyamae, Y., Sato, S., Suzuki, T., Morita, T., Asano, N., Awogi, T., Kondo, K., Hayski, M.: *Environ. Mol. Mutagen.* 32, 84 (1998)
30. Stiborová, M., Frei, E., Schmeiser, H.H., Weissler, M.: *Chem. Res. Toxicol.* 8, 489 (1995)
31. Stiborová, M., Asfaw, B., Anzenbacher, P., Lešetický, L.: *Cancer Lett.* 40, 319 (1988)
32. Stiborová, M., Asfaw, B., Anzenbacher, P.: *FEBS Lett.* 232, 378 (1988)
33. Stiborová, M., Frei, E., Anzenbacher, P.: *Biochem. Physiol. Pflanzen* 187, 227 (1991)
34. Stiborová, M., Asfaw, B., Anzenbacher, P., Hodek, P.: *Cancer Lett.*, 40, 327 (1988)
35. Stiborová, M., Anzenbacher, P.: *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 57, 1537 (1992)
36. Stiborová, M., Frei, E., Schmeiser, H. H., Wiessler, M., Hradec, J.: *Carcinogenesis*, 11, 1843 (1990)

37. Stiborová, M., Frei, E., Schmeiser, H. H., Wiessler, M.: *Carcinogenesis*, 13, 1221 (1992)
38. Stiborová, M., Frei, E., Klokow, K., Wiessler, M., Šafařík, L., Anzenbacher, P., Hradec, J.: *Carcinogenesis*, 11, 1789 (1990)
39. Stiborová, M., Frei, E., Schmeiser, H. H., Wiessler, M., Hradec, J.: *Cancer Lett.*, 68, 43 (1993)
40. Stiborová, M., Frei, E., Breuer, A., Wiessler, M., Schmeiser, H. H.: *Mutat. Res.*, 493, 149 (2001)
41. Stiborová, M., Asfaw, B., Frei, E.: *Gen. Physiol. Biophys.*, 14, 39 (1995)
42. Fruton, J.S.: *Molecules and Life: Historical Essays on the Interplay of Chemistry and Biology*, Willey-Interscience, New York (1972)
43. Meunier, B.: *Biochimie* 69, 3 (1987)
44. Welinder, K.G.: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 388 (1992)
45. Welinder, K.G.: *Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*, (Ed. Lobarzowski, J., Greppine, H., Penel, C., Gaspar, Th.) University of Geneva, 3 (1991)
46. Hochman, A.: *Biochemistry and Physiology*, (Ed. Welinder, K. G., Raumssen, S.K., Penel, C., Greppin, H.) University of Geneva, 103 (1993)
47. Banci, L.: *J. Biotechnol.*, 53, 253 (1997)
48. Dunford, H.B., *Heme Peroxidases*, Wiley – VCH, New York (1999)
49. Niedelman, S.L., Geigert, J.: *Biohalogenation* Ellins Horwood Limited, London (1986)
50. Smulevich, G.: *Biochemistry* 33, 7398 (1994)
51. Smulevich, G., English, A.M., Martiny, A.R., Marzocchi, M.P.: *Biochemistry* 30, 772 (1991)
52. Neidelman, S.L., Giert, J.: *Biohalogenation* (Ellins Horwood Limited) England (1986)
53. Loll, P.J.: *Nature Str. Biol.* 2, 637 (1995)
54. Hoyle, M.C.: *Plant Physiol.* 60, 787 (1977)
55. Borchet, R., Decedue, C.J.: *Plant Physiol.* 62, 794 (1978)
56. Borchet, R., Decedue, C. J.: *Plant Physiol.* 60, 787 (1977)
57. Grison, R., Pilet, P.: *J. Plant Physiol.* 37, 1181 (1986)

58. Castilo, F.J., Penel, C., Grepin, H.: *Plant Physiol.* 74, 846 (1984)
59. van Huystee, R.S., Chibbar, R.N.: *Biol. Med. Res.* 13, 155 (1986)
60. Farel, R.L., Murtagh, K.E., Tien, M., Mosuch, M.D., Kirk, T.J.: *Enzyme Microb. Technol.* 11, 322 (1989)
61. Fujiyama, K., Takemura, H., Shinmyo, A., Ohada, H., Takano, M.: *Gene* 89, 163 (1990)
62. Aasa, R.I. Vangant, T., Dumford, M.: *Biochem. Biophys. Acta* 391, 259 (1986)
63. Sitter, A., Recrekl, C., Ternner, J.L.: *J. Biol. Chem.* 260, 7517 (1985)
64. Hayaski, Y., Yanazaki, J.: *J. Biol.Chem.* 254, 9101 (1979)
65. Mácholán, L., Barthová, J., Kučera, J.: *Enzymologie, SPN Praha* (1986)
66. Ortiz de Montellano, P.R., *Cytochrome P450: Structure, Mechanism, and* Plenum Press, New York and London (1985)
67. Ortiz de Montellano, P.R.: *Cytochrome P-450 : Structure, Mechanism, and Biochemistry* Plenum Press, New York and London (1995)
68. Pacáková, V., Štulík K.: *Vysokoučinná kapalinová chromatografie*, 6 (1986)
69. Stiborová, M., Asfaw, B., Frei, E., Schmeiser, Heinz H., Wiessler, M.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 59, 2727 (1994)
70. Stiborová, M., Asfaw, B., Frei, E., Scheiser, H.H.: *Collect. Czech. Chem. Commun.* 61, 962 (1996)