

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY V PRAZE
KATEDRA BIOCHEMIE



**Studium tvorby kovalentních aduktů potenciálního lidského
karcinogenu Sudanu I s proteiny po aktivaci peroxidasami**

Bakalářská práce

Tereza Hálková

Školitel: RNDr. Václav Martínek, Ph.D.

Praha 2008

Děkuji RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce. Především děkuji za cenné rady a informace, které mi k danému tématu poskytl, a za ochotu a trpělivost, se kterou se mi po dobu vypracovávání práce věnoval.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitele RNDr. Václava Martínka, Ph.D a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne 24. 5. 2008

Tereza Hálková

OBSAH

1. ÚVOD	1
1. 1 Kancerogenese	2
1. 1. 1 Fáze kancerogenese.....	2
1. 1. 2 Faktory napomáhající vzniku nádorového bujení.....	3
1. 2 Biotransformace xenobiotik.....	4
1. 2. 1 Derivatizační fáze	4
1. 2. 2 Konjugační fáze	5
1. 2. 3 Enzymy biotransformující chemické prokarcinogeny	5
1. 3 Peroxidasy.....	6
1. 3. 1 Rozdělení peroxidas.....	8
1. 3. 2 Křenová peroxidasa.....	8
1. 4 Sudan I	10
1. 4. 1 Metabolismus Sudanu I.....	11
1. 5 Kovalentní adukty s proteiny	12
2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE	14
3. MATERIÁL A METODY	15
3. 1 Použité přístroje	15
3. 2 Použitý materiál a chemikálie	15
3. 3 Použité metody.....	16
3. 3. 1 Inkubace Sudanu I s křenovou peroxidasou v přítomnosti nadbytku H ₂ O ₂ za přítomnosti nebo absence BSA.....	16
3. 3. 2 Měření změny absorbance Sudanu I.....	17
3. 3. 3 Dělení metabolitů Sudanu I chromatografií na tenké vrstvě (TLC)	17
3. 3. 4 Měření UV/VIS absorpčních spekter vodné fáze	18

3. 3. 5 Stanovení molárního absorpčního koeficientu Sudanu I v destilované vodě, methanolu a ve fosfátovém pufru pH 9.....	18
4. VÝSLEDKY A DISKUSE	19
4. 1 Stanovení molárních absorpčních koeficientů Sudanu I.....	19
ve vodě, v methanolu a ve fosfátovém pufru pH 9	19
4. 2 Spektrofotometrické stanovení pH optima oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou	19
4. 3 Spektrofotometrické stanovení pH optima tvorby aduktů Sudanu I aktivovaného peroxidasou s BSA.....	20
4. 4 Stanovení pH optima oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou v přítomnosti BSA metodou TLC	21
4. 5 Určení efektivity přeměny Sudanu I peroxidasou pomocí TLC při pH 9.....	24
4. 6 Spektrofotometrické stanovení optimální koncentrace Sudanu I v reakční směsi	25
4. 7 Odvození kinetických vztahů.....	26
4. 8 Stanovení rychlostní konstanty k_3 oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou v přítomnosti nadbytku H_2O_2	27
4. 9 Stanovení rychlostní konstanty k_3 oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou v přítomnosti BSA a nadbytku H_2O_2	31
5. ZÁVĚR	36
6. LITERATURA.....	37

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

AH ₂	molekula substrátu
AH [•]	radikál substrátu
BDI	benzodiazoniový ion
BSA	hovězí sérový albumin
HRP	křenová peroxidasa (horseradish peroxidase)
HRP – sloučenina I	sloučenina I křenové peroxidasy
HRP – sloučenina II	sloučenina II křenové peroxidasy
MFO-systém	system oxidas se smíšenou funkcí (mixed function oxidases)
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát, redukovaná forma
PAPS	2'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát neboli aktivní sulfát
TLC	chromatografie na tenké vrstvě (thin layer chromatography)
(Sudan I) [•]	radikál Sudanu I
[Sudan I]	koncentrace Sudanu I v reakční směsi v daném okamžiku reakce
[Sudan I] ₀	počáteční koncentrace Sudanu I
(Sudan I – BSA)	komplex vytvořený nekovalentní vazbou Sudanu I na BSA
[Sudan I – BSA]	koncentrace intermediátu (Sudan I – BSA)
[HRP] ₀	počáteční koncentrace HRP
[H ₂ O ₂] ₀	počáteční koncentrace H ₂ O ₂

1. ÚVOD

S rostoucím rozvojem společnosti stoupá i počet chemických látek přítomných v životním prostředí, které mohou být pro člověka a ostatní organismy toxické. Mezi takové látky patří i azobarviva, která se používají nejen v chemickém, ale např. i tiskařském, kosmetickém a potravinářském průmyslu. Do lidského organismu se azobarviva dostávají nejčastěji perorálně nebo kožním kontaktem. V organismu jsou pak za pomoci enzymů biotransformována, a to jak detoxikována, tak aktivována.

Aktivované metabolity azobarviv představují značné riziko pro zdraví jedince, neboť jsou schopny vytvářet kovalentní adukty s nukleovými kyselinami a proteiny, a tím narušují jejich fyziologické funkce. Tvorba kovalentních aduktů může dokonce resultovat až v iniciaci kancerogeneze.

1. 1 Kancerogenese

Pro vznik zdravého fungujícího organismu je potřeba, aby docházelo k průběžné regulaci exprese genů. Tedy k regulaci transkripce, posttranskripčních úprav, translace proteinu a posttranslačních úprav. Na této regulaci se podílejí jednak protoonkogeny a jednak tumor supresorové geny. Dojde-li ke změně (mutaci) v protoonkogenech nebo tumor supresorových genech, může docházet ke kancerogenesi [1].

Jako kancerogenese se označuje proces vzniku a růstu nádoru, tedy nově vzniklé abnormální tkáň, jejíž buňky neregulovatelně proliferují. Většina poškození DNA je včas odstraněna reparačními mechanismy, dojde-li však k vytvoření perzistentních aduktů, může vzniknout permanentní mutace v regulačních genech a zapříčinit kancerogenesi [2].

1. 1. 1 Fáze kancerogenese

Vlastní proces kancerogenese je možno rozdělit do 3 fází:

1. Iniclace

V této fázi dochází k přeměně zdravé buňky v tzv. buňku iniciovanou. Za iniciovanou buňku se považuje taková buňka, ve které došlo k mutaci DNA, a tato mutace nebyla opravena reparačními enzymy. Iniciovaná buňka může být odstraněna imunitním systémem nebo setrvávat v organismu a prodělávat proliferaci.

2. Promoce

Dochází ke zvýšené proliferaci iniciovaných buněk a vzniká tzv. preneoplazie, tedy benigní (nezhoubný) nádor. Pokud není preneoplazie včas diagnostikována a odstraněna, nastává třetí fáze kancerogenese.

3. Progrese

V progresní fázi se benigní nádor s částečně kontrolovatelným buněčným růstem mění v nádor maligní (zhoubný), tedy nádor s nekontrolovatelným růstem. Buňky maligního nádoru se mohou odštěpit a pomocí cévního a lymfatického systému vnikat do jiných tkání a orgánů v postiženém organismu. Zde se mohou usadit a vytvářet dceřiné nádory (metastázy) [1, 2].

1. 1. 2 Faktory napomáhající vzniku nádorového bujení

Poškození DNA vzniká přirozeně díky chybám při replikaci, může však být způsobeno i vlivem vnějších faktorů. Tyto faktory mohou být:

1. **Fyzikální** (UV, kosmické, radioaktivní a Röntgenovo záření, některé jemné mechanické částičky)
2. **Biologické** (genetické předpoklady a onkoviry)
3. **Chemické** (k expozici může dojít např. v zaměstnání, do lidského organismu se mohou chemické kancerogeny dostávat také vlivem životního prostředí, jako součást potravy nebo jako léčiva) [1, 2].

Chemické kancerogeny jsou takové sloučeniny, které po vniknutí do organismu vyvolávají kancerogenesi přímo (aniž by prodělávaly metabolickou aktivaci) nebo nepřímo (poté, co byly v organismu metabolizovány do své aktivní formy) [3]. Na základě toho je možné dělit chemické kancerogeny na **ultimativní** (nevyžadují metabolickou aktivaci) a **proximální**, neboli prokarcinogeny (způsobují kancerogenesi až po metabolické aktivaci) [2].

Chemické kancerogeny nebo jejich aktivní metabolity mají elektrofilní povahu a jsou tedy schopné reagovat s nukleofilními skupinami molekul DNA (ale i RNA a proteinů) a vytvářet pevné vazby [3, 4]. Podle typu interakce s DNA se kancerogeny dále dělí na:

1. Genotoxické

Tyto sloučeniny se vážou kovalentní vazbou na DNA a vytváří tak kovalentní adukty.

2. Epigenetické

Modifikují DNA jinak než tvorbou kovalentní vazby. Do této skupiny patří např. látky označované jako interkaláty, které mají schopnost „vmezeřit“ se do DNA.

3. Kancerogeny způsobující jinou změnu DNA

Těmito změnami mohou být např. jedno a dvouřetězcové zlomy (single- and double-strand break), intra nebo intermolekulární propojení molekul DNA (DNA-DNA cross-linking), nebo propojení molekul DNA-protein (DNA-protein cross-linking) [1,2].

Ze všech uvedených modifikací DNA je nejdůležitější tvorba kovalentních aduktů, která iniciuje kancerogenesi v 90 % případů [1].

1. 2 Biotransformace xenobiotik

Na základě hydrofobicity se xenobiotika (cizorodé látky) rozdělují na **polární** a **nepolární**. Polární (hydrofilní) xenobiotika jsou poměrně rychle vylučována z organismu, na rozdíl od xenobiotik nepolárních, které díky své lipofilní povaze mohou procházet membránami a kumulovat se tak v organismu. Aby mohla být nepolární xenobiotika vyloučena, musí být biotransformována v polárnější metabolity (detoxikována). Řada látek je však biotransformací namísto detoxikace aktivována na látky s biologickým účinkem. Tato aktivace může být jak pozitivní (např. některá léčiva), tak negativní (v případě proximálních kancerogenů, které jsou aktivovány na kancerogeny ultimativní tvořící kovalentní adukty).

U živočichů probíhá biotransformace xenobiotik ve dvou fázích - derivatizační a konjugační [5].

1. 2. 1 Derivatizační fáze

V této fázi dochází k zavádění polárních skupin do molekuly xenobiotika, nebo k demaskování stávajících funkčních skupin. Tyto děje jsou realizovány:

1. Oxidačními reakcemi (C-hydroxylace, N-hydroxylace, N-oxidace, S-oxidace, oxidační deaminace, dealkylace, oxidace dvojně vazby mezi atomy uhlíku, oxidace primárních a sekundárních alkoholů a aldehydů apod.)

2. Redukčními reakcemi (přeměna aromatických nitrosloúčenin a azosloúčenin na primární aminy, redukce ketonů na sekundární alkoholy)

3. Hydrolytickým demaskováním funkčních skupin (hydrolyza esterů a amidů za vzniku fenolů a karboxylových kyselin, respektive aminů a hydroxylových kyselin) [5]

1. 2. 2 Konjugační fáze

V této fázi dochází k syntetickým reakcím derivatizované molekuly xenobiotika s endogenními hydrofilními sloučeninami za tvorby konjugátů, které jsou snadno vyloučeny z organismu, nejčastěji močí a žlučí.

K endogenním sloučeninám reagujícím v konjugační fázi patří především kyselina glukuronová, aktivní sulfát neboli 2'-fosfoadenosin-5'-fosfosulfát (PAPS), acetylkoenzym A, glutathion a některé aminokyseliny (cystein, glycin, taurin, minoritně též alanin) [5].

1. 2. 3 Enzymy biotransformující chemické prokarcinogeny

Nejdůležitější skupinou enzymů, které se účastní derivatizační fáze biotransformace xenobiotik, jsou oxygenasy. Jsou to enzymy zajišťující inkorporaci kyslíku do molekuly cizorodé látky, a to ve formě hydroxylové skupiny, oxo-skupiny nebo dokonce dvou oxo-skupin. Na základě toho se oxygenasy rozdělují na **monooxygenasy** a **dioxygenasy**. V živočišném organismu se na polarizaci xenobiotik podílejí majoritně monooxygenasy [5].

Klíčovým enzymovým systémem derivatizační fáze biotransformace je mikrosomální systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO systém). MFO systém je soubor enzymů katalyzujících oxidační, oxygenační, popř. redukční reakce, přičemž využívá především molekulární kyslík [1]. Tento systém obsahuje tři základní složky: flavoproteinový enzym **NADPH: cytochrom P450 reduktasu**, která slouží jako donor elektronů, hemthiolátový enzym **cytochrom P450**, který je terminální oxidasou MFO systému, a **biologickou membránu**, ve které jsou oba enzymy zakotveny [5].

MFO systém je lokalizován v mikrosomální frakci hepatocytů obsahující především fragmenty membrán endoplasmatického retikula. Právě játra jsou hlavním orgánem biotransformace xenobiotik – během jednoho krevního oběhu je v nich zachyceno 99% xenobiotik přítomných v krvi [3].

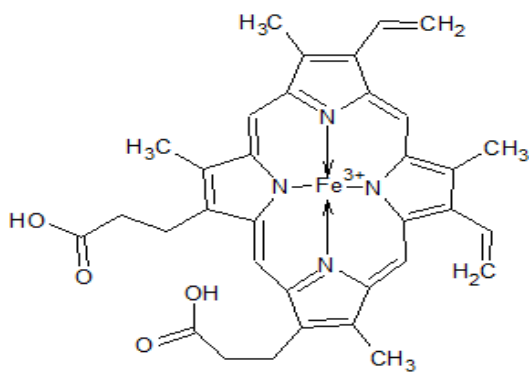
V ostatních orgánech, které neobsahují MFO systém (např. v močovém měchýři, kostní dřeni, mozku a myelinových pochvách nervů, buňkách štítné žlázy, semenných váčcích [1]), participují na oxidaci xenobiotik především peroxidasy.

Druhá fáze biotransformace xenobiotik probíhá taktéž za účasti enzymů-transferas, které nesou jméno podle substrátu, se kterým derivatizovaná molekula xenobiotika vytváří konjugáty (např. glutathion S-transferasa, sulfotransferasa) [5].

1.3 Peroxidasy

(Donor: hydrogenperoxid oxidoreduktasy)

Peroxidasy jsou většinou hemoglykoproteiny, které obsahují hem (nejčastěji ferriprotoporfyrin IX) jako prosthetickou skupinu. Železo hemu je pentakoordinované.



Čtyři vazebná místa zaujímají atomy dusíku pyrrolových jader porfyrinového skeletu a pátým ligandem je dusík imidazolového kruhu proximálního histidinu proteinové části enzymu (viz Obr. 1, 2). Šestá koordinační pozice zůstává v nativním enzymu volná [6].

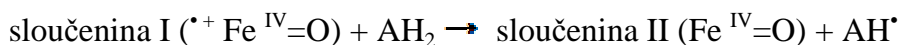
Obrázek 1. Ferriprotoporfyrin IX - železo je vázáno na čtyři dusíkové atomy pyrrolových jader porfyrinového skeletu.

Peroxidasy jsou enzymy katalyzující detoxikaci (redukci) peroxidu vodíku (nebo organických peroxidů) za současné oxidace jiné látky. Vzhledem k velmi široké substrátové specifitě peroxidas mohou být oxidovanými substráty jak látky endogenní, tak látky cizorodé, a to organické (fenoly, aromatické aminy) i anorganické (halogenidy) [1].



Obrázek 2. Ferriprotoporfyrin IX-vazba železa s proximálním histidinem [6].

Mechanismus oxidace substrátu za účasti peroxidu vodíku je následující [14]:



Enzym v nativním stavu je oxidován peroxidem vodíku a vzniká tak aktivovaná, vysoce reaktivní forma peroxidasy, tzv. sloučenina I. Během této reakce je peroxid vodíku redukován na vodu. Sloučenina I (porfyrinový π – kation radikál) je dvěma elektrony oxidovaná forma nativní peroxidasy, která má na místě šestého ligandu navázaný aktivovaný kyslík ($\text{Fe}^{\text{IV}}=\text{O}$) a obsahuje organický kation radikál, který je lokalizován na hemu nebo na aminokyselinovém zbytku.

Sloučenina I oxiduje molekulu substrátu (AH_2) na volný radikál substrátu ($\text{AH}\cdot$) za vzniku sloučeniny II.

Sloučenina II, která také obsahuje aktivovaný kyslík na šestém koordinačním místě, je jedním elektronem oxidovaná forma nativního enzymu a jedním elektronem redukována peroxidasová sloučenina I. Sloučenina II oxiduje další molekulu substrátu (i když pomaleji než sloučenina I) a zároveň je jedním elektronem redukována zpět do nativního stavu za vzniku molekuly vody [6, 7].

(viz také Obr. 3, str. 9)

Jednoelektronové oxidace jsou pro peroxidasy typické. Primárními produkty těchto reakcí jsou radikály, které ochotně reagují s nízkomolekulárními látkami přítomnými v reakční směsi (např. s O_2), vzájemně spolu rekombinují a vytvářejí dimery až oligomery [5], nebo se mohou vázat na nukleofilní centra biologických makromolekul (proteinů a nukleových kyselin), a to bez jakékoliv další enzymové katalýzy [1].

1. 3. 1 Rozdělení peroxidas

Peroxidasy je možné rozdělit do dvou superrodin:

a) živočišné peroxidasy

b) rostlinné peroxidasy [1,6]

V živočišných buňkách jsou peroxidasy lokalizovány hlavně v cytoplazmě, v menší míře v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu [1]. Živočišné peroxidasy mohou být také extracelulární (např. laktoperoxidasa).

V rostlinných buňkách se peroxidasy vyskytují vázané v buněčné stěně, plazmatické membráně, organelových membránách, nebo volné v cytoplazmě, vakuolách, ale i v mezibuněčném prostoru [8].

Rostlinné peroxidasy se mohou dále dělit do tří tříd:

1. Intracelulární peroxidasy prokaryotického původu

2. Intracelulární peroxidasy hub

3. Sekreční rostlinné peroxidasy [9, 10]

Peroxidasy **prvé třídy** jsou nejjednodušší - neobsahují disulfidické můstky, sacharidy, vápenaté ionty, ani signální peptid pro sekreci. Do této třídy patří např. kvasinková cytochrom c peroxidasa, rostlinná askorbát peroxidasa a bakteriální katalasa-peroxidasa [11].

Peroxidasy **druhé a třetí třídy** obsahují zbytky cysteinu, které vytváří disulfidické můstky zvyšující rigiditu enzymu. Na rozdíl od prokaryotických peroxidas jsou na povrchu glykosylovány, obsahují také signální peptid a dva vápenaté ionty potřebné pro zajištění správného strukturálního uspořádání v okolí hemu. Zástupcem druhé třídy je např. lignin peroxidasa, typickým představitelem třetí třídy je peroxidasa křenová [9, 11].

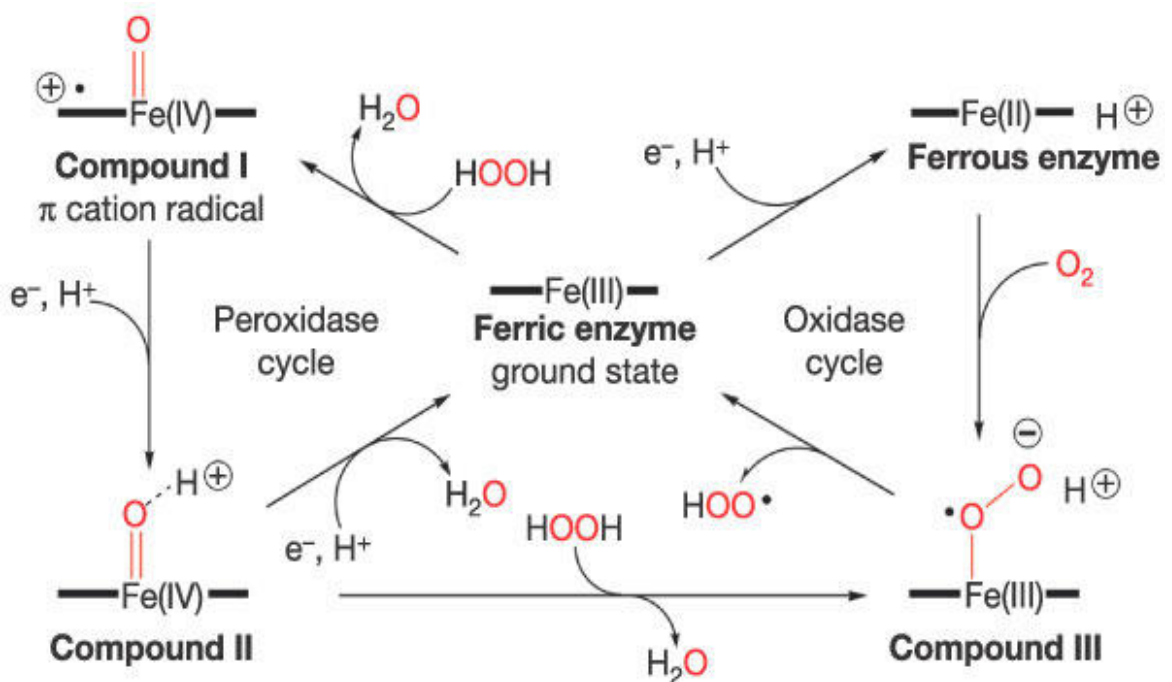
1. 3. 2 Křenová peroxidasa

(Horseradish peroxidase, HRP)

Křenová peroxidasa (viz Obr. 4, str. 10) patří k jedné z nejznámějších peroxidas. Objevena byla v roce 1903 [12, 13] a dnes je díky velmi častému využívání v četných

experimentech asi nejlépe prostudovanou peroxidasou vůbec. HRP je jako modelová peroxidasa ideální - při pokojové teplotě je stabilní v rozmezí hodnot pH 5 až 10, po kratší časové intervaly dokonce při pH 4 až 11. HRP lze bez problémů použít i při teplotách kolem 40°C [14], po kratší dobu může být vystavena dokonce teplotě 80°C [15]. Další výhodou HRP je její komerční dostupnost.

Křenová peroxidasa existuje v pěti oxidačních stavech [6, 16] znázorněných na obrázku 3:

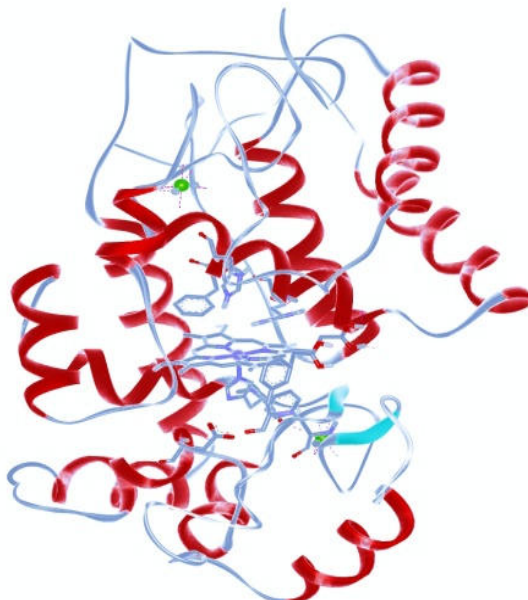


Obrázek 3. Pět oxidačních stavů křenové peroxidasy – křenová peroxidasa se může vyskytovat v nativním stavu (ferric enzyme), oxidovaná dvěma elektrony (sloučenina I), oxidovaná jedním elektronem (sloučenina II), v redukovaném stavu (ferrous enzyme), nebo jako oxyperoxidasa (sloučenina III) [16].

Sloučenina I a II již byly popsány v odstavci 1.3. Dalším oxidačním stavem HRP je redukovaná forma nativní peroxidasy (ferrous enzyme). Tato forma vzniká reakcí nativního enzymu se silným redukčním činidlem za anaerobních podmínek.

Posledním stavem, ve kterém se HRP může vyskytovat, je sloučenina III, neboli oxyperoxidasa. Tato forma je nestabilní a vzniká třemi možnými způsoby: reakcí redukovaného enzymu s O₂, reakcí nativního enzymu se superoxidovým anion

radikálem $O_2^{\bullet -}$ (případně jeho protonovanou formou, hydroperoxidovým radikálem HO_2^{\bullet}), nebo reakcí nativní peroxidasy s nadbytkem H_2O_2 [6].

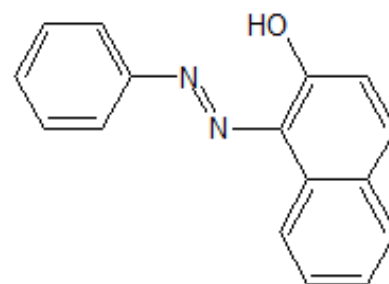


Obrázek 4. Křenová peroxidasa - helikální struktura křenové peroxidasy. Uprostřed enzymu je znázorněno aktivní centrum obsahující hem.

1. 4 Sudan I

(1-fenylazo-2-hydroxynaftalen, Solvent Yellow 14)

Sudan I (viz Obr. 5) je syntetické hydrofobní oranžovo-červené azobarvivo, které se hojně využívá k barvení rozpouštědel, leštidel, vosků, olejů, benzínu, plastů a tiskových inkoustů [17, 18]. V minulosti se v některých zemích toto barvivo používalo dokonce k barvení potravin- Sudan I byl nalezen v mletých chilli paprikách, kořenících směsích, různých ochucovadlech, worcesterových omáčkách apod.



Obrázek 5. Sudan I

V současné době jsou v Evropské Unii potraviny obsahující Sudan I nepřijatelné, neboť bylo prokázáno, že toto azobarvivo způsobuje nádorová

onemocnění jater a močového měchýře u myší, krys a králíků a je i potencionálním lidským karcinogenem a mutagenem [17, 19]. Navíc je Sudan I silným alergenem, který při styku s kůží může způsobit kontaktní dermatitidu nebo tzv. senzitivizaci kůže, tedy zcitlivění kůže na jiné sloučeniny [20].

1. 4. 1 Metabolismus Sudanu I

Jak již bylo uvedeno v odstavci 1. 2., řada xenobiotik vstupujících do organismu jsou prokarcinogeny, které jsou za pomoci enzymů biotransformovány (aktivovány) na ultimativní karcinogeny schopné vytvářet kovalentní adukty s nukleovými kyselinami a proteiny [5]. Výjimkou není ani Sudan I, který je primárně metabolizován (aktivován i detoxikován) v játrech pomocí cytochromů P450 [21-23], na jeho aktivaci se ale podílejí také peroxidasy [24-26].

Jaterní cytochromy P450 metabolizují Sudan I následujícími reakcemi:

1. C-hydroxylace

Touto reakcí je Sudan I oxidován na C-hydroxy a C-dihydroxyderiváty, jmenovitě na:

1-(4-hydroxyfenylazo)-2-hydroxynaftalen (4'-OH-Sudan I)

1-fenylazo-2,6-dihydroxynaftalen (6-OH-Sudan I)

1-(4-hydroxyfenylazo)-2,6-dihydroxynaftalen (4',6-di-OH-Sudan I) [21, 22]

1-(3,4-dihydroxyfenylazo)-2-hydroxynaftalen (3',4'-di-OH-Sudan I) [27]

4'-OH-Sudan I a 6-OH-Sudan I jsou majoritními produkty oxidace Sudanu I pomocí cytochromů P450 [21, 22].

2. Oxidační štěpení azoskupiny

Oxidačním štěpením azoskupiny Sudanu I vzniká reaktivní metabolit benzendiazoniový ion (BDI). Ten je schopen reagovat se zbytky guaninu v DNA a vytvářet tak kovalentní adukt 8-(fenylazo)guanin, který je zodpovědný za iniciaci kancerogeneze v játrech laboratorních zvířat [22, 23, 28].

Azobarviva mohou být v savčích játrech také redukována na aromatické aminy, primárně je však za tuto reakci zodpovědná s největší pravděpodobností intestinální mikroflóra. **Redukce azoskupiny** Sudanu I vede k rozštěpení jeho molekuly na 1-amino-2-naftol a anilin [29].

Peroxidasy jsou schopné aktivovat nejen parentální sloučeninu Sudan I, ale i oba jeho hydroxyderiváty (4'-OH-Sudan I a 6'-OH-Sudan I), které jsou považovány za produkty detoxikace Sudanu I. K aktivaci pomocí peroxidas dochází v močovém měchýři, kde jsou tyto enzymy hojně zastoupeny. Naopak cytochromy P450, které aktivují a detoxikují Sudan I v játrech, se v močovém měchýři téměř nevyskytují.

Je tedy pravděpodobné, že za vznik kancerogeneze v močovém měchýři laboratorních zvířat vystavených působení Sudanu I jsou zodpovědné právě peroxidasy [26].

Sudan I je peroxidasami efektivně oxidován za vzniku šesti metabolitů, dvou majoritních a čtyř minoritních. Při studiu struktury dvou majoritních metabolitů bylo zjištěno, že se s největší pravděpodobností jedná o dimery Sudanu I, jejich přesná struktura však zatím není známa [30]. Radikály Sudanu I, které se vytvoří po oxidaci peroxidasami, spolu tedy rekombinují za vzniku molekul dimerů. Jak již bylo uvedeno v odstavci 1. 3, další možnou reakcí primárně generovaných radikálů je atak nukleofilních center makromolekul (DNA, RNA a proteinů) a následná tvorba aduktů s těmito makromolekulami [1].

1. 5 Kovalentní adukty s proteiny

Tvorba kovalentních aduktů s proteiny byla poprvé popsána před šedesáti lety Elizabeth a Jamesem Millerovými, kteří odhalili, že azobarvivo 3-methyl-4-dimethylaminoazobenzen je schopno kovalentně modifikovat krysí jaterní proteiny [31]. Tento objev byl ale pozvolna zastíněn objevem kovalentních aduktů s DNA, které jsou z hlediska zapříčinění chemické kancerogeneze i ostatních fyziologických poškození dominantní [32, 33].

Vznikem kovalentně modifikovaných proteinů je narušena nejen původní struktura proteinů, ale i jejich funkce, což sekundárně vede k poškození submembránových organel, ovlivnění metabolických cest a cytologických procesů [4].

Termín „kovalentní adukty s proteiny“ je dnes široce používán ve smyslu kovalentní modifikace proteinů xenobiotiky nebo jejich deriváty. Ve skutečnosti mají ale schopnost vytvářet kovalentní adukty s proteiny obecně všechny elektrofilní, tedy i ty, které jsou generované z endogenních látek následkem např. oxidačního stresu nebo nevyváženého metabolismu. Modifikace proteinů endogenními reaktivními intermediáty je v současnosti považována za klíčový element při vzniku zánětů a chorob jako jsou ateroskleróza, astma a jiná plicní onemocnění, cukrovka a rakovina. Kovalentní adukty s proteiny tedy mohou sloužit jako indikátory různých nemocí [34].

Kromě toho mohou být kovalentní adukty s proteiny využívány také jako kvantifikátory míry expozice danému xenobiotiku [35]. Vineis a kol. např. ukázali, že množství 4-aminobifenylo-hemoglobinového aduktu u kuřáků odráží množství vykouřených cigaret [36].

Studium proteinových aduktů může také poskytovat cenné informace o metabolismu. Zwirner-Baier a Neumann použili adukty azobarviv Direct Red 46 a Pigment Yellow 17 s hemoglobinem ke studiu metabolismu těchto látek v krysím organismu. Pigment Yellow 17 je nerozpustné azobarvivo, proto se předpokládalo, že z hlediska iniciace kancerogeneze nepředstavuje žádnou hrozbu. Po orálním podání obou azobarviv laboratorním krysám byly ale nalezeny hydrolyzované hemoglobinové adukty, které naznačují tvorbu reaktivních intermediátů v průběhu metabolismu obou zkoumaných látek [37].

Mimo to současné studie usilují o stanovení kvantitativního vztahu mezi hladinou proteinových aduktů a aduktů s DNA. Využívání proteinových aduktů ke stanovení množství DNA aduktů začalo v sedmdesátých letech minulého století a v současnosti je aktivní oblastí výzkumu [38, 39].

2. CÍL BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Cílem práce bylo zoptimalizovat podmínky a metodiku pro monitorování rychlosti oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou v přítomnosti nadbytku H_2O_2 . A to jak ve směru tvorby metabolitů Sudanu I, tak i z hlediska vzniku aduktů reaktivních metabolitů Sudanu I s modelovým proteinem - hovězím sérovým albuminem.

Dalším cílem práce bylo pomocí této zoptimalizované metodiky blíže charakterizovat kinetiku oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou v přítomnosti nadbytku H_2O_2 . Dále porovnat kinetické parametry tvorby vlastních metabolitů Sudanu I s efektivitou tvorby kovalentních aduktů reaktivních metabolitů Sudanu I s modelovým proteinem.

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)

spektrofotometr (Diod Array 8453, Hewlett-Packard)

centrifuga (MLW T52,2)

vakuová odparka (DNA Speed Vac, DNA 110, SAVANT)

3. 2 Použitý materiál a chemikálie

SIGMA, USA

křenová peroxidasa, Sudan I

LACHEMA BRNO, Česká republika

diethylether

MERCK, Německo

tenké vrstvy silikagelu pro TLC (60 F₂₅₄), n-hexan

Lach-Ner, s.r.o., Česká republika

methanol, aceton

PENTA, Česká republika

dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát,

ethylester kyseliny octové (ethylacetát)

SEVAPHARMA, Česká republika

BSA (hovězí sérový albumin)

Peroxides s.r.o., Česká republika

peroxid vodíku

3. 3 Použité metody

3. 3. 1 Inkubace Sudanu I s křenovou peroxidasou v přítomnosti nadbytku H_2O_2 za přítomnosti nebo absence BSA

Oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou v přítomnosti peroxidu vodíku probíhala v inkubační směsi o celkovém objemu 2 ml, která obsahovala:

- 20 mM fosfátový pufr pH 2 až 12
- 0,5 μM HRP
- $\pm 20 \mu\text{M}$ BSA
- 300 μM H_2O_2
- 200, 100, 50, 20, 10, 5 nebo 1 μM Sudan I (zásobní roztok 5 mM v methanolu)

Inkubace probíhala v křemenné kyvetě. Do kyvety byl přidán pufr, roztok HRP (případně roztok BSA) a pak rychle za sebou roztok H_2O_2 a roztok Sudanu I. Směs byla promíchána a poté byla sledována změna absorbance v kinetickém modu spektrofotometru Diod Array 8453 firmy Hewlett-Packard. Měření probíhalo při laboratorní teplotě (21,5 °C) po dobu 400 nebo 800s.

Inkubace Sudanu I s HRP byla prováděna také v přítomnosti hovězího sérového albuminu (BSA). V takovém případě pak inkubační směs navíc obsahovala 20 μM BSA.

Pro stanovení absorbance reakční směsi v čase nekonečno, tedy po ukončení reakce, kdy je spotřebován veškerý Sudan I, byla doba inkubace prodloužena na 70 min. Inkubační směs výše uvedeného složení byla promíchána a inkubována 70 minut při laboratorní teplotě (21,5 °C). Poté byla změřena její absorbance při 484 nm ve standardním modu spektrofotometru Diod Array 8453. Jako pozadí byl použit roztok pufru s HRP (případně roztok pufru s HRP a BSA).

3. 3. 2 Měření změny absorpance Sudanu I

Úbytek absorpance byl měřen na spektrofotometru v modu kinetic s těmito parametry: doba měření 400 nebo 800 s, vlnová délka 484 nm (odpovídá vlnové délce absorpčního maxima Sudanu I), začátek měření v čase 0 s, intervaly mezi jednotlivými měřeními 10 s, zvyšování časových intervalů vždy o 10% předchozí hodnoty, integrační doba měření 0,5 s. Jako pozadí byl použit roztok pufru s HRP (případně roztok pufru s HRP a BSA). Naměřené hodnoty byly exportovány v ASCII formátu a následně zpracovány v grafickém editoru MicroCal Origin v 6.0.

3. 3. 3 Dělení metabolitů Sudanu I chromatografií na tenké vrstvě (TLC)

Inkubační směs pro účel analýzy pomocí TLC o celkovém objemu 1 ml byla připravena paralelně do několika zkumavek. Směs obsahovala:

- 20 mM fosfátový pufr pH 2 až 12
- 0,5 μ M HRP
- \pm 20 μ M BSA
- 300 μ M H₂O₂
- 100, 50 nebo 20 μ M Sudan I (zásobní roztok 5 mM v methanolu)

Inkubace probíhala 60 minut při laboratorní teplotě (21,5°C). Poté bylo do všech zkumavek přidáno 0,75 ml ethylacetátu, do kterého byly Sudan I a jeho metabolity extrahovány. Po důkladném protřepání směsi byl proces oddělení organické a vodné fáze urychlen centrifugací po dobu 5 minut při 2000 otáčkách/min. Organická fáze byla z reakční směsi odebrána do plastových zkumavek (Eppendorf) a vodná fáze byla znovu extrahována, tentokrát 0,5 ml ethylacetátu. Ethylacetátové extrakty byly spojeny a odpařeny do sucha na vakuové odparce DNA Speed Vac (DNA 110) firmy SAVANT.

Odparky obsahující nezreagovaný Sudan I a jeho metabolity byly rozpuštěny v 20 μ l methanolu a následně aplikovány na tenkou vrstvu silikagelu. Jako mobilní fáze byla použita směs rozpouštědel n-hexan, diethylether, aceton v poměru 1 : 0,7 : 0,3.

Deska s tenkou vrstvou silikagelu byla naskenována, upravena v obrázkovém prohlížeči IrfanView v 4.0 a skvrny odpovídající nepřeměněnému Sudanu I byly kvantifikovány pomocí programu Elfoman v 2.0, a to relativně vzhledem k intenzitě skvrny kontroly se známým množstvím Sudanu I.

Vodná fáze byla uchována pro měření UV/VIS absorpčních spekter.

3. 3. 4 Měření UV/VIS absorpčních spekter vodné fáze

Absorpční spektra byla měřena na spektrofotometru Diod Array 8453 v modu standard. Nastaveny byly dvě fixní vlnové délky: 484 nm (vlnová délka absorpčního maxima Sudanu I) a referenční vlnová délka 600 nm (pro korekci na zákal pravděpodobně způsobený precipitací BSA v silně kyselém pH). Pro získání výsledných hodnot absorbance byly od hodnot absorbance při 484 nm odečteny hodnoty absorbance při 600 nm a tyto hodnoty byly dále zpracovány v grafickém editoru MicroCal Origin v 6.0.

3. 3. 5 Stanovení molárního absorpčního koeficientu Sudanu I v destilované vodě, methanolu a ve fosfátovém pufru pH 9

Pro stanovení molárního absorpčního koeficientu (ϵ_{484}) Sudanu I v methanolu byl použit 1, 2, 4 a 8 μM Sudan I (zásobní roztok 500 μM v methanolu). Při stanovení ϵ_{484} Sudanu I v destilované vodě a fosfátovém pufru pH 9 byly použity roztoky 0,1, 0,2, 0,4, 0,8 a 1,6 μM Sudan I (zásobní roztok 500 μM v methanolu).

Do křemenné kyvety byla připravena směs o celkovém objemu 2 ml, která obsahovala příslušné rozpouštědlo a odpovídající koncentraci Sudanu I. Směs byla promíchána a poté byla změřena její absorbance při 484 nm.

Závislost absorbance na koncentraci byla vynesena do grafu a ze směrnice přímky byl určen molární absorpční koeficient.

4. VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Stanovení molárních absorpčních koeficientů Sudanu I ve vodě, v methanolu a ve fosfátovém pufru pH 9

Pro spektrofotometrické stanovení koncentrace Sudanu I v inkubační směsi bylo potřeba určit jeho molární absorpční koeficient (ϵ_{484}) v daném prostředí. Proto byly nejprve změřeny hodnoty ϵ_{484} Sudanu I ve vodě, methanolu a ve fosfátovém pufru o pH 9 - Tabulka 1. Z tabulky je patrné, že ϵ_{484} se mění v závislosti na prostředí, ale tato závislost není v případě Sudanu I příliš výrazná.

Tabulka 1. Hodnoty ϵ Sudanu I v uvedených rozpouštědlech

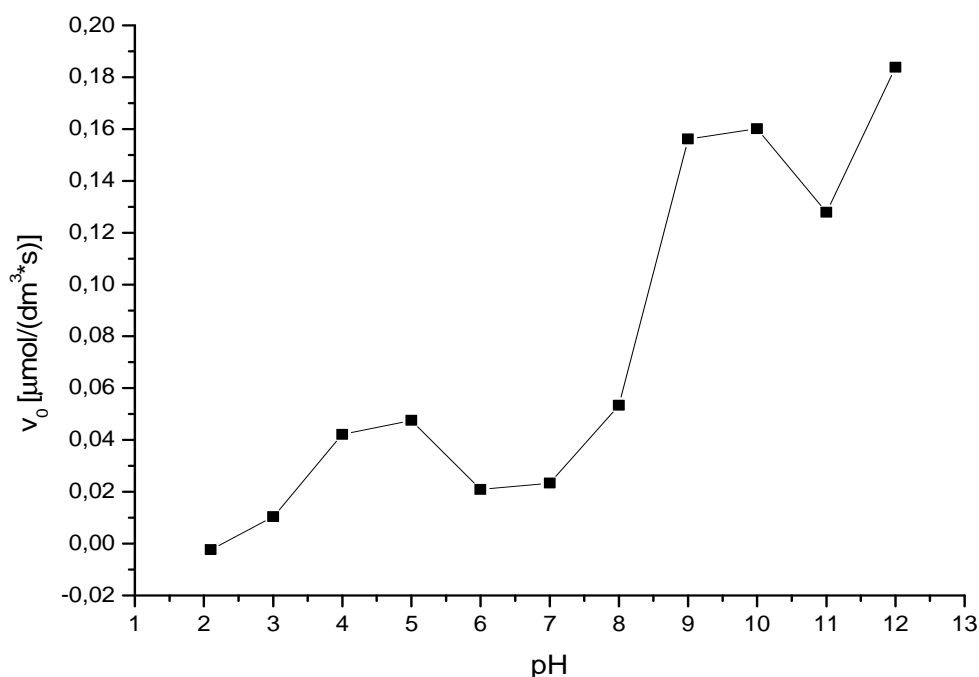
Rozpouštědlo	ϵ_{484} Sudanu I [$\text{dm}^3 \mu\text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$]
Destilovaná voda pH ~ 6	0,0124
Methanol	0,0163
Fosfátový pufr pH 9	0,0151

4.2 Spektrofotometrické stanovení pH optima oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou

Pro stanovení pH optima oxidace Sudanu I pomocí HRP v nadbytku H_2O_2 byla určena přibližná počáteční rychlost této reakce v závislosti na pH.

U inkubačních směsí byla sledována změna absorbance v čase, která byla vynesena do grafu. Směrnice počátečních lineárních úseků přímk v tomto grafu odpovídaly časové změně absorbance. Časová změna absorbance (ΔA_{484}) byla pomocí molárního absorpčního koeficientu Sudanu I v destilované vodě převedena na časovou změnu koncentrace, tedy na přibližnou počáteční rychlost reakce v_0 . (Podle Lambertova – Beerova zákona: $A = \epsilon \cdot c \cdot l$)

Hodnoty počáteční rychlosti reakce a pH pak byly vyneseny do grafu (viz Obr. 6).



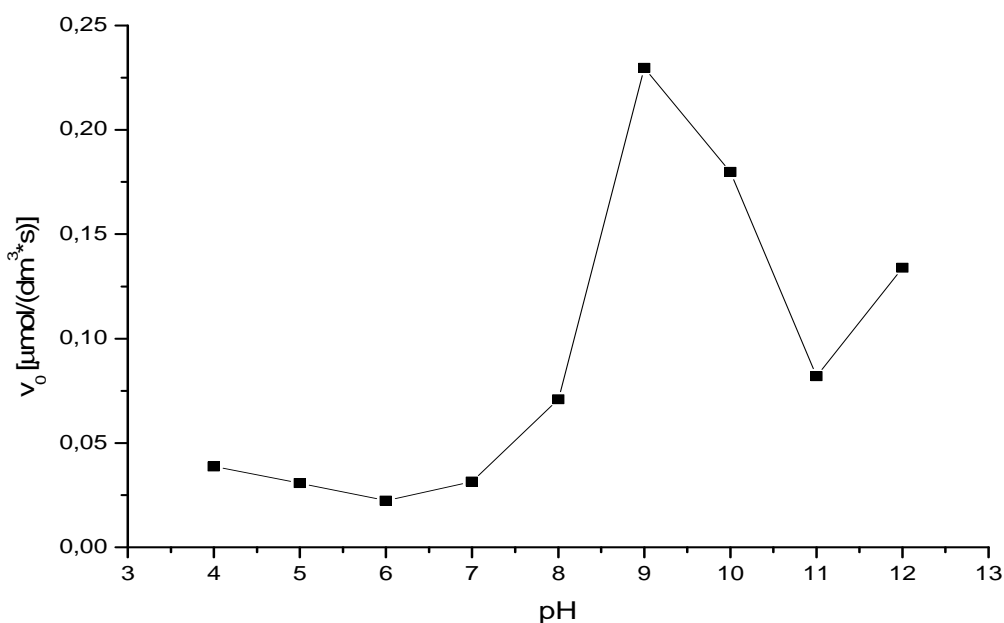
Obrázek 6. Závislost počáteční rychlosti reakce na pH – přibližná hodnota počáteční rychlosti reakce byla získána vydělením ΔA_{484} molárním absorpčním koeficientem (ϵ_{484}) Sudanu I v destilované vodě.

Oxidace Sudanu I pomocí HRP v přítomnosti nadbytku H_2O_2 je reakce s pH optimem v alkalické oblasti. Počáteční rychlost reakce vykazuje maximum mezi pH 9 a 10. Překvapivě vysoká počáteční rychlost pozorovaná při pH 12 by mohla být způsobena poklesem absorpance Sudanu I např. při jeho deprotonaci v silně alkalickém pH. Při porovnání UV/VIS spekter reakčních směsí pH 9 a 12 bylo po 10 min inkubace při pH 9 absorpční maximum směsi Sudanu I a jeho metabolitů 493 nm, zatímco inkubace při pH 12 vykazovala široké maximum v oblasti 460 – 470 nm a absorpce v oblasti kolem 495 nm byla minimální. Zdá se tedy, že metabolity Sudanu I se při pH 12 prakticky netvoří.

4. 3 Spektrofotometrické stanovení pH optima tvorby aduktů Sudanu I aktivovaného peroxidasou s BSA

Stanovení pH optima oxidace Sudanu I pomocí HRP v přítomnosti H_2O_2 a BSA bylo provedeno stejně jako v odstavci 4. 2. Z grafu na obrázku 7 (str. 21) vyplývá,

že se jedná opět o reakci s pH optimumem v alkalické oblasti. Nejrychleji je Sudan I přeměňován při pH 9. Podobně jako při hledání pH optima reakce bez přítomnosti BSA, je i zde patrný nárůst rychlosti při pH 12. Aby bylo možné potvrdit, zda pokles absorbance i při pH 12 souvisí s oxidací Sudanu I peroxidasou, byla provedena také analýza složení inkubované směsi pomocí TLC.

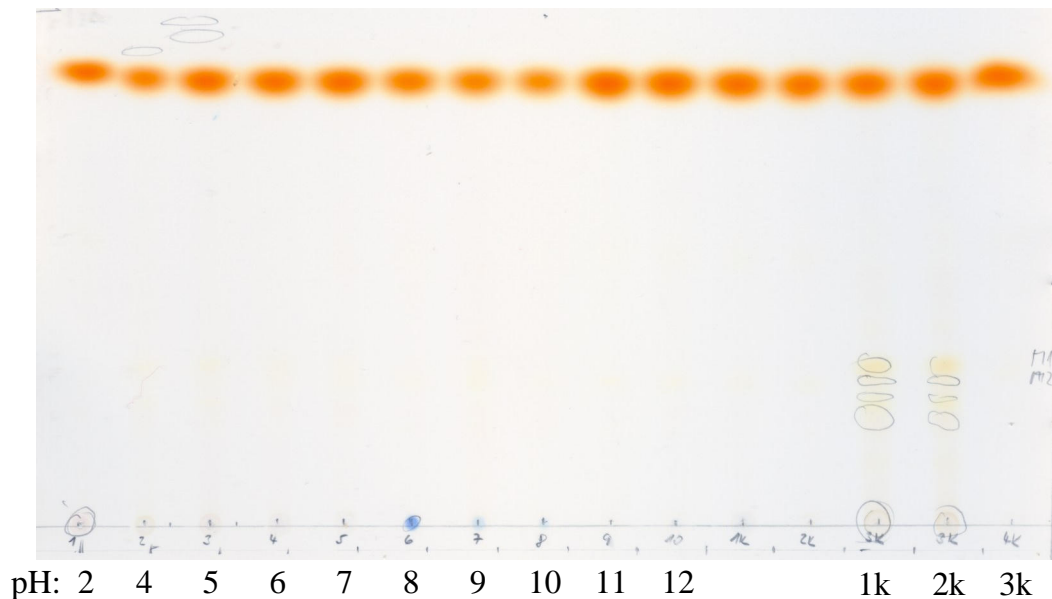


Obrázek 7. pH optimum oxidace Sudanu I pomocí HRP v přítomnosti H_2O_2 a BSA- na ose Y je symbolem v_0 označena přibližná počáteční rychlost reakce.

4. 4 Stanovení pH optima oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou v přítomnosti BSA metodou TLC

Vzorky připravené pro účel analýzy pomocí TLC byly inkubovány 60 minut při laboratorní teplotě. Poté byla provedena dvojitá extrakce ethylacetátem, do kterého přechází nezreagovaný Sudan I a jeho metabolity. BSA a adukty Sudanu I s BSA naopak zůstávají ve vodné fázi.

Sudan I a jeho metabolity byly separovány pomocí TLC (Obr. 8).

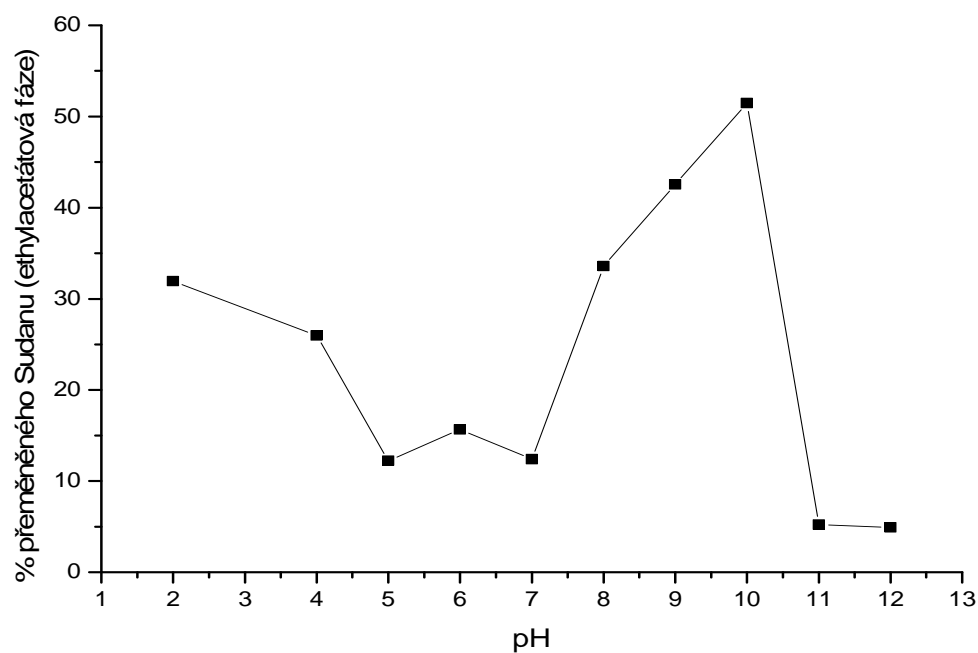


Obrázek 8. Separace Sudanu I a jeho metabolitů pomocí TLC – vzorky 1k a 2k jsou kontroly neobsahující BSA, vzorek 3k obsahuje pouze Sudan I a destilovanou vodu.

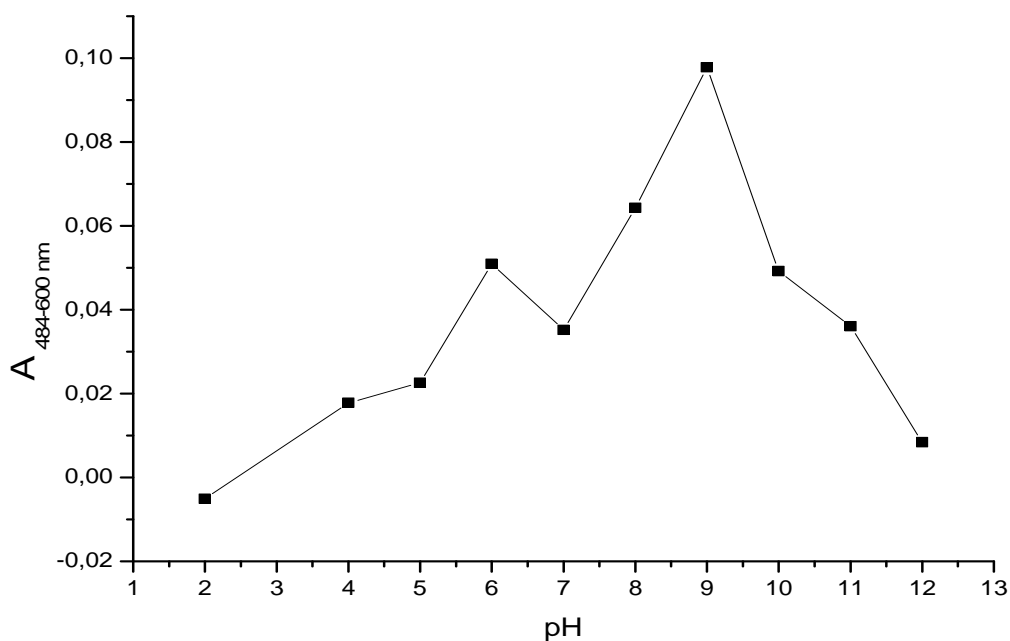
Skvrny odpovídající nepřeměněnému Sudanu I byly kvantifikovány pomocí programu Elfoman v 2.0 vzhledem ke kontrole, která obsahovala jen Sudan I a destilovanou vodu (Obr. 8, dráha 3k). Podobně jako při spektrofotometrickém stanovení, i zde bylo největší množství Sudanu I přeměněno při pH 9-10, ale v silně alkalickém pH k úbytku Sudanu I nedošlo (Obr. 9, str. 23). To je v souladu s předpokladem, že změna absorbance směsi při pH 12 souvisí spíše s nějakou reverzibilní změnou Sudanu I, jako je například jeho deprotonace spojená se zánikem jeho absorpčního maxima při 484 nm.

Zajímavé je, že ve vzorcích obsahujících kromě Sudanu I, HRP a H_2O_2 také BSA nebyli detekovány prakticky žádné metabolity Sudanu I. Ty byly nalezeny pouze v kontrole, která neobsahovala BSA (Obr. 8, dráhy 1k a 2k). Je tedy pravděpodobné, že Sudan I aktivovaný peroxidasou přednostně reaguje s modelovým proteinem (BSA) na úkor tvorby metabolitů Sudanu I.

Množství aduktů peroxidasou aktivovaného Sudanu I s BSA nalezené ve vodné fázi po extrakci ethylacetátem (Obr. 10) vykazuje podobné tendence jako úbytek Sudanu I (Obr. 9). Maximální množství aduktů je opět tvořeno při pH 9. Toto pH proto bylo zvoleno jako optimální pro další měření.



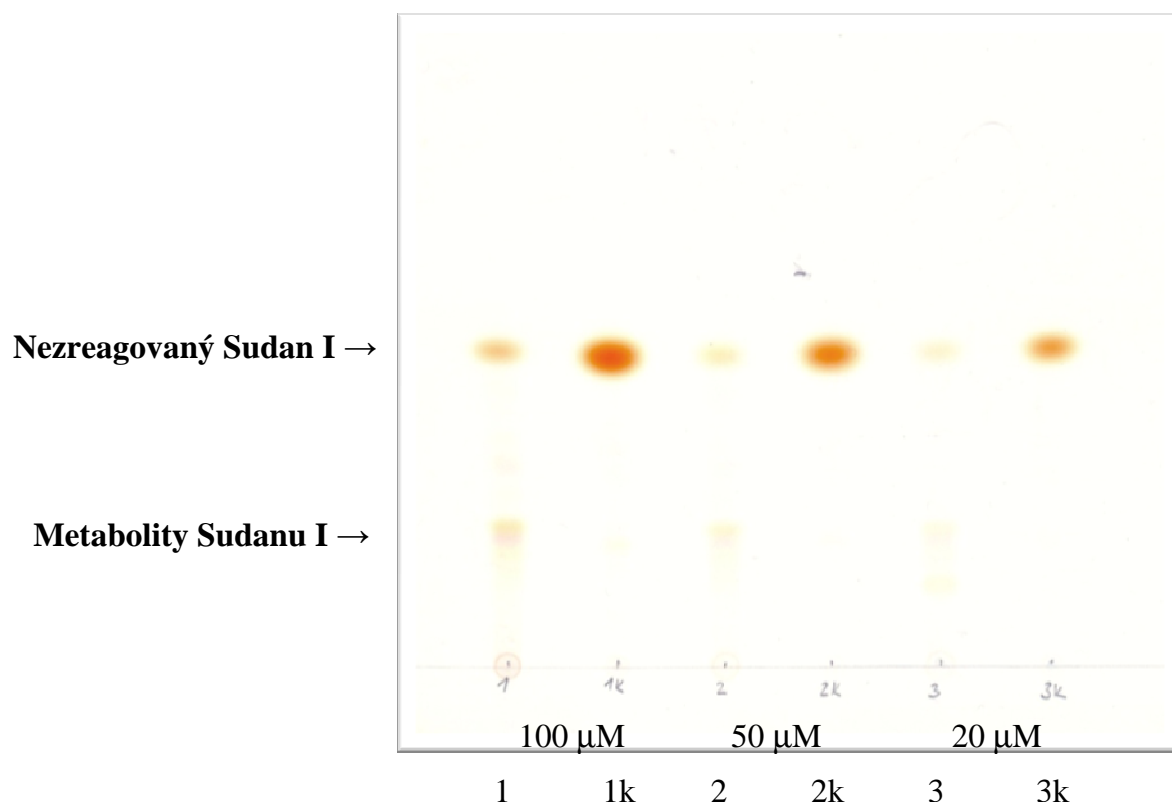
Obrázek 9. Efektivita oxidace Sudanu I pomocí HRP v přítomnosti H_2O_2 a BSA v závislosti na pH použitého pufru – procentuální zastoupení přeměněného Sudanu I v jednotlivých vzorcích (osa Y) bylo vypočítáno na základě kvantifikace skvrn odpovídajících nezreagovanému Sudanu I po TLC.



Obrázek 10. pH závislost tvorby aduktů Sudanu I aktivované peroxidasou s BSA – vyjádřeno jako absorbance vodné fáze (korigovaná na zákal) po extrakci Sudanu I a jeho metabolitů ethylacetátem.

4. 5 Určení efektivity přeměny Sudanu I peroxidasou pomocí TLC při pH 9

Pomocí TLC bylo zjištěno, že během 60-ti minutové inkubace Sudanu I s peroxidasou a H_2O_2 při pH 9 dojde k přeměně většiny Sudanu I (Obr. 11)



Obrázek 11. Separace produktů oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou pomocí TLC – TLC byla provedena pro tři vzorky (1, 2, 3) s různou koncentrací Sudanu I (100, 50, 20 μ M) a pro 3 kontrolní roztoky, které neobsahovaly HRP (1k, 2k, 3k).

Při nejvyšší koncentraci Sudanu I (100 μ M) zůstalo po 60-ti minutách inkubace v reakční směsi ještě téměř 15 % nezreagovaného Sudanu I (Tab. 2). To mohlo být způsobeno např. precipitací Sudanu I, kvůli jeho nízké rozpustnosti ve vodném prostředí. Proto bylo provedeno orientační stanovení počáteční rychlosti reakce pro širší škálu koncentrací Sudanu I také spektrofotometricky.

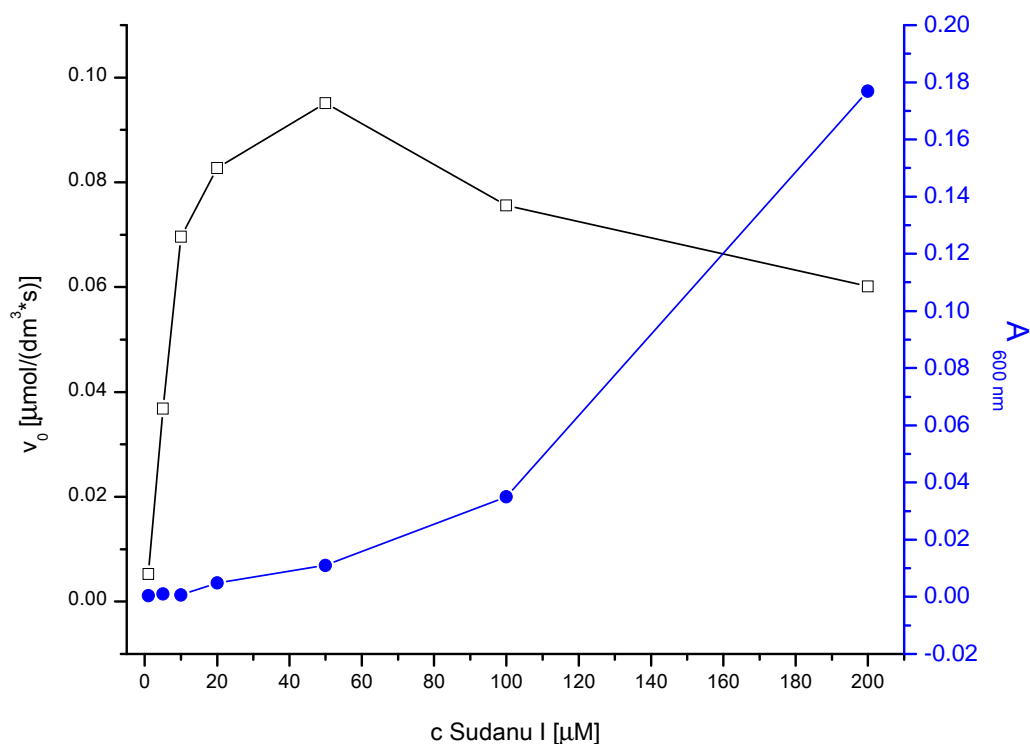
Tabulka 2. Množství nezreagovaného Sudanu I – kvantifikované po TLC z Obrázku 11.

Vzorek	Intenzita skvrny	% nezreagovaného Sudanu I
1 (100 μM Sudan I)	0,525	14,65
1k (100 μM Sudan I)	3,584	100
2 (50 μM Sudan I)	0,140	6,59
2k (50 μM Sudan I)	2,123	100
3 (20 μM Sudan I)	0,107	9,55
3k (20 μM Sudan I)	1,120	100

4. 6 Spektrofotometrické stanovení optimální koncentrace Sudanu I v reakční směsi

Pro tento účel byly připraveny inkubační směsi obsahující 200, 100, 50, 20, 10, 5 a 1 μM Sudan I, u kterých byla měřena změna absorbance v čase při 484 nm. Z ní pak byla vypočítána přibližná počáteční rychlost reakce, tentokrát pomocí molárního absorpčního koeficientu Sudanu I ve fosfátovém pufru o pH 9.

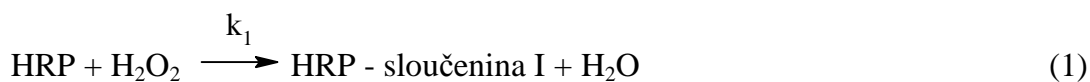
Jak je vidět z obrázku 12, již při poměrně nízké koncentraci Sudanu I v reakční směsi (20 μM) dochází k jeho precipitaci z roztoku. Hranice rozpustnosti Sudanu I ve fosfátovém pufru o pH 9 leží tedy někde mezi 10 a 20 μM . Množství precipitátu se s narůstající koncentrací Sudanu I zvyšuje a při koncentracích Sudanu I vyšších než 50 μM již dochází vlivem precipitace k výraznému poklesu rychlosti jeho přeměny (viz Obr. 12). V dalších experimentech proto byla používána maximálně 50 μM koncentrace Sudanu I.

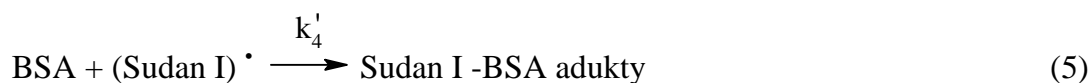
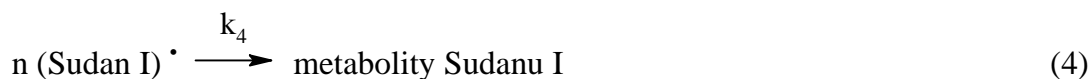


Obrázek 12. Závislost počáteční rychlosti reakce na koncentraci Sudanu I – na ose Y₁ (černá) je znázorněna počáteční rychlost oxidace Sudanu I pomocí HRP v přítomnosti H₂O₂. Osa Y₂ (modrá) ilustruje nárůst absorbance reakční směsi při 600 nm, působené především zákalem vznikajícím při precipitaci Sudanu.

4. 7 Odvození kinetických vztahů

Z kinetického hlediska probíhá oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou v nadbytku H₂O₂ podle typického peroxidasového ping-pong mechanismu. Na základě obecného kinetického modelu [14] bylo navrženo následující reakční schéma:





Předpokládáme, že se Sudan I z kinetického hlediska chová podobně jako ostatní známé substráty HRP [40]. Pro velikost rychlostních konstant pak platí: $k_1 \gg k_2 > k_3$. (Velikost k_1 se pohybuje v řádech $10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [40, 41].)

Dále předpokládáme, že následné reakce radikálů odvozených od Sudanu I probíhají velmi rychle a tudíž $k_3 \ll k_4$ a $k_3 \ll k'_4$. V celém reakčním sledu je pak krok (3) nejpomalejší a tedy určující celkovou rychlost reakce.

Vzhledem k tomu, že reakce vedoucí k tvorbě radikálů odvozených od substrátu během oxidace peroxidasou jsou ireverzibilní, nelze pro ně definovat Michaelisovu konstantu.

Rychlostní konstantu k_3 lze určit pomocí vztahu [14]:

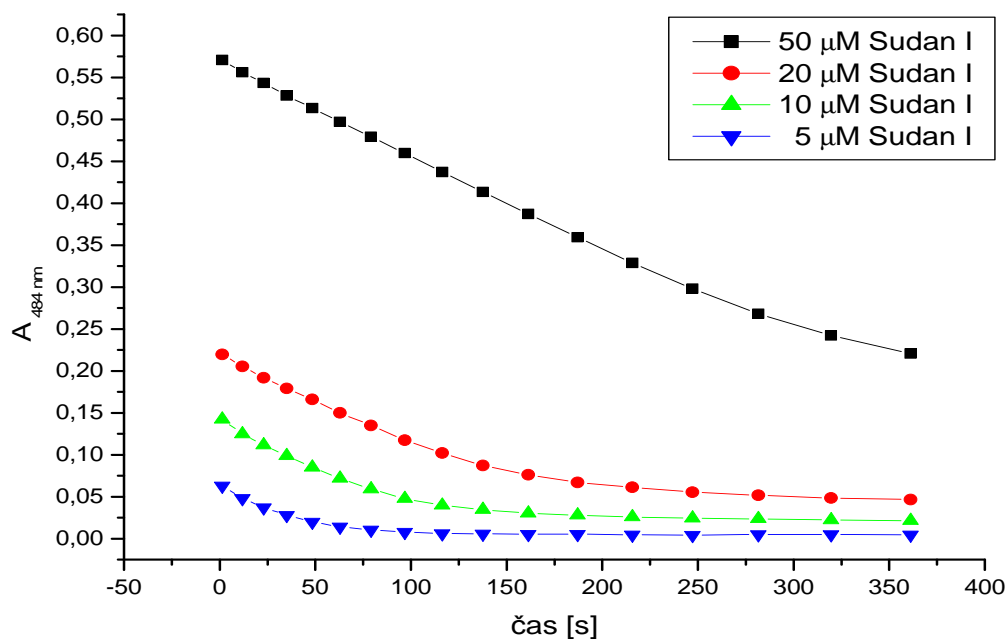
$$2[\text{HRP}]_0 / v_0 = 1/k_3[\text{Sudan I}]_0 + 1/k_1[\text{H}_2\text{O}_2]_0 \quad (6)$$

V našem případě je reakce prováděna v přítomnosti nadbytku H_2O_2 , tedy $[\text{H}_2\text{O}_2] \gg [\text{Sudan I}]$. Za předpokladu, že $k_1 \gg k_3$, lze poslední člen rovnice (6) zanedbat a upravit ji do tvaru:

$$2[\text{HRP}]_0 / v_0 = 1/k_3[\text{Sudan I}]_0 \quad (7)$$

4. 8 Stanovení rychlostní konstanty k_3 oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou v přítomnosti nadbytku H_2O_2

V průběhu oxidace Sudanu I pomocí HRP v přítomnosti nadbytku H_2O_2 byl sledován úbytek absorbance reakční směsi při 484 nm (Obr. 13).



Obrázek 13. Úbytek absorbance Sudanu I v čase

Aby bylo možné vypočítat rychlostní konstantu k_3 , bylo potřeba přepočítat ΔA_{484} na spotřebu Sudanu I. Ovšem vzhledem k tomu, že reakční produkty oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou také významnou měrou absorbují světlo při 484 nm, nelze předpokládat lineární závislost ΔA_{484} na $\Delta [\text{Sudan I}]$. Při znalosti A_{484} reakční směsi v čase $t \sim \infty$, obsahující prakticky již jen produkty reakce a jen zanedbatelné množství Sudanu I, lze odvodit vztah, kterým je možné tuto nelineární závislost popsat. Z tohoto vztahu lze pak vypočítat příspěvek změny koncentrace Sudanu I k celkové změně absorbance reakční směsi při 484 nm:

$$\Delta[\text{Sudan I}] = [\text{Sudan I}]_0 + \frac{-\frac{(A_0 - A_x)}{\epsilon_0 \cdot d} + [\text{Sudan I}]_0 \left(1 - \frac{\epsilon_\infty}{\epsilon_0}\right)}{\left(\frac{\epsilon_\infty}{\epsilon_0} - 1\right)} \quad (8)$$

ϵ_∞ - molární absorpční koeficient oxidačních produktů Sudanu I

ϵ_0 - molární absorpční koeficient Sudanu I

A_0 - absorbance reakční směsi při 484 nm v čase 0 s

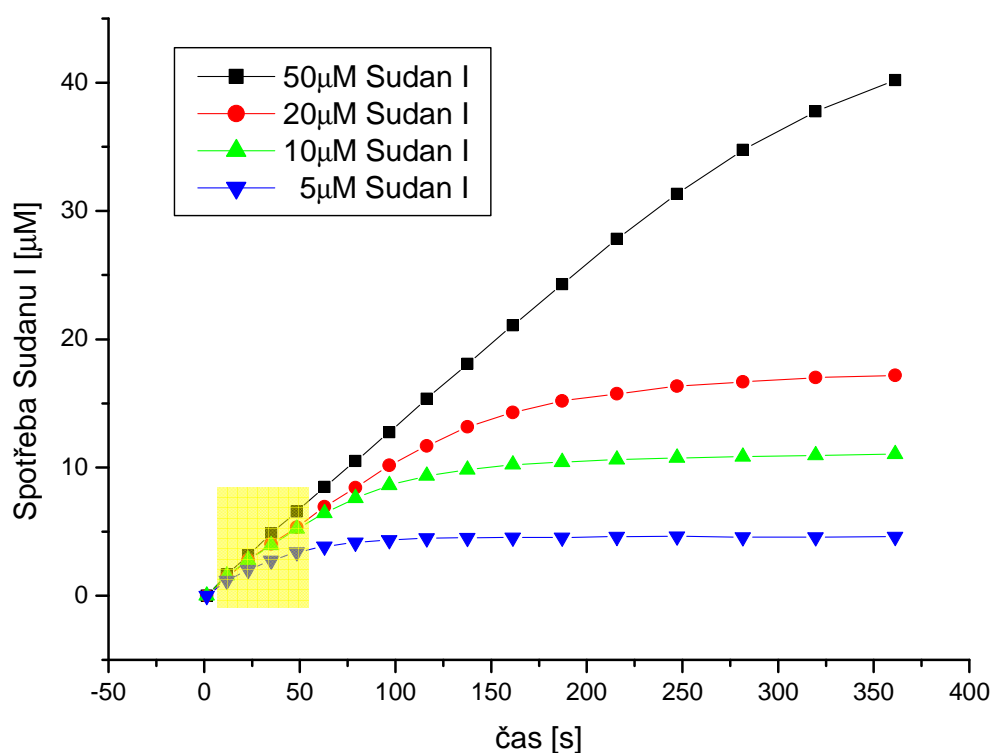
A_x - Absorbance reakční směsi při 484 nm v daném okamžiku reakce

$[Sudan\ I]_0$ - počáteční koncentrace Sudanu I v reakční směsi

$\Delta[Sudan\ I]$ - změna koncentrace Sudanu I v čase

d - optická dráha paprsku

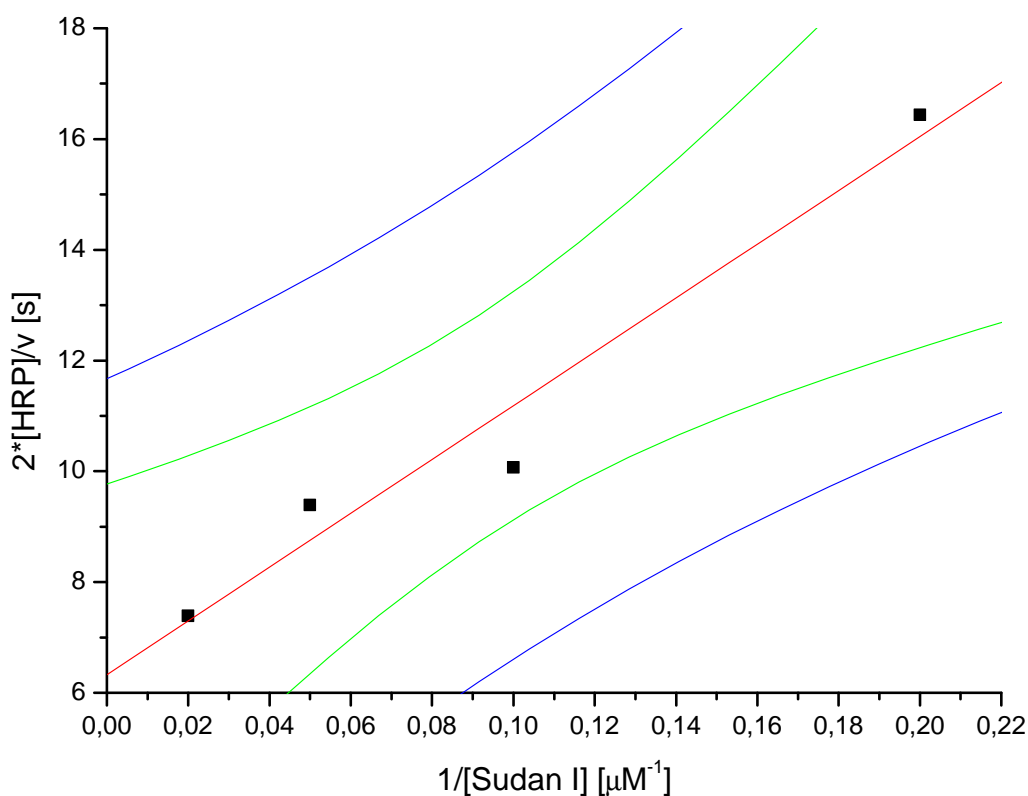
Aplikací tohoto vzorce bylo možné vypočítat změnu koncentrace Sudanu I v čase (Obr. 14). Množství spotřebovaného Sudanu I lineárně rostlo v závislosti na čase až do okamžiku, kdy byla většina substrátu přeměněna. Počáteční rychlost pro jednotlivé koncentrace Sudanu I byla získána ze směrnic lineárních regresí počátečních bodů. V grafu na obrázku 14 jsou tyto body podbarveny žlutě.



Obrázek 14. Spotřeba Sudanu I během reakce – žlutě jsou zvýrazněny úseky přímk, ze kterých byla získána směrnice odpovídající časové změně koncentrace substrátu (Sudanu I), tedy počáteční rychlosti reakce (v_0).

Na základě rovnice (7) byl sestaven graf závislost $2[\text{HRP}]_0/v_0$ na reciproké hodnotě počáteční koncentrace Sudanu I (Obr. 15). Směrnice tohoto grafu odpovídá výrazu $1/k_3$.

Výsledná hodnota rychlostní konstanty k_3 oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou v nadbytku H_2O_2 je $21\,000 \pm 3\,000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Tato hodnota je srovnatelná s rychlostní konstantou k_3 publikovanou pro ostatní efektivně oxidované substráty HRP, $19\,398 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ pro *N*-acetylytyrosin a $23\,000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ *N*-acetylytyrosinamid. Počáteční předpoklad, že radikálové reakce peroxidasou aktivovaného Sudanu I (rovnice (4)) probíhají rychleji než samotná tvorba těchto radikálů dle rovnice (3), je pravděpodobně splněn a platí tudíž vztah $k_3 \ll k_4$.

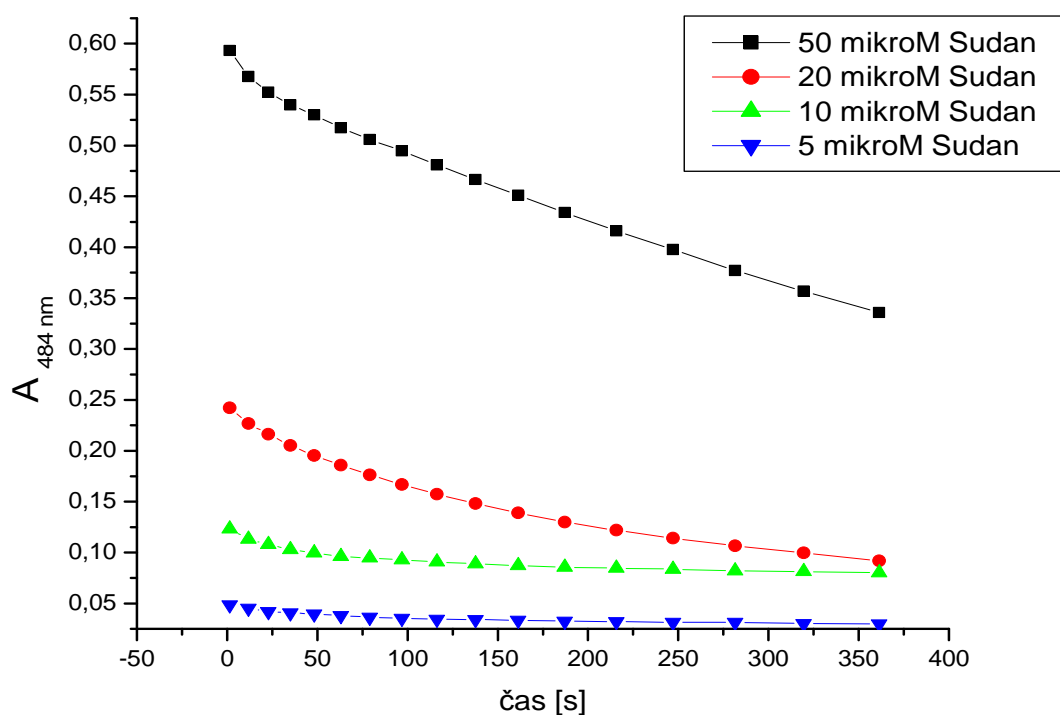


Obrázek 15. Graf závislost $2[\text{HRP}]_0/v_0$ na reciproké hodnotě počáteční koncentrace Sudanu I – směrnice přímků odpovídá reciproké hodnotě rychlostní konstanty k_3 .

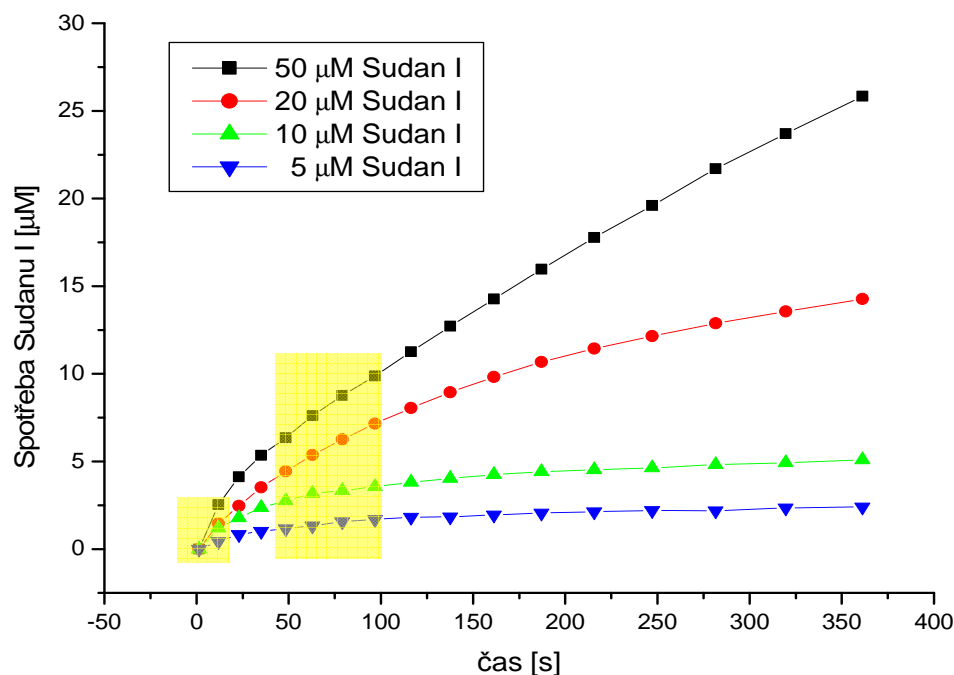
4. 9 Stanovení rychlostní konstanty k_3 oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou v přítomnosti BSA a nadbytku H_2O_2

Stejně jako při výpočtu rychlostní konstanty k_3 reakce bez přítomnosti BSA, byla i v tomto případě sledována časová závislost ΔA_{484} pro jednotlivé koncentrace Sudanu I (Obr. 16). Změna absorbance pak byla opět přepočítána pomocí vzorce (8) na změnu koncentrace Sudanu I (Obr. 17).

Přítomnost BSA v reakční směsi má velký vliv na kinetiku oxidace Sudanu I. Z průběhu časové závislosti na obrázku 17 je zřejmé, že zde dochází ke dvěma dějům ovlivňujícím absorbanci při 484 nm. Vzhledem k tomu, že oba děje mají různou směrnici a tedy i různou počáteční rychlost, byly v tomto případě stanoveny dvě hodnoty rychlostní konstanty.



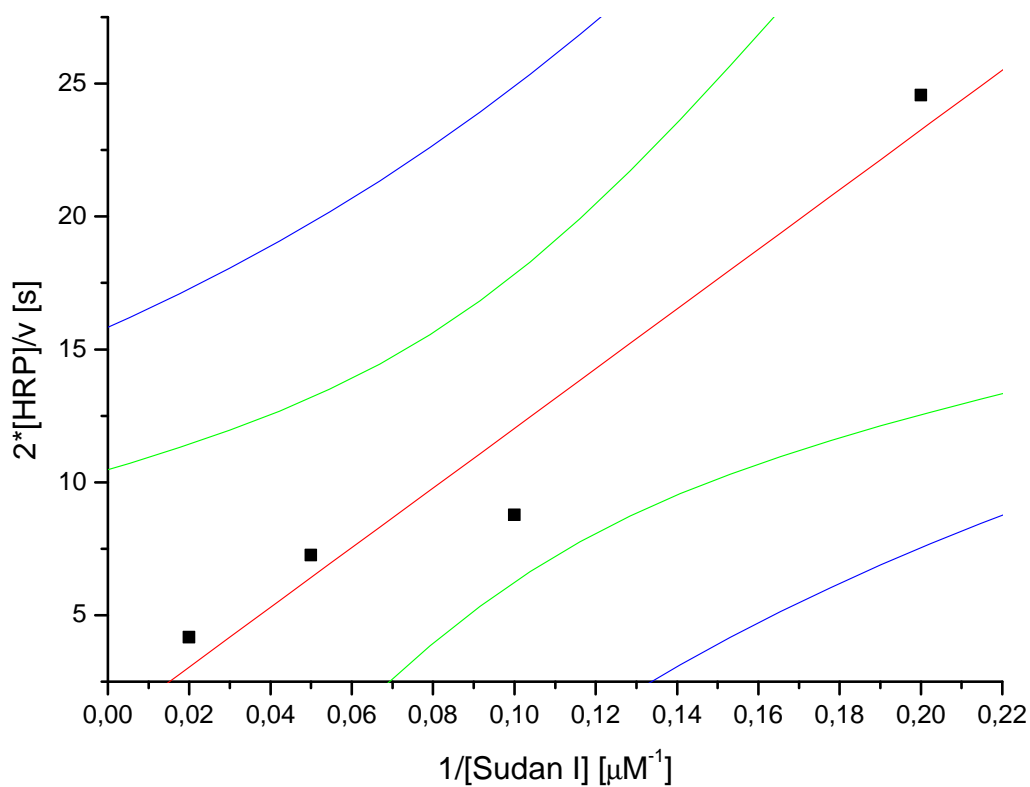
Obrázek 16. Změna absorbance reakční směsi s přidaným BSA při 484 nm



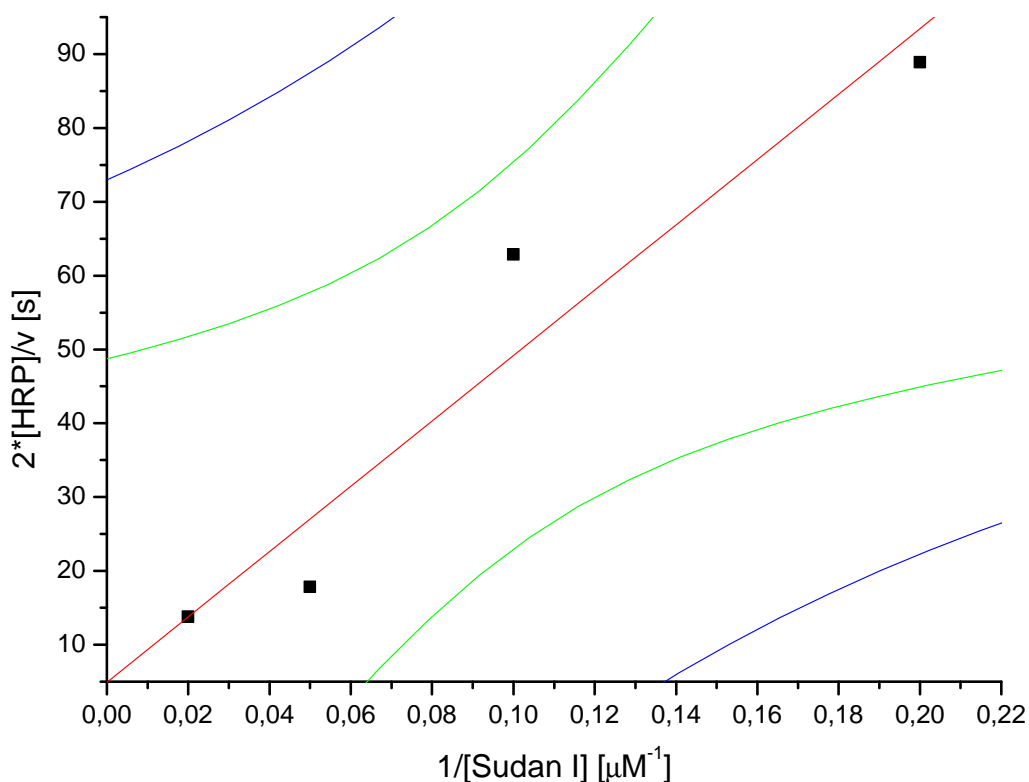
Obrázek 17. Spotřeba Sudanu I během reakce v přítomnosti BSA - k výpočtu počátečních rychlostí obou dějů probíhajících v reakční směsi obsahující BSA byly využity body přírůstek, které jsou podbarveny žlutě.

Předpokládáme-li, že první (rychlejší) děj souvisí s reakčními kroky z rovnic (3) až (5), je hodnota k_3 získaná lineární regresí (Obr. 18) rovna $9\,000 \pm 1\,500 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Ovšem hodnota rychlostní konstanty tohoto děje je spíše orientační, neboť jeho počáteční rychlost byla získána lineární regresí pouze dvou bodů a nelze tedy s jistotou říci, zda počáteční rychlost nemá hodnotu ještě vyšší. Skutečná hodnota k_3 pro tento děj se tudíž může od zde vypočtené hodnoty podstatně lišit.

Od cca 50 s roste spotřeba Sudanu I v čase již prakticky lineárně a lze tedy určit rychlost druhého (pomalejšího) děje (Obr. 19). Konstanta k_3 by pak měla hodnotu $2\,300 \pm 450 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$.



Obrázek 18. Graf závislosti $2[\text{HRP}]_0/v_0$ na $1/[\text{Sudan I}]$ – směrnice přímky odpovídá recipročné hodnotě rychlostní konstanty rychlejšího děje, který probíhá na počátku reakce.



Obrázek 19. Graf závislosti $2[\text{HRP}]_0/v_0$ na $1/[\text{Sudan I}]$ - na základě směrnice přímky byla stanovena rychlostní konstanta k_3 pomalejšího děje při oxidaci Sudanu I peroxidasou v přítomnosti H_2O_2 a BSA.

Změřené rychlostní konstanty dějů probíhajících v přítomnosti BSA jsou výrazně nižší než rychlostní konstanta k_3 tvorby radikálů Sudanu I naměřená ve směsi bez BSA. Vzhledem k tomu, že reakční kroky (1) – (3) by měly být stejné bez i v přítomnosti BSA, čekali jsme, že i rychlostní konstanty k_3 změřené pro tyto systémy budou shodné. **TYTO KROKY NEMOHOU BÝT STEJNÉ-KDYŽ VE SMĚSI NENÍ BSA, KROK 5 NEPROBÍHÁ** ano to byla chyba a už je opravena

Jako jedno z vysvětlení tohoto rozporu se nabízí zavržení počátečního předpokladu, že $k_3 \ll k'_4$, a tudíž že rychlost určující rychlostní konstantou se v přítomnosti BSA stává k'_4 , přestože platnost podobného vztahu ($k_3 \ll k_4$) byla v experimentech potvrzena. Změřená hodnota rychlostní konstanty by pak odpovídala ději (5). To ovšem není v souladu s předpokladem, že reakce radikálů jsou ve srovnání s ostatními reakcemi velice rychlé. Navíc, jelikož děje (4) a (5) si navzájem konkurují, měli by v případě, že jsou oba dva děje umožněny (v reakční je přítomen BSA i

radikály Sudanu I) převládat produkty rychlejší reakce, v tomto případě tedy metabolity Sudanu I. To je ovšem v příkrém rozporu s výsledkem experimentu provedeného metodu TLC (Obr. 8), kdy byla v přítomnosti BSA tvorba metabolitů Sudanu I prakticky zcela potlačena na úkor tvorby aduktů.

Nabízí se tedy jiné vysvětlení. BSA je známý svou afinitou k hydrofobním nízkomolekulárním látkám (např. mastné kyseliny, léčiva...), je tedy možné, že i Sudan I se na BSA nekovalentně váže. To by znamenalo, že skutečná koncentrace Sudanu I v roztoku obsahujícím BSA je pak výrazně nižší než jeho celková koncentrace. Do reakčního schématu by pak bylo potřeba doplnit ještě tuto rovnici:



Celková koncentrace Sudanu I v reakční směsi by pak byla dána vztahem:

$$[\text{Sudan I}]_{\text{celková}} = [\text{Sudan I}] + [\text{Sudan I} - \text{BSA}] \quad (10)$$

Pro korekci rychlostní konstanty reakce (3) na skutečnou koncentraci volného Sudanu I je tedy potřeba znát ještě disociační konstantu komplexu (Sudan I – BSA), tu však zatím nemáme k dispozici, a proto nebylo možné tuto teorii plně ověřit.

5. ZÁVĚR

Během studia oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou v nadbytku H_2O_2 se podařilo nalézt optimální podmínky tvorby metabolitů Sudanu I a jeho aduktů s modelovým proteinem, hovězím sérovým albuminem (BSA).

- Bylo zjištěno, že k neefektivnější oxidaci Sudanu I pomocí HRP dochází při pH 9. Přítomnost BSA pak nemá na toto pH optimum výrazný vliv. Tvorba aduktů Sudanu I aktivovaného peroxidasou s BSA vykazuje optimum také při pH 9.
- Hranice rozpustnosti Sudanu I ve fosfátovém pufru při pH 9 leží v rozmezí 10 - 20 μM .
- Počáteční rychlost oxidace Sudanu I je maximální při 50 μM koncentraci Sudanu I v reakční směsi, při vyšších koncentracích již dochází k precipitaci podstatné části přítomného Sudanu I a následnému poklesu rychlosti jeho oxidace.
- Byl navržen kinetický model pro oxidaci Sudanu I křenovou peroxidasou v nadbytku H_2O_2 a na jeho základě byla změřena rychlostní konstanta k_3 ($21\,000 \pm 3\,000 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) určující celkovou rychlost reakce. **Tato hodna je srovnatelná s publikovanými rychlostními konstantami k_3 jiných substrátů křenové peroxidasy.**
- Dále bylo zjištěno, že přítomnost BSA v reakční směsi má významný vliv na tvorbu metabolitů Sudanu I. Z výsledků získaných metodou TLC lze totiž usuzovat, že peroxidasou aktivovaný Sudan I přednostně vytváří adukty s BSA na úkor tvorby metabolitů Sudanu I.
- BSA **také** významně ovlivňuje **samotnou** kinetiku oxidace Sudanu I křenovou peroxidasou v přítomnosti nadbytku H_2O_2 . V tomto systému byly změřeny dvě rychlostní konstanty, jejichž hodnoty jsou nižší než u reakce bez přítomnosti BSA. **Zatím zůstává nevyřešena otázka přiřazení těchto konstant jednotlivým dějům, stejně jako zahrnutí vlivu** nekovalentní vazby Sudanu I na modelový protein.

V experimentech navazujících na předkládanou práci **plánujeme ještě ověřit vliv jiných** modelových proteinů, **za účelem** omezení nespecifické nekovalentní vazby Sudanu I na protein a pro bližší charakterizaci **aduktů vznikajících mezi Sudanem I aktivovaným peroxidasou a modelovým proteinem.**

6. LITERATURA

1. Stiborová, M.: Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace, Sborník z multioborového semináře, „Otevřená věda“, Praha (2005)
2. Stiborová, M.: Biochemie jako teoretický základ biomedicíny (MC250P34). Přednáška na PřF UK, katedra biochemie (2007)
3. Musil, J.: Úvod do biochemie chorobných procesů. UK Praha, Praha (1983)
4. LoPachin, R. M., DeCaprio A. P.: Protein adduct formation as a molecular mechanism in neurotoxicity. *Toxicological sciences* **86**, 214-225 (2005)
5. Stiborová, M.: Xenobiochemie (MC250P24). Přednáška na PřF UK, katedra biochemie (2008)
6. Stiborová, M., Mikšanová, M., Martínek, V., Frei, E.: Heme peroxidases: structure, function, mechanism and involvement in activation of carcinogens. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **65**, 297-325 (2005)
7. Reszka, K. J., Wagner, B. A., Burns, C. P., Britigan, B. E.: Effects of peroxidase substrates on the Amplex red/peroxidase assay: Antioxidant properties of anthracyclines. *Anal. Biochem.* **342**, 327-337 (2005)
8. Grison, R., Pilet, P.: *J. Plant Physiol.* **37**, 1181 (1986)
9. Welinder, K. G.: Superfamily of plant, fungal and bacterial peroxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 388 (1992)
10. Welinder, K. G. in: *Biochemical, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases* (Lobarzewski, J., Greppin, H., Penel, C., Gaspar, T.), p. 3. University of Geneva, Geneva (1991)
11. Hochman, A. in: *Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology* (Welinder, K. G., Rasmussen, S. K., Penel, C., Greppin, H), p. 103. University of Geneva, Geneva (1993)
12. Bach, A. N., Chodat, R.: Untersuchungen über die rolle der peroxyde in der chemie der lebenden zelle. IV. Über peroxydase. *Ber.* **36**, 600 (1903)
13. Bach, A. N.: Über die wirkungsweise der peroxydase bei der reaction zwischen hydroperoxyd und jodwasserstoffsäure. *Ber.* **37**, 3785 (1904)

14. Dunford, H. B.: Peroxidases in Chemistry and Biology, Vol. 11, Chapter 1, CRC Press, Boca Raton (1991)
15. Haschke, R. H., Friedhoff, J. M.: Calcium-related properties of horseradish peroxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **80**, 1039 (1978)
16. Berglund, G. I., Carlsson, G. H., Smith, A. T., Szöke, H., Henriksen, A., Hajdu, J.: The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature* **417**, 463-468 (2002)
17. IARC: Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Overall Evaluations of Carcinogenicity. Updating of IARC Monographs Volumes 1-42, suppl. 7, IARC, Lyon, 224 (1987)
18. Moller, P., Wallin, H.: Genotoxic Hazards of azopigments and other colorants related to 1-phenylazo-2-hydroxynaphtalene. *Mutat. Res.* **462**, 13-30 (2000)
19. Stiborová, M., Martínek, V., Rýdlová, H., Hodek, P., Frei, E.: Sudan I is a potential carcinogen for humans: evidence for its metabolic activation and detoxication by human recombinant cytochrome P450 1A1 and liver microsomes. *Cancer Res.* **62**, 5678-5684 (2002)
20. Kozuka, T., Tashiro, M., Sano, S., Fujimoto, K., Nakamura, Y., Hashimoto, S., Nakaminami, G.: Pigmented contact dermatitis from azo dyes. I. Cross-sensitivity in humans. *Contact dermatitis* **6**, 330-336 (1980)
21. Child, J. J., Clayson, D. S.: The metabolism of 1-phenylazo-2-naphthol in the rabbit. *Biochem. Pharmacol.* **15**, 1247-1258 (1966)
22. Stiborová, M., Asfaw, B., Anzenbacher, P., Lešetický, L., Hodek, P.: The first identification of the benzendiazonium ion formation from a nonaminoazo dye, 1-phenylazo-2-hydroxynaphtalene (Sudan I) by microsomes of rat livers. *Cancer. Lett.* **40**, 319-326 (1988)
23. Stiborová, M., Asfaw, B., Anzenbacher, P., Hodek, P.: A new way to carcinogenicity of azo dye, the benzendiazonium ion formed from a nonaminoazo dye, 1-phenylazo-2-hydroxynaphtalene (SudanI) by microsomal enzymes binds to deoxyguanosine residues of DNA. *Cancer. Lett.* **40**, 327-333 (1988)
24. Stiborová, M., Frei, E., Klokow, K., Wiessler M., Safarik, L., Anzenbacher, P., Hradec, J.: Peroxidase-mediated reaction of the carcinogenic nonaminoazo dye,

- 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene with transfer ribonucleic acid.
Carcinogenesis **11**, 1789-1794 (1990)
25. Stiborová, M., Frei, E., Schmeiser, H. H., Wiessler M., Hradec, J.: Mechanism of formation and ³²P-postlabeling of DNA adducts derived from peroxidative activation of carcinogenic nonaminoazo dye, 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene (Sudan I). *Carcinogenesis* **11**, 1843-1848 (1990)
 26. Stiborová, M., Frei, E., Schmeiser, H. H., Wiessler M., Hradec, J.: Detoxication products of the carcinogenic azodye Sudan I (Solvent Yellow 14) bind to nucleic acids after activation by peroxidase. *Cancer Letters* **68**, 43-47 (1993)
 27. Stiborová, M., Asfaw, B., Frei, E., Schmeiser, H. H., Wiessler M.: Identification of 1-(3,4-dihydroxyphenylazo)-2-hydroxynaphthalene as the product of oxidation of 1-phenylazo-2-hydroxynaphthalene (Sudan I, Sovent Yellow 14) by rat liver microsomes. *Collect. Czech. Chem. Commun.* **59**, 2727-2733 (1994)
 28. Stiborová, M., Asfaw, B., Frei, E., Schmeiser, H. H., Wiessler M.: Benzendiazonium ion derived from Sudan I forms an 8-(phenylazo)guanin adduct. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 489-498 (1995)
 29. Xu, H., Heinze, T. M., Chen, S., Cerniglia, C. E., Chen, H.: Anaerobic Metabolism of 1-Amino-2-Naphthol-Based Azo Dyes (Sudan Dyes) by Human Intestinal Microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, No. 23, 7759-7762 (2007)
 30. Semanská, M.: Studium oxidace karcinogenního azobarviva Sudanu I peroxidasou a jeho vazby na deoxyguanosin a guanosin: Diplomová práce PŘF UK Praha, katedra biochemie (2005)
 31. Miller, E. C., Miller, J. A.: The presence and significance of bound aminoazo dyes in the livers of rats fed p-dimethylaminoazobenzene. *Cancer Res.* **7**, 468-480 (1947)
 32. Lawley, P. D., Brooks, P.: The action of alkylating agents on deoxyribonucleic acid in relation to biological effects of the alkylating agents. *Exp. Cell Res* **9**, 512-520 (1963)
 33. Magee, P. N., Farber, E.: Toxic liver injury and carcinogenesis. Methylation of rat-liver nucleic acid by dimethylnitrosamine in vivo. *Biochem. J.* **83**, 114-124 (1962)

34. Liebler, D. C.: Protein Damage by Reactive Electrophiles: Targets and Consequences. *Chem. Res. Toxicol* **21**, 117-128 (2008)
35. Meyer, M. J., Bechtold, W. E.: Protein Adduct Biomarkers: State of the Art. *Environmental Health Perspectives* **104**, Supplement 5, 879-882 (1996)
36. Vineis, P., Caporaso, N., Tannenbaum, S. R., Skipper, P. L., Glogowski, J., Bartsch, H., Coda, M., Talaska, G., Kadlubar, F.: Acetylation phenotype, carcinogen-hemoglobin adducts, and cigarette smoking. *Cancer Res* **50**, 3002-3004 (1990)
37. Zwirner-Baier, I., Neumann, H.: Biomonitoring of aromatic amines IV: Use of hemoglobin adducts to demonstrate the bioavailability of cleavage products from diarylide azo pigments in vivo. *Arch. Toxicol* **68**, 8-14 (1994)
38. Ehrenberg, L., Hiesche, K. D., Osterman-Golkar, S., Wennberg, I.: Evaluation of genetic risks of alkylating agents: tissue doses in the mouse from air contaminated with ethylene oxide. *Mutat Res* **24**, 83-103 (1974)
39. Osterman-Golkar, S., Ehrenberg, L., Sagerback, D., Hallstrom, I.: Evaluation of genetic risks of alkylating agents II: Hemoglobin as a dose monitor. *Mutat Res* **34**, 1-10 (1976)
40. Michon, T., Chenu, M., Kellershon, N., Desmardil, M., Guéguen J.: Horseradish peroxidase oxidation of tyrosine-containing peptides and their subsequent polymerization. *Biochemistry* **36**, 8504-8513 (1997)
41. Shintaku, M., Matsuura, K., Yoshioka, S., Takahashi, S., Ishimori, K., Morishima, I.: Absence of detectable intermediate in the compound I formation of horseradish peroxidase at ambient temperature. *Journal of biological chemistry* **280**, 40934-40938 (2005)

