

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta



**Rozpustnost modelových karcinogenů a její modulace v
přítomnosti biomolekul**

**Solubility of lipophilic model carcinogens in water
environment and effect of biomolecules**

Martin Řeboun

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Václav Martínek, Ph.D.

Praha, 2013

Poděkování:

Na tomto místě bych rád poděkoval svému školiteli panu RNDr. Václavu Martínkovi, Ph.D. za zadání zajímavého tématu. Zvláště pak za cenné rady, ochotu a trpělivost, kterou mi během práce věnoval.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracoval samostatně pod vedením
RNDr. Václava Martínka, Ph.D. a všechny použité prameny jsem řádně citoval.

V Praze, 23. 8. 2013

Podpis

Martin Řeboun

Abstrakt:

2-Nitrobenzanthron (2-NBA) a 3-nitrobenzanthron (3-NBA) jsou široce zastoupené polutanty v životním prostředí. Jejich zdrojem je automobilová doprava, ale i jiné spalovací procesy. 3-nitrobenzanthron je prokázaným mutagenem a karcinogenem v savčích i bakteriálních systémech. Po metabolické aktivaci tvoří adukty s purinovými bázemi v DNA. Zatímco příbuzný 2-NBA vykazuje o 3–4 řády nižší genotoxické působení.

Jedním z cílů práce bylo stanovit rozpustnost 2-NBA, a také dalších dvou modelových karcinogenů - Sudanu I a ellipticinu ve vodném prostředí. Získané hodnoty porovnat mezi sebou a s již známou rozpustností 3-NBA. Rozpustnost by mohla být jedním z možných vysvětlení velmi nízkých genotoxických účinků 2-NBA oproti ostatním sledovaným látkám. Sudan I je azobarvivo, které se běžně používá k barvení nejrůznějších látek, a je to prokázaný lidský karcinogen. Ellipticin, rostlinný alkaloid, je látka zajímavá zvláště díky svým protinádorovým účinkům, které pravděpodobně souvisí s její genotoxicitou.

Důležitým cílem bylo stanovit vliv albuminu, proteinu krevní plasmy na rozpustnost jednotlivých sledovaných látek. K dalším cílům patřilo stanovení rozpustnosti sledovaných látek v methanolu, získání jejich extinkčních koeficientů a ověřit, popřípadě vylepšit, spektrofotometrické techniky, které byly použity pro tato stanovení. Ke stanovení byly použity dvě různé spektrofotometrické metody. Jedna byla založena na vymezení platnosti Lambertova – Beerova zákona. Zatímco druhá stanovovala koncentraci nad sraženinou, popřípadě krystaly dané látky.

Klíčová slova: rozpustnost, UV-VIS spektroskopie, 3-nitrobenzanthron, 2-nitrobenzanthron, ellipticin, Sudan I, , albumin, lysozym

Abstract:

2-Nitrobenzanthron (2-NBA) and 3-nitrobenzanthron (3-NBA) are pollutants widely occurring in the environment. The main sources of benzantrones are combustion products (i.e. diesel exhausts, wood and cigarette smoke ...). 3-NBA is proven strong mutagen and carcinogen for bacteria and mammals and it is probably mutagenic also to humans, while 2-NBA shows genotoxic properties lower by 3-4 orders of magnitude. Here we consider the possibility that large difference in the solubility, and consequently also the difference in bioavailability of these isomers could be the factor partially explaining this phenomenon.

One goal was to determine solubility of 2-NBA in water and compare it with 3-NBA and also with other carcinogens studied in our laboratory (Sudan I, ellipticine). Another objective was to evaluate the effect of model proteins (bovine serum albumin, lysozyme) on solubility of Sudan I and ellipticine. The last aim was to determine extinction coefficients of these compounds in water and in methanol.

Two different methods were employed to determine the solubility of the model compounds. The first method was based on spectrophotometric verification of the Lambert-Beer law. The results were then compared with other method measuring concentration of a compound in saturated solution

(In Czech)

Key words: solubility, UV-VIS spectroscopy, 3-nitrobenzanthrone, 2-nitrobenzanthrone, ellipticine, Sudan I, albumin, lysozyme

Seznam zkratek

[³ H] ellipticin	značený ellipticin pomocí izotopu vodíku
11-NBA	11-nitrobenzanthron
1-NBA	1-nitrobenzanthron
2-NBA	2-nitrobenzanthron
3,11-DNBA	3,11-dinitrobenzanthron
3',4'-di(OH)-Sudan I	(1-[(3,4-dihydroxyfenyl)azo]-2-naftol)
3,9,11-TNBA	3,9,11-trinitrobenzanthron
3,9-DNBA	3,9-dinitrobenzanthron
³² P-postlabeling	Značení pomocí radioaktivního fosfátu
3-ABA	3-aminobenzanthron
3-NBA	3-nitrobenzanthron
4',6-di(OH)-Sudan I	(1-[(4-hydroxyfenyl)azo]naftalen-2,6-diol)
4'-OH-Sudanu I	(1-[(4-hydroxyfenyl)azo]-2-naftolu)
6-OH-Sudanu I	(1-(fenylazo)naftalen-2,6-diolu)
9-NBA	9-nitrobenzanthron
A	absorbance
Abl	onkogen
AMK	Aminokyselina
BSA	hovězí sérový albumin (Bovine serum albumine)
C. I.	colour index
CD	cirkulární dichroismus
CO	oxid uhelnatý
COX	cyklooxygenasa
CYP	Cytochrom P450
dA	Deoxyadenosin
Da	dalton
dA-C8-N-ABA	N-(2'-deoxyadenosin-8-yl)-3-aminobenzanthron
dA-N ⁶ -ABA	2-(2'-deoxyadenosin-N ⁶ -yl)-3-aminobenzanthron
dG	deoxyguanosin
dG-C8-N-ABA	N-(2'-deoxyguanosin-8-yl)-3-aminobenzanthron
dG-N ² -ABA	N-(2'-deoxyguanosin-N ² -yl)-3-aminobenzanthron

DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ER	endoplasmatické retikulum
Erb B	onkogen
E _{red}	redukční potenciál
FAD	flavinadenindinukleotid
Fes	onkogen
Fos	onkogen
GIT	gastrointestinální trakt
G-proteiny	GTP dependentní proteiny
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HPLC	vysokotlaká chromatografie
HRP	křenová peroxidasa
HSA	Lidský sérový albumin (Human serum albumine)
Jun	onkogen
l	délka optického prostoru
LC-ESI-MS	metoda hmotností spektrometrie (kapalinová chromatografie spojená s ionizací elektron sprejem)
log P	dekadický logaritmus rozdělovacího koeficientu
LPO	laktoperoxidasa
LUMO	Nejnižší neobsazený molekulový orbital
MFO	system monooxygenas se smíšenou funkcí
Mos	onkogen
MPO	myeloperoxidasa
Myb	onkogen
Myc	onkogen
N	nevazebný orbital
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NAT1, NAT2	<i>N,O</i> -acetyltransferasa 1 a 2
NBA	Nitrobenzanthron
NCE	Nová chemická entita (new chemical entity)
N-PAH	Nitroaromatické polycyklické uhlovodíky
NQO1	NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa

p.p.m.	počet na milion částic
P450	pigment absorbující při 450 nm
PHS	Prostaglandin H-syntasa
POR	Cytochrom P450 reduktáza
Raf	onkogen
Ras	onkogen
Rel	onkogen
rev/nmol	počet zpětných mutací na nmol
rpm	otáčky za minutu
S9 frakce	Supernatant směsi jaterních enzymů centrifugovaný při 9000 g
SD	Směrodatná odchylka
Sis	onkogen
Src	onkogen
SULT1A1, SULT1A2	Sulfotransferasa 1A1 a 1A2
TA98	Kmen bakterií <i>Salmonella typhimurium</i>
TLC	Tenkovrstvá chromatografie
UV	ultrafialová část spektra
VIS	viditelná část spektra
$\varepsilon/\varepsilon_{kor}$	extinkční (korigovaný) koeficient
π	pi vazebný orbital
σ	sigma vazebný orbital
π^*	pi antivazebný orbital
σ^*	sigma antivazebný orbital

Obsah

Abstrakt:	4
Abstract:	5
Seznam zkratek	5
Obsah.....	8
1 Úvod.....	10
1.1 Vývoj onkologického onemocnění.....	11
1.2 Karcinogeneze	12
1.2.1 Fáze karcinogeneze	12
1.3 Biotransformace xenobiotik	14
1.3.1 První fáze biotransformace.....	15
1.3.2 Druhá fáze biotransformace	16
1.4 Enzymy podílející se na biotransformaci xenobiotik.....	16
1.4.1 Systém monooxygenas se smíšenou funkcí.	16
1.4.2 Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1.).....	17
1.4.3 NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa (EC 1.6.5.2)	18
1.5 Rozpustnost a metody jejího stanovení.....	18
1.6 Transport látek v organismu.....	22
1.7 Významná xenobiotika a karcinogeny	25
1.7.1 Sudan I.....	25
1.7.2 Ellipticin	27
1.7.3 Nitrobenzanthrony.....	30
1.8 Spektrofotometrie.....	36
2 Cíl práce	38
3 Materiál a metody.....	39
3.1 Laboratorní přístroje a chemikálie	39
3.2 Metoda a postup práce.....	40
3.2.1 Příprava zásobních roztoků	40
3.2.2 Práce se spektrofotometrem a použité nastavení.....	40
3.2.3 Korekce vlnových délek.....	42
3.2.4 Všeobecná ustanovení k metodám	45
3.2.5 Stanovení extinkčních koeficientů u vodných roztoků Sudanu I a ellipticinu.	46
3.2.6 Stanovení extinkčních koeficientů u vodných roztoků 2-NBA	47
3.2.7 Stanovení extinkčních koeficientů u methanolových roztoků Sudanu I	47
3.2.8 Stanovení rozpustnosti pomocí ověření platnosti Lambertova - Beerova zákona	47
3.2.9 Stanovení koncentrace roztoku nad krystaly Sudanu I	47
3.2.10 Stanovení koncentrace roztoku nad sraženinou ellipticinu ve vodě	48
3.2.11 Stanovení koncentrace roztoku nad krystaly ellipticinu a Sudanu I v methanolu.....	48
3.2.12 Stanovení vlivu proteinů pomocí ověření platnosti Lambertova - Beerova zákona	48

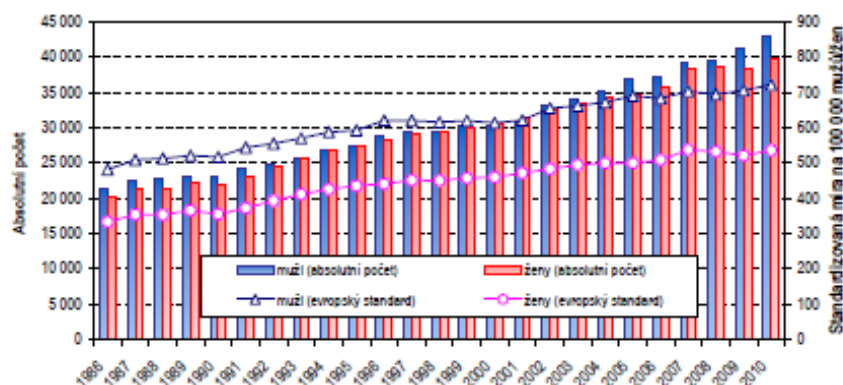
3.2.13	.Stanovení vlivu proteinů na rozpustnost stanovením koncentrace roztoku nad sraženinou.....	49
4	Výsledky.....	50
4.1	Stanovení Sudanu I.....	50
4.1.1	Stanovení extinkčních koeficientů Sudanu I.....	50
4.1.2	Stanovení rozpustnosti Sudanu I.....	52
4.2	Stanovení ellipticinu.....	54
4.2.1	Stanovení extinkčních koeficientů ellipticinu.....	54
4.2.2	Stanovení rozpustnosti ellipticinu.....	56
4.3	Stanovení 2-NBA.....	58
4.3.1	Stanovení extinkčních koeficientů 2-NBA.....	58
4.3.2	Stanovení rozpustnosti 2-NBA.....	59
4.4	Vliv proteinů na rozpustnost jednotlivých látek.....	60
4.4.1	Stanovení vlivu proteinů na rozpustnost Sudanu I.....	60
4.4.2	Stanovení vlivu proteinů na rozpustnost ellipticinu.....	62
5	Diskuze.....	65
6	Závěr.....	69
7	Citovaná literatura.....	71

1 Úvod

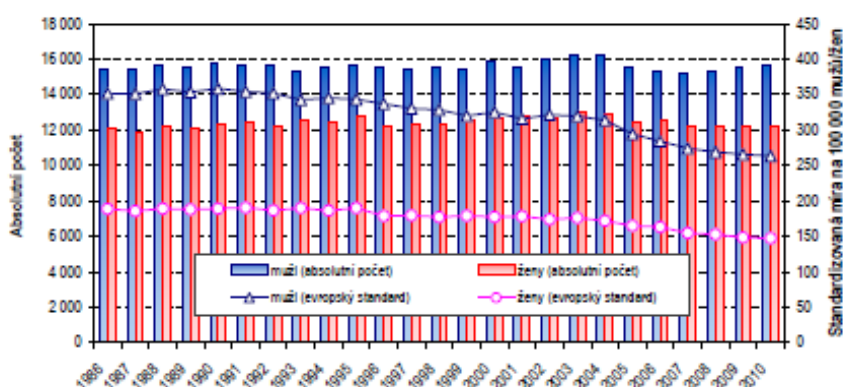
Současný vývoj společnosti vědy a techniky přináší do našeho stylu života relativní blahobyt. Bohužel nám také přináší spoustu obtíží, které souhrnně nazýváme civilizační choroby. Krom obezity spojené s kardiovaskulárními potížemi se mezi civilizační choroby může zařadit i rakovina.

Nádorová onemocnění byla v roce 2010 druhou nejčastější příčinou úmrtí. V témže roce bylo nově evidováno na 82 606 případů nových zhoubných a *in situ* novotvarů a zemřelo 27 834 pacientů. [1] Podle incidence nádorových onemocnění je dlouhodobě nejčastějším onemocněním rakovina kůže následovaná nádorem prostaty a prsu a tlustého střeva. I když onkologických případů dlouhodobě přibývá, úmrtnost vykazuje stagnaci a v posledních několika letech i mírný pokles (viz. Obrázek 1) [1].

Graf 1: Vývoj incidence ZN a novotvarů *in situ* u mužů a žen (1986–2010)



Graf 2: Vývoj úmrtnosti na ZN u mužů a žen (1986–2010)



Obrázek 1: Časový vývoj zhoubných novotvarů a novotvarů *in situ* a vývoj úmrtí na zhoubné novotvary v letech 1986 až 2010 v Československu a v České republice podle pohlaví v porovnání s evropským standardem. Graf uvádí absolutní počty i standardizovanou míru na 100 000 obyvatel [1].

1.1 Vývoj onkologického onemocnění

Projevem onkologického onemocnění je nádor (novotvar, tumor). Jedná se o nadměrně a nekontrolovatelně vznikající novou tkáň. Takto vzniklé nádory můžeme dělit na benigní, tedy nezhoubné, a maligní (zhoubné). Maligní nádory pronikají do jiných tkání. Tvoří metastázy, které se pomocí lymfatického nebo krevního řečiště šíří dále do těla, kde se usazují a rostou. Zatímco benigní nádory zůstávají lokalizovány ve svých původních orgánech a jsou tedy snáze chirurgicky odstranitelné [2–4].

Vznik nádorového onemocnění je ovlivněn různými faktory. Tyto faktory se v první řadě dělí na faktory vnitřní a vnější. Vnitřní faktory jsou dědičnost, oslabení či poškození obranyschopnosti jedince. Vnější faktory se vyskytnou až u 90 % procent všech nádorových onemocnění [5,6].

Vnější faktory se dělí podle druhu působení na:

Fyzikální:

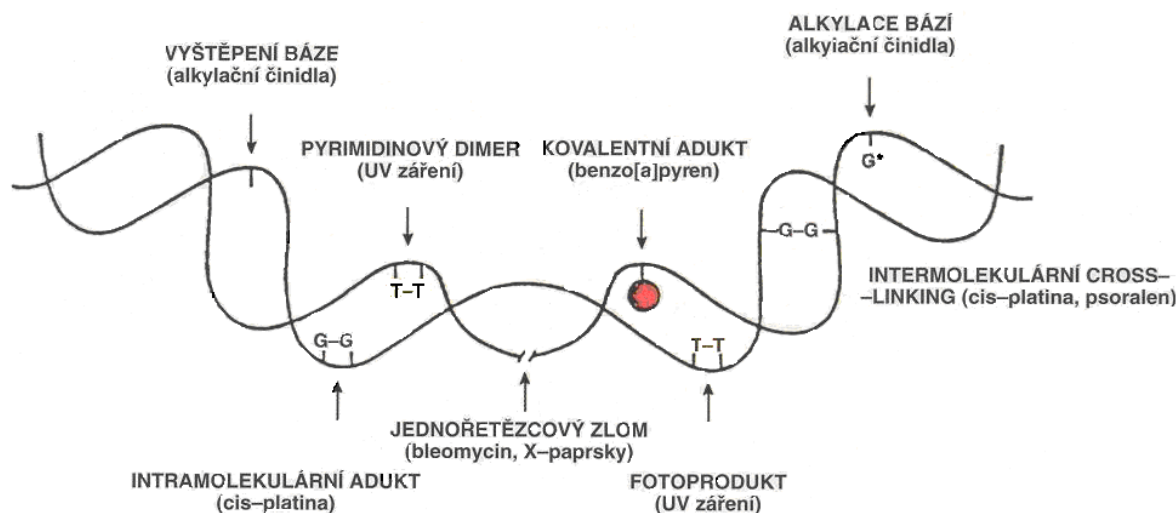
Tento vliv zahrnuje například Rentgenovo, ultrafialové či radioaktivní a kosmické záření. Dalším vlivem mohou být submikroskopické částice a s nimi spojená onemocnění jako jsou azbestóza a berylióza, které se projevují dlouhodobým zjizvováním plic [5–7].

Biologický:

Tento vliv zahrnuje především infekce organismů virů, bakterií a parazitů. Onkoviry podle odhadů mohou způsobit 15 – 20 % všech případů onkologických onemocnění [5–7].

Chemický:

Chemickým vlivem se rozumí vliv chemických látek, se kterými člověk přichází do styku. Jejich účinek se dělí podle způsobů účinku na genetickou informaci, a to na genotoxické, které tvoří kovalentní adukty s DNA, nebo na chemické karcinogeny způsobující změny struktury DNA. Těmi se myslí zlomy DNA, dělené na jednořetězcové (angl: single-strand break DNA) a dvou-řetězcové zlomy (angl: double-strand break DNA), nebo přesmyk řetězců (angl: cross-linking). Přesmyk může být intramolekulární či intermolekulární mezi dva řetězce DNA, nebo může docházet k interakci s proteiny. Poslední možností jsou mechanismy epigenetické, které tvoří nekovalentní interakce s DNA. Těmito interakcemi se myslí například vmezeření do šroubovice DNA. Všechny možnosti jsou zobrazeny na schématu (Obrázek 2) [2,3,8,9].



Obrázek 2: Schematické znázornění genotoxických účinků různých vnějších faktorů. [3]

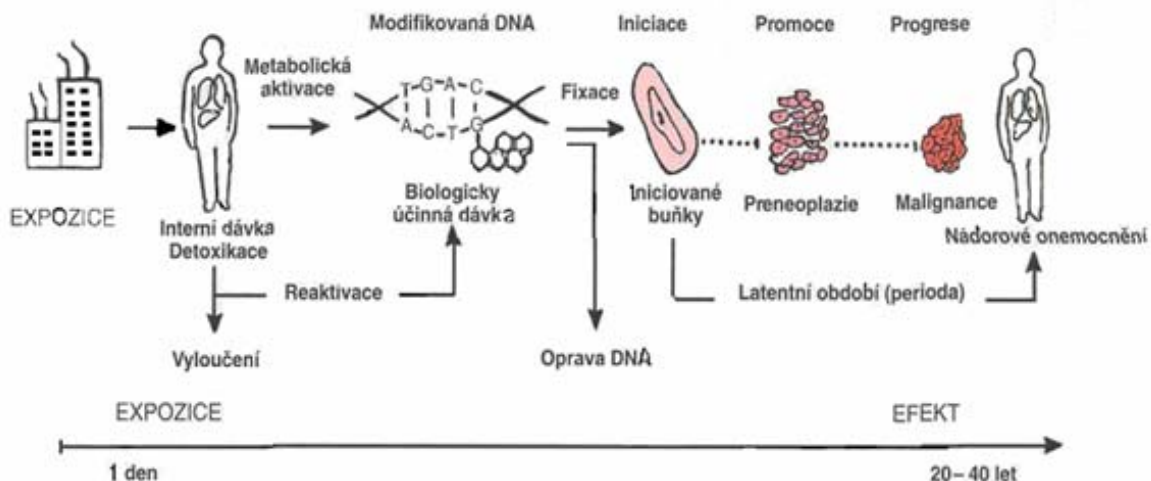
1.2 Karcinogeneze

Karcinogeneze představuje několikastupňový proces, při kterém se dlouhodobě kumulují poruchy na určitých genech. Narušení těchto genů následovně nabourává funkci jimi kódovaných proteinů. K rozvoji procesu stačí, aby došlo k poruchám v přibližně 0,1 % všech genů. Geny, jejichž poškození vede ke vzniku nádorového bujení, se dělí na protoonkogeny a tumor-supresorové geny [3,4,9]. Mutací protoonkogenů vznikají onkogeny, které se přepisují jako onkoproteiny. Ty následně nekontrolovatelně působí na proliferaci buněk, a tak rozběhnou nádorové bujení. Onkoproteiny mohou být růstové faktory (Sis), jejich receptory (Erb B), tyrosinkinasy (Abl, Src, Fes), G-proteiny (Ras), serinové nebo threoninové proteinkinasy (Raf, Mos) nebo transkripční faktory (Fos, Jun, Myc, Myb, Rel) [3,4,9].

Tumor-supresorové proteiny pracují jako inhibitory cyklin-dependentních kinas. Kinasy tlumí proliferaci a následně indukují proces řízeného zániku buněk – apoptózu. Cyklíny, cyklin-dependentní kinasy a jejich inhibitory jsou regulátory buněčného cyklu. Nádorové onemocnění pak případně vzniká jejich nevyváženou činností, které se projevuje nadměrným a nekontrolovatelným růstem buněk. [3,4,9]

1.2.1 Fáze karcinogeneze

U karcinogeneze rozlišujeme tři fáze. Iniciační, promoční a progresní. Celý průběh je znázorněn na obrázku (Obrázek 3)



Obrázek 3: Průběh karcinogeneze [3]. Na obrázku je znázorněn průběh karcinogeneze, od expozice karcinogenu, přes metabolickou aktivaci a všechny tři fáze karcinogeneze. Také je zde uvedena časová osa, na které je vidět, že může dojít ke vzniku onemocnění až za desítky let od expozice.

Iniciační fáze:

V této fázi dochází ke změnám na DNA. Jedná se o mutace, které vedou ke spuštění onkogenů a k deaktivaci tumor – supresorových genů. Dojde k tvorbě tzv. iniciované buňky. K tomuto jevu může dojít spontánně, nicméně reparační procesy či imunitní odezva způsobí nápravu. Největším podílem změn ve struktuře DNA je zastoupena kovalentní vazba, a to až 90 % u lidských karcinogenů. To se projevuje vazbou karcinogenu na bázi či deoxyribosu DNA [2,3].

Další možností modifikace DNA je tvorba hydroxyderivátů bází DNA působením radikálových forem kyslíku. Může jí být také tvorba cyklických aduktů vznikajících z genotoxických bifunkčních činidel. Radiace či tvorba interkalátů, nebo vznik pyrimidinových dimerů [3,8].

Promoční fáze

V této fázi se zvýší proliferace iniciovaných buněk, to vede ke vzniku benigního nádoru. Na tento jev působí různé promotory. Tedy látky s epigenetickým účinkem. Ty mohou být orgánově specifické (sacharin – močový měchýř, fenobarbital – játra), nebo působit v několika tkáních najednou. Nicméně mezi klíčové faktory jsou hlavně zahrnuta aktivita a

regulace proteinkinas a fosfatas. Významným faktorem mohou být aktivní formy kyslíku [2,8].

Fáze progresse

Tato fáze se v zásadě podobá iniciační fázi. Zásadním rozdílem je však rozsah modifikace DNA. Tak vznikají maligně pozmeněné buňky, které se nadále šíří do dalších tkání [2,8].

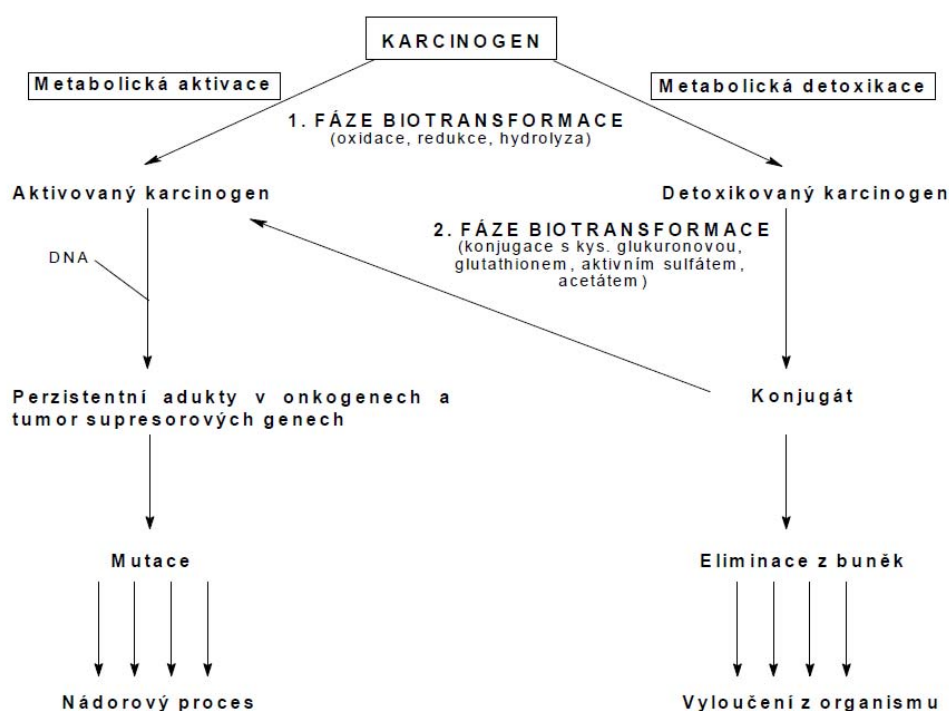
1.3 Biotransformace xenobiotik

Xenobiotika je označení pro cizorodé látky, kterým může být organismus vystaven, i když se v něm běžně vyskytovat nemají. Tyto látky často mají toxické účinky. Mohou být přírodního původu, nebo vznikají lidskou činností. Sem se řadí převážně látky vyráběné cíleně ať už v chemickém (plasty, nátěrové hmoty), potravinářském průmyslu (barviva, emulgátory), zemědělství (pesticidy, herbicidy, fungicidy). Mezi významné zdroje xenobiotik řadíme i farmaceutický průmysl či zplodiny z dopravy. [10,11]

Vstup těchto látek do organismu může probíhat perorálně, inhalačně nebo popřípadě transdermálně. Pak následuje transport krví nebo lymfou k cílové tkáni. Způsob detoxifikace těchto látek závisí na schopnosti rozpouštět se ve vodných roztocích nebo v tucích. Hydrofilní látky jsou schopny projít organismem rychle a brzy se vyloučí např. močí. Zatímco hydrofobní látky mají tendenci hromadit v membránách a tukové tkáni. Aby lipofilní látky mohly být z organismu vyloučeny, musí dojít k jejich metabolické přeměně – biotransformaci. To je souhrnné označení procesů enzymově katalyzovaných reakcí, které vedou k přeměně látky na látku s vyšší rozpustností. Tedy dojde ke zvýšení jejich hydrofilních vlastností. Tyto látky se pak snadněji vylučují z organismu. K biotransformačním procesům dochází v místech vstupu do organismu (plíce, kůže, GIT). Dále v ledvinách, ale nejvíce látek je přeměňováno v játrech.

Biotransformace se dělí na dvě základní větve (Obrázek 4). První je větev detoxifikační, kdy dojde k odstranění xenobiotika z buňky a k následnému vyloučení. Druhou cestou je cesta aktivační. Při této cestě vzniká výrazně více biologicky aktivní látka, než je původní mateřská sloučenina [10,11]. Této skutečnosti se využívá při aktivaci léčiv, kdy dochází k přeměně na aktivní formu léku. Nicméně u jiných látek takto roste toxicita a mutagenní či karcinogenní vlastnosti [12].

U živočichů se biotransformace dělí na dvě fáze. V první fázi dojde k zabudování nebo odkrytí funkční skupiny. Tato fáze se též nazývá derivatizační. Tak se látka připraví na druhou konjugační fázi. V této fázi dochází ke tvorbě konjugátů nově přeměněného xenobiotika s endogenními sloučeninami. Tak dojde k dalšímu navýšení hydrofility cizorodé látky. A následně může dojít k jejímu snadnějšímu vyloučení [13].



Obrázek 4: Průběh karcinogeneze. Schéma zobrazuje jednotlivé děje biotransformace. Rozděluje dvě základní větve: Metabolickou aktivaci a detoxikaci. Dále zdůrazňuje možný přesmyk v druhé části biotransformace [13].

1.3.1 První fáze biotransformace

V této fázi musí dojít ke zvýšení polaritativy látky. Toho je docíleno buď zavedením nové polární skupiny, nebo jejím demaskováním na molekule přeměňovaného xenobiotika. Zvýšení polaritativy dosáhneme jedním ze tří mechanismů, a to oxidačními reakcemi, nebo redukčními reakcemi a v neposlední řadě hydrolytickými reakcemi. Oxidační reakce jsou C-hydroxylace, N-hydroxylace, S-oxidace a N-oxidace. Dále to mohou být dealkylace a deaminace, epoxidace a oxidace alkoholů. Redukční reakce zastupují nitroredukce a azoredukce. Hydrolytických reakcí se účastní estery a amidy [10,11].

Pokud je již cizorodá látka dostatečně polární, může být vyloučena. Pokud není, vstupuje do konjugační fáze, aby mohla být vyloučena v konjugátu s více polární látkou. Všechny reakce první fáze jsou spojeny s enzymovými systémy. Tyto systémy jsou lokalizovány

v endoplasmatickém retikulu. Hlavní systém, který katalyzuje reakce, je systém monooxygenas se smíšenou funkcí (MFO). Jako terminální oxidáza slouží Cytochrom P450. Dále se reakcí účastní peroxidasy, dioxygenasy, alkoholdehydrogenasa, monooxygenasy, aldehyddehydrogenasa, katalasa. Také se na reakcích první fáze biotransformace podílí enzymy xanthinoxidasa, NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa (NQO1) a NADPH:cytochrom P450 oxidoreduktasa [3,10,11].

1.3.2 Druhá fáze biotransformace

V konjugační fázi probíhají metabolické reakce, při kterých dochází k syntéze konjugátu s endogenní sloučeninou nebo funkční skupinou. Takto vzniklý konjugát je rozpustnější ve vodě oproti původní sloučenině a je tedy schopen být vyloučen močí nebo žlučí. Látka vstupující do konjugátu musí obsahovat polární funkční skupinu, která je do látky zavedena v první části biotransformace. Mezi endogenní sloučeniny, reagující s xenobiotiky za vzniku stabilního produktu, patří kyselina glukuronová, aktivní sulfát, acetát, glutathion, glycin, taurin. Většina konjugátů se vyloučí z těla, a tak detoxifikuje organismus. Nicméně v určitých případech vede vznik konjugátu k tvorbě toxičtějšího aktivního metabolitu. Touto sloučeninou může být N-hydroxylovaný amin nebo aktivní acetát. Tyto sloučeniny se následně mohou rozpadnout za vzniku karbeniového nebo nitreniového iontu. Nově vzniklé reaktivní ionty mohou reagovat s DNA (Obrázek 4) a zahájit tak proces karcinogeneze [3,10,14].

Enzymy konjugační fáze jsou především transferasy. Nejvýznamnějšími představiteli jsou UDP-glukuronosyltransferasy, N-acetyltransferasy, glutathion-S-transferasy a sulfotransferasy [3,10,14].

1.4 Enzymy podílející se na biotransformaci xenobiotik

1.4.1 Systém monooxygenas se smíšenou funkcí.

Systém monooxygenas se smíšenou funkcí nebo též mikrosomální monooxygenasový systém (MFO) se podílí na oxidačních, oxygenačních a dokonce redukčních reakcích. Skládá se z NADPH:cytochrom P450 reduktasy, cytochromu P450 a fosfolipidové membrány. V některých případech může MFO obsahovat cytochrom b5 a NADH:cytochrom b5 reduktasu.

U eukaryot je MFO umístěn na vnější straně membrány endoplasmatického retikula (ER) převážně v orgánech, ve kterých je vyšší koncentrace xenobiotik. Především se jedná o játra, plíce a GIT. Zde se MFO podílí na první fázi biotransformace.

V přírodě se vyskytují tři systémy MFO. Krom výše zmíněného může existovat tzv. mitochondriální enzymový systém P450. Tento systém je umístěn na vnitřní straně mitochondriální membrány a skládá se z membránového cytochromu P450 a z rozpustného NADPH-P450 redukujícího systému. Zmíněný MFO se vyskytuje pouze v živočišné říši. Třetím typem je bakteriální systém, který nemá ani jednu složku MFO vázanou na membránu, ale volně se pohybují v cytoplasmě [5,15].

1.4.2 Cytochromy P450 (EC 1.14.14.1.)

V případě cytochromu P450 se jedná o hemový enzym podílející se na oxidačních dějích v metabolismu lipofilních látek. CYP je hemthiolátový protein, který se skládá z přibližně 500 aminokyselin a prosthetické skupiny protoporphyrinu IX. Železo obsažené v CYP je vázáno přes thiolátovou skupinu cysteinu na rozdíl od cytochromů, v kterých je železo vázáno přes imidazolový zbytek histidinu.

Lidské CYP se dělí na 18 rodin a 44 podrodin. Bylo identifikováno 57 funkčních cytochromů, které mají nejruznější funkční substrátovou i tkáňovou specifitu [16].

Hem se v jednotlivých CYP vyskytuje ve dvou spinových stavech. První z těchto forem je forma vysokospinová, v které se ion železa vyskytuje v pentakoordinovaném stavu a všechny jeho valenční elektrony jsou nespárované. Spin má tedy hodnotu 5/2. Ion železa se drží mimo rovinu porfyrinového skeletu. Druhá nízkospinová forma se vyznačuje tím, že železo je v hexakordinovaném stavu, jeho spin nabývá hodnoty 1/2 a zároveň se nachází v rovině porfyrinového systému [17].

CYP vystupuje v systému MFO jako terminální oxidasa, která přímo katalyzuje zabudování atomu kyslíku do molekuly substrátu. Všechny funkce, kterých může cytochrom P450 nabývat, jsou následující: Oxidasová, v které dochází k aktivaci molekuly kyslíku pro další oxygenasovou reakci CYP. Oxygenasová, ve které je aktivovaný kyslík včleněn do molekuly substrátu. Peroxidasová, kdy je kyslík nahrazen peroxidem bez spotřeby NADPH. Redukční, při které není aktivován kyslík, protože je vázán substrát jako šestý ligand. Poslední možnou funkcí je produkce peroxidu vodíku a aktivních forem kyslíku. To nastává v případě, když aktivovaná molekula kyslíku není zabudována do molekuly substrátu, ale je uvolněna do prostoru. Tam z ní zpravidla vzniká peroxid vodíku [14,17].

Druhý kyslík z molekuly je redukován na vodu. Elektrony k tomu potřebné jsou zajištěny NADPH:cytochrom P450 reduktasou [14,17].

1.4.3 NAD(P)H:chinon oxidoreduktasa (EC 1.6.5.2)

Je dalším enzymem, který se podílí na biotransformaci xenobiotik, tentokrát redukční cestou.

Tento enzym je představitelem skupiny flavoproteinů. Své redukční vlastnosti uplatňuje na široké spektrum látek, jako jsou chinony, naftochinony a azo- či nitrosloučeniny. NQO1 funguje jako dvouelektronová reduktasa, která může využívat NADH i NADPH jako kofaktory[18].

NQO1 se vyskytuje v cytosolu buněk eukaryotních organismů. U savců je nejvíce exprimován v játrech. Je to homodimer, který obsahuje v každém centru jednu prosthetickou skupinu FAD. Aktivní centrum je tvořeno z obou podjednotek. V případě působení NQO1 se setkáváme s ping-pongovým mechanismem. Při tomto mechanismu dochází k redukci flavinového kofaktoru pomocí pyridinových nukleotidů. Oxidovaný nukleotid se uvolní a následně váže substrát. Použitím heterodimerů bylo zjištěno, že podjednotky enzymu NQO1 fungují v případě dvouelektronových redukčních reakcí nezávisle na sobě [18,19].

1.5 Rozpustnost a metody jejího stanovení

Rozpustnost můžeme chápat jako vlastnost pevných kapalných nebo plyných látek, rozmíchaných v přebytku rozpouštědla, kterým může být buď kapalina, plyn nebo pevná látka, za vzniku termodynamicky stabilního homogenního roztoku.[20]

Vzniklé roztoky můžeme klasifikovat podle obsahu rozpuštěné látky. Vznikají tak roztoky nasycené, které obsahují přesně takové množství látky, které je za daných podmínek možné dosáhnout. Dále to mohou být roztoky nenasycené, ve kterých za daných podmínek můžeme látku dále rozpouštět a výčet uzavřeme roztoky přesycenými. Přesycené roztoky obsahují více rozpuštěné látky než by mělo být možno za daných fyzikálních podmínek rozpustit, proto dojde k jejímu vyloučení z roztoku. [21]

Rozpustnost rozpuštěné látky závisí na fyzikálněchemických vlastnostech této látky a rozpouštědla, teplotě, tlaku a pH roztoku. K vyjádření rozpustnosti látky se jako míra využívá obsah rozpuštěné látky v gramech vztažený na sto gramů rozpouštědla. Nicméně IUPAC

povoluje stanovení rozpustnosti jako molární koncentraci, molalitu, ale i jinými jednotkami.[21]

Stanovení rozpustnosti organických látek ve vodě má velký význam ve farmaceutickém průmyslu, v kterém je významnou součástí preformulačních studií nově vytvářených chemických entit (NCE), které jsou důležité pro vytvoření vhodných fyzikálně-chemických a farmaceutických forem léku [22]. Rozpustnost NCE je limitujícím faktorem absorpce léčiva z gastrointestinálního traktu pro různé pH. K určení rozpustnosti se ve farmaceutickém průmyslu využívá několik metod, jejichž data se navzájem doplňují a z nichž se skládá celkový obraz chování NCE v organismu. Metody můžeme rozdělit podle dat, která poskytují. První z nich jsou metody, které dávají čistá termodynamická data. Do těchto metod se řadí především stanovení pomocí tzv. Shaked flask method (metoda třepající láhve) a „stirred flask method“ (metoda míchané láhve). [22]

Metodou „třepající láhve“ se získávají hodnoty rozpustností sledovaných látek až v momentě, v kterém dojde k bezpečnému ustanovení termodynamické rovnováhy mezi rozpouštěným analytem v pevné a kapalně fázi. K ustanovení rovnováhy dochází zpravidla po delší době v řádu hodin až několika dní, rovnováhy se dosahuje při míchání roztoku při konstantní teplotě, v různých pufrech zajišťujících optimální pH. Na tato stanovení má pochopitelně vliv zvolený puf. Nevýhodou je časová náročnost. Koncentrace rovnovážných roztoků se zpravidla vyhodnocuje spektrofotometricky nebo pomocí HPLC. [22,24]

U metody „míchané láhve“ se postupuje tak, že se zásobní baňka s roztokem vytemperuje na určitou teplotu ve vodní lázni na magnetické míchačce. V zásobní baňce je roztok stanovované látky a nadbytek pevné fáze. Následně se několik hodin (12 hodin) nechá roztok za stálého míchání srážet, dokud nedojde k ustálení rovnováhy mezi pevnou a kapalnou fází. V dalším kroku se pevná fáze několik hodin usazuje, a následně se vytemperovanou pipetou odebere čirý roztok nad sraženinou, do předem zvážené baňky. Odebraný roztok se odpaří a stanoví se rozdíl v hmotnosti baňky před a po odpaření. Ze získané hmotnosti se rozpustnost dopočítá.[25]

Druhou řadou jsou metody získávající data ovlivněná kinetikou rozpouštění po případě precipitace. Data ovlivněná precipitací se běžně získávají pomocí turbidimetrie a nefelometrie.

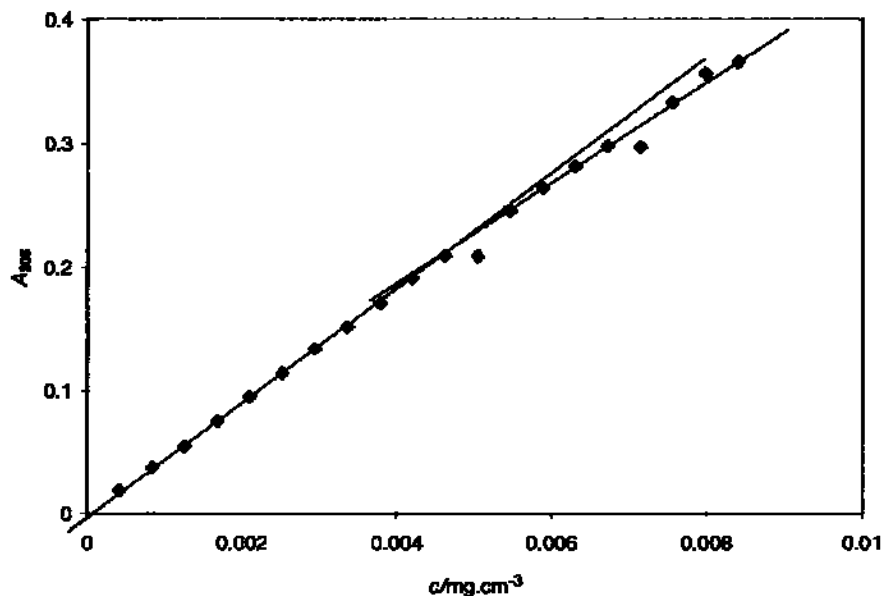
Při rozpouštění pevné látky jsou první známky rozpouštění řízeny chemickou kinetikou. Proto se stává, že u jedné látky můžeme dostat více dat o rozpustnosti. Rozpouštění pevné látky se řídí rovnicí Noeys - Whitneyho (Rovnice 1).[22,24]

$$\frac{dc}{dt} = \frac{A \cdot D}{l} (c_0 - c_l)$$

Rovnice 1

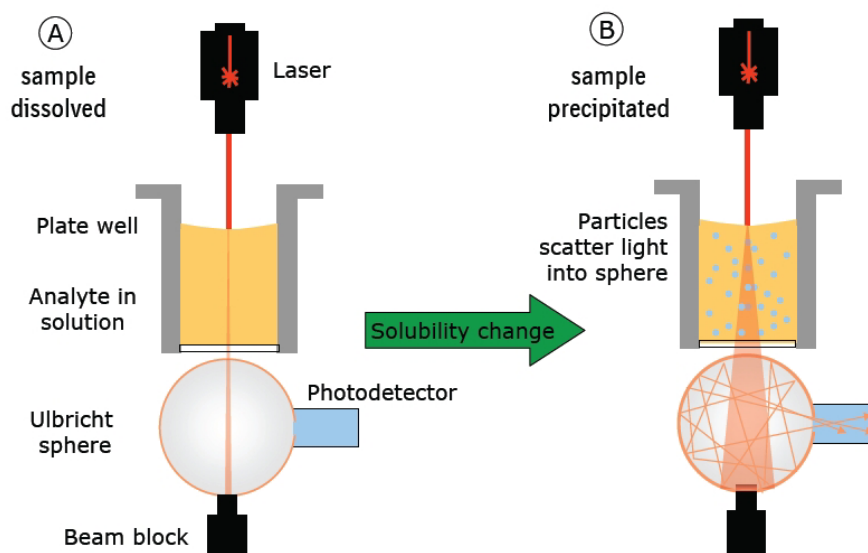
Kde člen dc/dt značí změnu koncentrace v čase. Koncentrace c_0 a c_l koncentraci nasyceného roztoku ve vzdálenosti 0 od pevné fáze a koncentraci v délce difuzní vrstvy l . Parametr A značí povrch, na kterém probíhá rozpouštění a D je difusní koeficient. Opakem rozpouštění je precipitace. U ní můžeme v počátku získat buď krystalický, nebo amorfni produkt. Počáteční produkt precipitace se nenachází v termodynamicky stabilním stavu a může se dále přeměňovat. Růst krystalu je řízen velikostí částic. Jemnější částice mají tendenci se znovu rozpouštět a následně rekrystalizovat a spojovat se do větších částic. Tomuto jevu se říká „Ostwaldovo zrání“ a toto pravidlo vysvětluje i skutečnost, že ke krystalizaci ze zcela čistých roztoků může dojít jen při velkém přesycení. [22–24]

Data z počátku precipitace dokážeme zachytit pomocí turbidimetrie. Při této metodě se využívá přidávání zásobního roztoku zkoumané látky v rozpouštědle, neomezeně mísitelného s cílovým rozpouštědlem, ve kterém chceme rozpustnost látky stanovit. Pro vodné roztoky se používá například DMSO. Dále se v turbidimetrické cele o dané optické délce zajišťuje míchání přebytku rozpouštědla, do kterého se po malých dávkách přidává roztok analitu a zaznamenává se nárůst absorbance. Nárůst absorbance se řídí Lambertovým - Beerovým zákonem až do začátku srážení. Začátek srážení se projeví změnou směrnice a nárůstu chyby, způsobené heterogenitou roztoku. Typický záznam turbidimetrických dat je na obrázku (Obrázek 5). Nevýhodou tohoto stanovení zpravidla bývají vyšší náklady na pořízení aparatury, vliv rozpouštědla zásobního roztoku a nutnost hledání dostatečně velkého kroku přídatku a času potřebného k difuzi do celého objemu, aby nedošlo ke skreslování dat předčasnou precipitací, v místě přidávání roztoku. [22–24]



Obrázek 5: Typické turbidimetrické stanovení zobrazuje nárůst absorbance v závislosti na koncentraci sledované látky (Ro112-7445/000) při vlnové délce 305 nm pH= 7,0 a teplotě 25°C, délka optického prostoru 1 cm. V průsečíku přímků došlo k vysrážení sledované látky a změně směrnice. [22]

Další metodou poskytující data o rozpustnosti je nefelometrie, která má podobné experimentální uspořádání. Nicméně k samotné detekci využívá laserový paprsek a speciální kruhový detektor (Obrázek 6). V části obrázku označeném „A“ je zachycen průchod laserového paprsku skrz kyvetový prostor do kruhového detektoru ukončeného terčíkem. V případě pravého roztoku terčík pohlcuje veškeré záření. Obrázek „B“ zachycuje stav, kdy precipitované částice rozptýlí světlo, které dopadne mimo terčík a kruhové zrcadlo nasměruje světlo do fotodetektoru. [26]



Obrázek 6: Schéma nefelometru A) zobrazení průchodu laserového paprsku rozpuštěným vzorkem. B) znázornění rozptylu na vznikajících částicích a detekce rozptýleného světla [26].

1.6 Transport látek v organismu

Pro popis pohybu látek v organismu můžeme použít rozdělení tohoto organismu na jednotlivé kompartmenty. Z farmakologického hlediska jsou jako kompartmenty chápány prostory, v jejichž objemu jsou hodnoty různých parametrů charakterizující pohyb látek konstantní. Těmito parametry se myslí difuzní koeficient a stupeň disociace. Za hlavní kompartmenty se považují krevní plasma nebo krev, intracelulární a extracelulární tekutiny a tuková tkáň. Tyto kompartmenty od sebe oddělují bariéry tj. membrány. [27]

Přes membrány může cizorodá látka nejčastěji pronikat pomocí pasivního transportu. Tento děj probíhá ve směru koncentračního gradientu, bez dodávání energie. Schopnost látek překonávat tímto způsobem membrány závisí na jejich lipofilitě. U látek majících vlastnosti ať už slabé báze nebo kyseliny, bude lipofilita závislá na pH. Další možností transportu látek je aktivní transport, který může probíhat proti transportnímu gradientu a je zprostředkován pomocí transportních proteinů, iontových kanálů atd. Aktivní transport probíhá za spotřeby energie nejčastěji ve formě (ATP). Posledním možným transportem přes membránu jsou dva opačné pochody – endocytóza a exocytóza. Endocytóza je děj, při kterém dochází k tvorbě kapsy na povrchu membrány a jejímu vchlípení do buňky. Dále dojde k tvorbě vesiklů, váčku, a odtržení od membrány. Těmito váčky vnikají do buněk makromolekulární látky nebo se tak mohou uvolňovat neurotransmitery. Exocytóza je pak děj opačný. [27]

K šíření látky organismem dochází nejčastěji jejím transportem pomocí krevního oběhu. Zde se může látka pohybovat buď volně rozpuštěná, nebo vázaná na proteiny krevní plasmy. I

když jen volná látka může podléhat biotransformaci, slouží vznik komplexu protein-látka jako depot tj. zásobní forma. Pokud klesne koncentrace volné formy, tak se rovnovážné složení obnoví rozpadem proteinového komplexu. Mezi proteiny krevní plasmy schopné vázat různé ligandy se řadí například transferin schopný vázat Fe^{3+} , hemopexin schopný vázat volný hem a především albumin, který slouží jako nosič pro mnoho látek. [28]

Albumin byl zvolen jako modelový protein, na kterém jsem se snažil demonstrovat vliv proteinů na rozpustnost mnou sledovaných látek. Zvýšená rozpustnost a přenos látek do místa účinku by mohla mít vliv na jejich metabolismus a karcinogenitu.

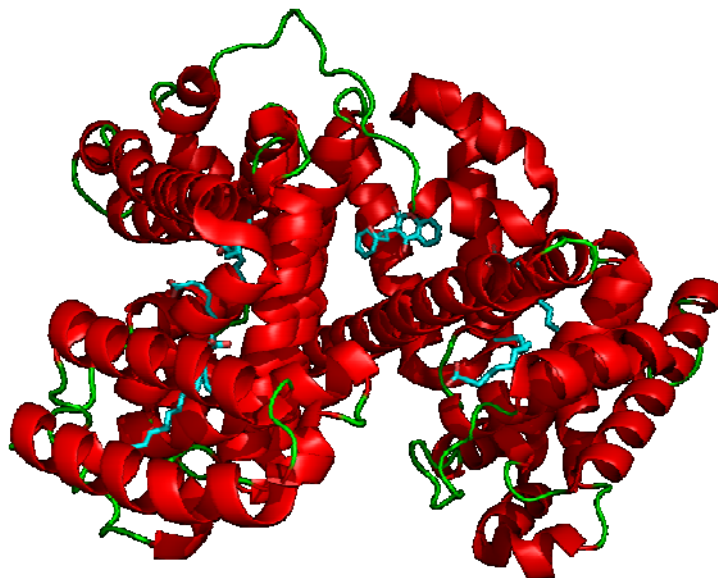
Albumin je jedním s nejvíce rozšířeným proteinem krevní plasmy, v níž představuje až 60% celkového obsahu bílkovin. Molekula albuminu je záporně nabitá a neobsahuje žádnou prosthetickou skupinu. V pevné formě je albumin bílým práškem, který je dobře rozpustný ve vodě. Roztoky, které tak vznikají, jsou čiré, nicméně při rozpouštění špatně purifikovaného albuminu mohou být i nažloutlé. Příčinou tohoto jevu je výše zmíněná schopnost albuminu vázat nízkomolekulární ligandy jako jsou mastné kyseliny, léčiva nebo thyroïdní hormony.

Lidský albumin je tvořen 585 aminokyselinami o molekulové hmotnosti 65 200 Da. Molekula hovězího sérového albuminu (BSA) je tvořena 583 AMK a její molekulová hmotnost je 66 700 Da. Lidský a hovězí albumin vykazují vysoký stupeň sekvenční homologie, která je 87%. [28]

Schopnost albuminu vázat různé ligandy je dána jeho třemi doménami a velkým počtem míst, kam se mohou ligandy vázat. Albumin nejspecifičtěji váže hydrofobní organické anionty, jakými jsou mastné kyseliny (olejová, palmitová atd.), pro které má molekula albuminu až šest vazných míst. Takto albumin přenáší většinu volných mastných kyselin v krvi. Další látky, které může albumin vázat, jsou například hem nebo bilirubin. Mezi menší molekuly, které se na molekulu proteinu vážou, se řadí hydrofobní molekula tryptofanu nebo kyselina askorbová. Dále albumin umí vázat širokou paletu nízkomolekulárních léčiv s obsahem thiolových skupin. Za vazbu těchto látek odpovídá cystein v poloze 34, protože jako jediný ze všech cysteinů netvoří intramolekulární disulfidický můstek.

Jedním z léčiv, které jsou albuminy schopny vyvazovat, je molekula warfarinu, kterou dokáže albumin vázat do speciální kapsy. Albumin dokáže vázat oba enantiomery tohoto léčiva s podobnou afinitou. Nicméně modulace vazby warfarinu je ovlivňována vazbou mastných kyselin. Struktura tohoto uspořádání je zobrazena na obrázku (Obrázek 7) [29]. Zajímavým zjištěním vazby nízkomolekulární látky bylo stanovení počtu vazných míst pro Sudan I, pomocí spektrofotometrických technik (CD spektroskopie, fluorescence a UV-Vis

spektrofotometrie), na molekulu BSA se při 25°C váže jedna molekula Sudanu I a její disociační konstanta je přibližně 8 $\mu\text{mol/l}$ [30].



Obrázek 7: Molekula lidského sérového albuminu s navázaným léčivem - warfarinem (u prostřed světla modrá struktura) a mastnými kyselinami . (Struktura vytvořena podle PDB ID 1H9Z) [29]

Albuminy jsou také schopny vázat ionty kovů, nejpevněji se na albumin vážou měďnaté, nikelnaté a kobaltnaté ionty. Tyto ionty se vážou na N-koncovou část molekuly (platí pro lidský sérový albumin). Dále se pomocí albuminu přenáší vápenaté, hořečnaté a zinečnaté ionty. [28,31]

Další bílkovinou krevní plasmy studovanou v této práci je globulární protein lysozym. Lysozym je glykosidasa (EC 3.2.1.17), která hydrolyzuje β -1,4-glykosidické vazby mezi N-acetyl-D-glukosaminem a N-acetylmuramovou kyselinou. Je součástí různých tělních tekutin, jako jsou slzy, sliny a krevní sérum, dále je obsažen ve vejcích různých živočichů. Jeho enzymová aktivita je nespecifickou imunitní odpovědí organismu, protože vykazuje baktericidní účinek proti gram-pozitivním bakteriím. [32]

1.7 Významná xenobiotika a karcinogeny

1.7.1 Sudan I

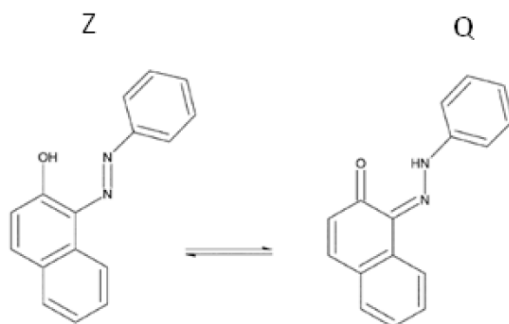
Sudan I, systematickým názvem (fenylazo)-2-naftol, je významným představitelem azobarviv. Proto má také širokou škálu technických označení v C. I. (colour index), běžně se používají názvy: Solvent Yellow 14 nebo Oil Orange.

Azobarviva jsou rozsáhlá skupina chemicky příbuzných látek, které absorbují ve viditelné oblasti spektra. Azobarviva pokrývají celou škálu barev od žlutozelené přes oranžovou až po hnědou nebo modrou barvu, jsou nejpočetnější skupinou organických barviv. Jejich barevnost jim propůjčuje funkční skupina $-N=N-$, s obsahem dvou sp^2 hybridizovaných atomů. Nejčastěji se vyskytují barviva, která ve své molekule nesou jednu azo skupinu, nicméně existují i diazo a triazo sloučeniny. Azobarviva mohou mít několik tautomerních forem. Azobarviva můžeme rozdělit do skupiny azo pigmentů, která je ve vodě nerozpustná, a na skupinu azo barviv, která se ve vodě rozpouští. Azo pigmenty se dělí do několika skupin v závislosti na struktuře [33].

Azo barviva v organismu podléhají primárně přeměně působením NADH-dependentních reduktas. V játrech vznikají aromatické aminy, které jsou pro organismus karcinogenní a dělí se do pěti skupin. Na anilíny, rozvinuté anilíny (jako je benzidin). Dále na sloučené aromatické aminy, heterocyklické aminy či aminoazo a jiné azo sloučeniny [34,35].

Při metabolické aktivaci aminoazo barviv dochází právě ke změnám na jejich amino skupině. N-hydroxylace nebo sulfatace a následný rozpad konjugátu vede k tvorbě nitreniových či karbeniových iontů. Tyto ionty následně kovalentně modifikují DNA, což vede k rozvoji procesu karcinogeneze [34,35].

Samotný Sudan I (Obrázek 8) je směsí dvou tautomerních forem, (Z) azo fenolická forma a (Q) chinon(hydrazonová).

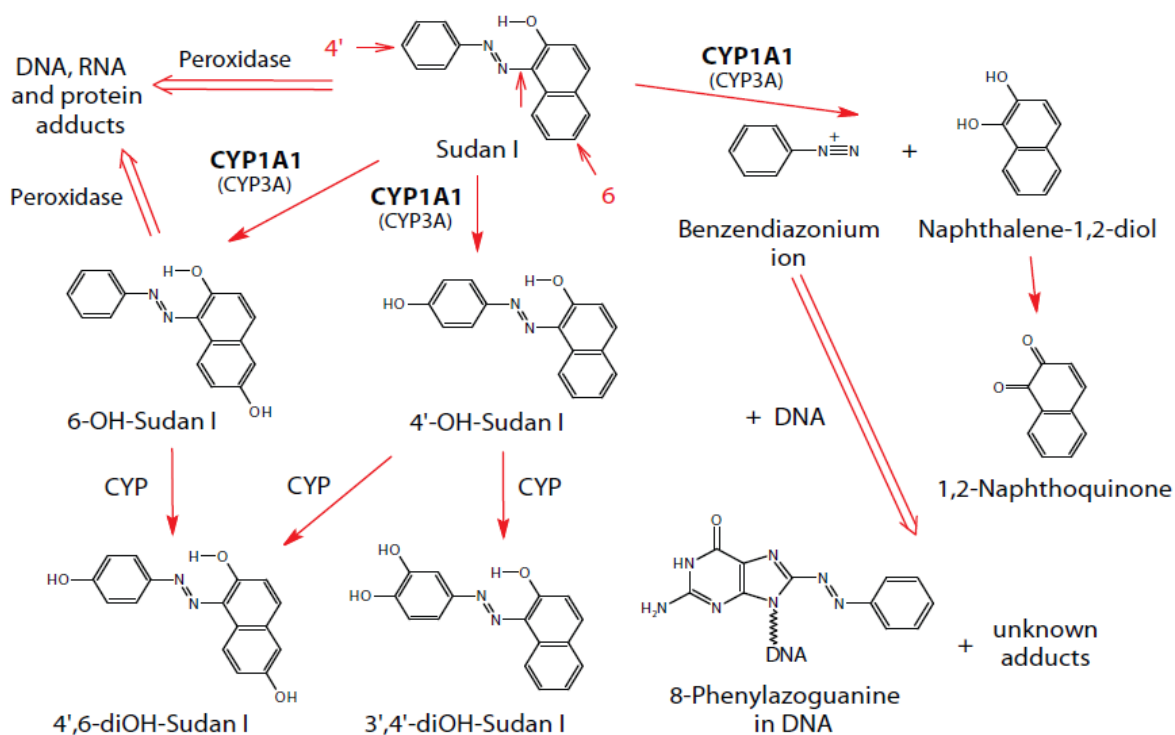


Obrázek 8: Tautomerní formy Sudanu I [36]

Sudan I byl v minulosti používán jako potravinářské barvivo, dokud nebyl označen za nebezpečný, protože je původce nádorů v játrech a močovém měchýři sledovaných organismů (krys, myši a králíků). V roce 2005 byl označen za genotoxický a karcinogenní pro lidský organismus. Také je spojován s kontaktní dermatitidou a byl přidán na seznam lidských kožních alergenů. I přes tato fakta byl Sudan I používán jako barvivo v chilli koření či olejích a dalších potravinách a nadále zůstává významným barvivem pro nejrůznější materiály, jako jsou benzíny, boty či podlahy. [37]

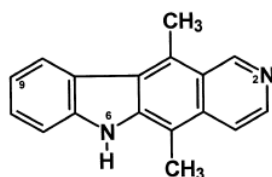
Metabolická přeměna Sudanu I probíhá v játrech, v kterých dochází k oxidačním či redukčním dějům (Obrázek 9). Studie prokázaly, že oxidační reakce vede k tvorbě hydroxylovaných produktů v místě 4' benzenového kruhu. Zde dochází ke vzniku 4'-OH-Sudanu I (1-[(4-hydroxyfenyl)azo]-2-naftolu) a ke vzniku 6-OH-Sudanu I (1-(fenylazo)naftalen-2,6-diolu). Vyloučení těchto metabolitů je snadné, ať už samostatně nebo ve spojení s kyselinou glukuronovou či sulfátem. Sudan I může být dále metabolizován i redukčními cestami. U nich dochází k tvorbě 1-amino- 2- naftolu a para-amino-fenolu. I zde se jedná o detoxifikační cestu organismu.[38] Nicméně dochází i k tvorbě minoritních produktů identifikovaných jako 3',4'-di(OH)-Sudan I (1-[(3,4-dihydroxyfenyl)azo]-2-naftol) a 4',6-di(OH)-Sudan I. (1-[(4-hydroxyfenyl)azo]naftalen-2,6-diol). Také byl rozpoznán produkt oxidačního štěpení azoskupiny. Ten byl detekován pomocí techniky ³²P-postlabeling a jedná se benzendiazoniový ion, stanovený v reakci se zbytky guaninu v DNA jako 8-(fenylazo)guanin. Tento adukt byl detekován po aktivaci pomocí cytochromy P450 a také byl nalezen v jaterní DNA potkanů, kteří byli Sudanu I vystaveni. V DNA močového měchýře však dochází k aktivaci Sudanu I působením enzymů – peroxidas za tvorby odlišných produktů [39,40].

Na biotransformaci Sudanu I se v menším rozsahu podílejí i redukční reakce. Jedním z enzymů, které se podílí na tomto metabolickém ději, je NAD(P)H:chinonoxidoreduktasa.



Obrázek 9: Metabolismus Sudanu I [37]. Na schématu je znázorněna přeměna molekuly Sudanu I pomocí enzymů. Po aktivaci pomocí peroxidasy se tvoří značné množství nespecifických produktů s DNA a RNA. Aktivace pomocí CYP 1A1 vede k snadno odbouratelným produktům. Aktivace přes benzediazoniový ion vede k aduktu s DNA.

1.7.2 Ellipticin

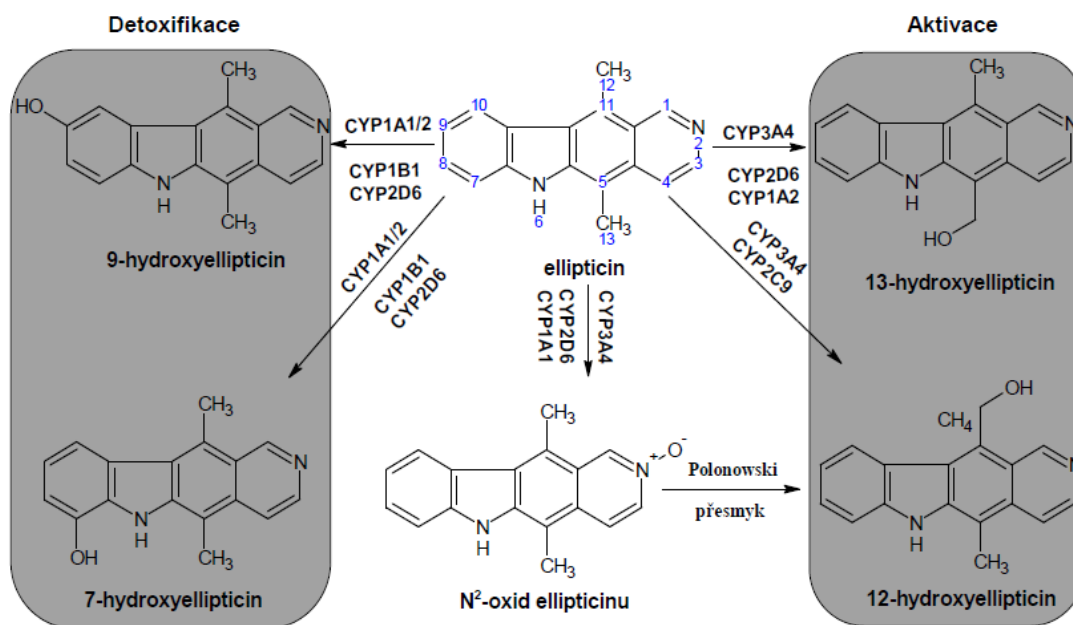


Obrázek 10: Vzorec ellipticinu

Ellipticin (5,11-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]karpazol) (Obrázek 10) a jeho deriváty 9-hydroxyellipticin, 2-methyl-9-hydroxy-ellipticin jsou rostlinné alkaloidy. Pocházejí z rostlin *Apocynaceae*. Ellipticin a jeho polární deriváty se využívají jako protinádorová léčiva. K léčbě karcinomu prsu se využívají především acetáty, ty jsou účinné i na kostní metastáze. Ellipticin je dále účinný proti akutní myeloblastické leukémii či karcinomu štítné žlázy. Dále vykazuje aktivitu proti HIV. Výhody ellipticinu v klinickém využití jsou vysoká účinnost

proti nádorovým onemocněním, nízká hematologická toxicita a minimální nefrotoxické účinky [41–43].

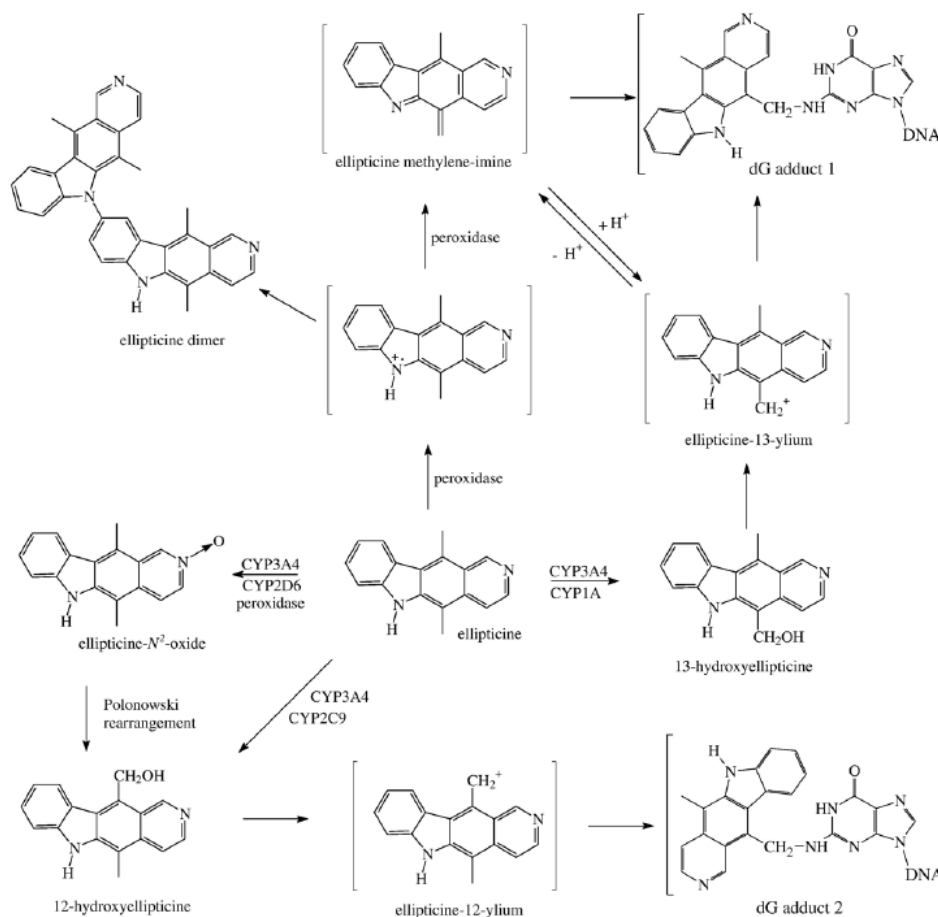
Ellipticin je v organismu přeměňován na pět metabolitů (Obrázek 11). A to především 9-hydroxyellipticin, dále pak N²-oxid ellipticinu, 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin, v menší míře pak na 7-hydroxyellipticin. Tyto metabolity jsou tvořeny v jaterních mikrosomech člověka a dalších živočichů (králíka, potkana a myši). [43]



Obrázek 11: Metabolismus ellipticinu pomocí lidských cytochromů P450 [44].

Ellipticin je přeměňován enzymy z rodiny cytochromů P450. Jeho aktivaci způsobují tyto enzymy CYP3A4, 1A 2D6 a 2C9. Zatímco detoxifikační cestu zajišťují enzymy CYP1A1, 1B1 a 2D6. Ellipticin je dále přeměňován peroxidasami[45].

Zatímco CYP jsou exprimovány hlavně v nádorových buňkách prsních a ledvinových, v jiných buňkách jsou jejich množství řádově nižší. Ellipticin je oxidován řadou peroxidas: Myeloperoxidase (MPO), křenovou peroxidase (HRP), lidskou cyklooxygenase (COX-2), ovčí COX-1, nebo hovězí laktoperoxidase [46,47]. Aduktů těchto metabolitů s DNA se shodují s adukty tvořenými po metabolické aktivaci pomocí CYP (Obrázek 12) [47,48].

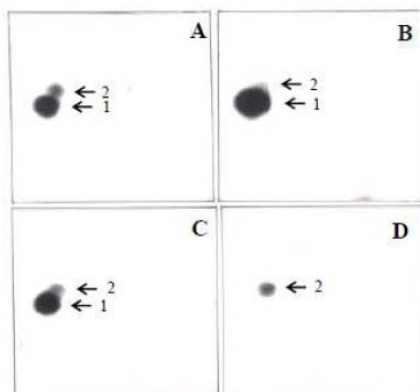


Obrázek 12: Metabolická aktivace ellipticinu za vzniku aduktu s DNA pomocí lidských CYP a peroxidas [48]. (Sloučeniny v závorkách nejsou experimentálně prokázány)

Aktivační metabolity ellipticinu jsou prekurzory sloučenin, které tvoří kovalentní vazbu s DNA a vytvářejí tak adukty. Tyto adukty byly stanoveny pomocí dvou nezávislých metod a to ^{32}P -postlabelingem a pomocí ^3H ellipticinu [49]. Tak byly detekovány dva adukty. Majoritní, který vznikl jen v přítomnosti aktivačních enzymů, a minoritní adukt, který vznikl samovolně, pravděpodobně autooxidací (Obrázek 13) [49].

Tvorba aduktů byla sledována v tkáních potkana, v plicních fibroblastech křečka (V-97), které byly transfekovány lidskými cytochromy (CYP3A4, 1A1, 1A2). V lidských buňkách byl sledován v neuroblastomech, v prsním adenokarcinomu (MC7-7) a také v leukemických buňkách (HL-60 a CCRF-CEM). Metabolity, které tvoří adukty s DNA, jsou 12-hydroxyellipticin, 13-hydroxyellipticin. Zdrojem aduktů také může být N^2 -oxid ellipticinu. Ten podléhá Polonowskiho přesmyku za vzniku 12-hydroxyellipticinu, z něj vzniká reaktivní agens ellipticin-12-ylidium, který vede ke vzniku minoritního aduktu. Majoritní produkt pak

vzniká z 13-hydroxyellipticinu přes ellipticin-13-ylidium. Minoritní i majoritní adukty se vážou na deoxyguanosenin [45,50].



Obrázek 13: Aduky ellipticinu s DNA detekovány pomocí metody ^{32}P - postlabeling. Aduky vznikly po aktivaci cytochromy P450: A - potkan, B - králík, C - člověk a D - bez enzymové aktivace. 1- majoritní adukt vzniklý aktivací pomocí enzymů. 2 - minoritní produkt vznikající samovolně.[51]

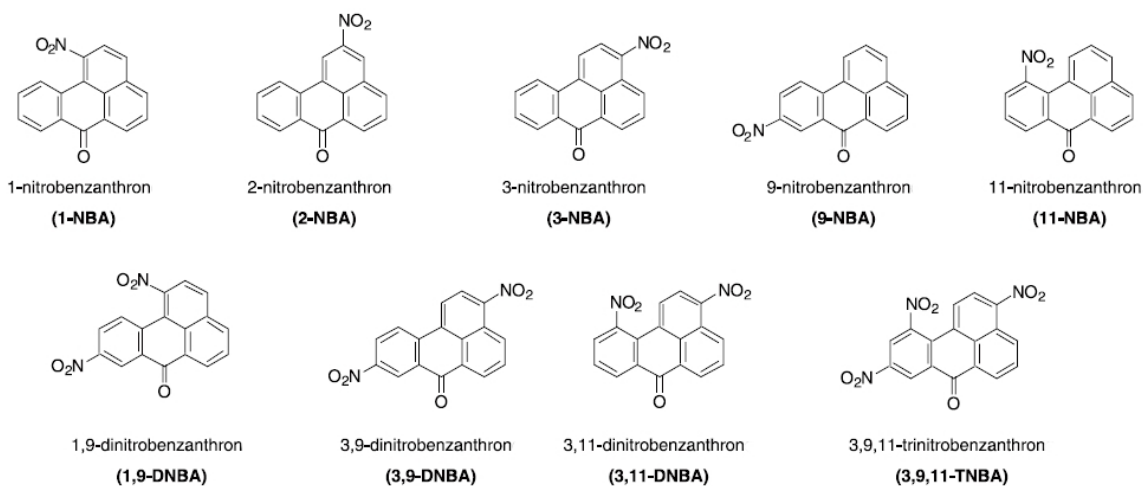
1.7.3 Nitrobenzanthrony

Nitrobenzanthrony (NBA) jsou představitelem látek souhrnně označovaných nitroaromatické polycyklické uhlovodíky (N-PAH). Tyto látky jsou jako skupina významnými polutanty životního prostředí. Mají významné karcinogenní a toxikologické účinky a jsou silně podezřelé jako lidské karcinogeny, i když stále nejsou jako lidské karcinogeny jednoznačně prokázány [13]. Takřka celá skupina projevuje silné mutagenní vlastnosti v bakteriálních a dokonce savčích buňkách. N-PAH prostupují všechny složky životního prostředí, proto je najdeme adsorbované na prachových částicích, vznikajících jako důsledek intenzivního automobilismu a průmyslu, v povrchových vodách a půdách v okolí sídel a průmyslových aglomerací. O kontaminaci prostředí těmito látkami může svědčit i fakt, že se nacházejí v říčních sedimentech. Dalším zdrojem může být například cigaretový kouř, popřípadě grilovaná jídla [13,52].

První práce, která prokázala přítomnost NBA v životním prostředí, byla uveřejněna roku 1997, její náplní bylo stanovení NBA ve spalinách dieselových motorů a v prachových částicích získaných z ovzduší [53]. Od té doby byly NBA sledovány i v jiných prostředích v různých koncentracích.

Nitrobenzanthrony se utvářejí reakcí mateřské sloučeniny benzanthronu s oxidy dusíku. 3-NBA, silně karcinogenní derivát benzanthronu, se vytváří za atmosférických podmínek. Jeho syntetická příprava však probíhá v atmosféře oxidu dusičitého a ozónu [54,55].

Do současnosti bylo připraveno a zkoumáno pět různých mono derivátů NBA a (jmenovitě 1- nitrobenzanthron (1-NBA), 2- nitrobenzanthron (2-NBA), 3- nitrobenzanthron (3-NBA), 9-nitrobenzanthron (9-NBA), 11-nitrobenzanthron (11-NBA)). Také byly připraveny tři dinitroderiváty benzanthronu, a to 1,9 - dinitrobenzanthron, 3,9-dinitrobenzanthron a jeden trinitroderivát benzanthronu 3,9,11-trinitrobenzanthron (3,9,11-NBA) (**Obrázek 14**). U všech těchto derivátů byly zkoumány mutagenní vlastnosti.



Obrázek 14: Strukturální vzorce známých nitro derivátů benzanthronu. [54] První řádek zleva 1-NBA: 1-nitrobenzanthron, 2-NBA: 2-nitrobenzanthron, 3-NBA: 3-nitrobenzanthron, 9-NBA: 9-nitrobenzanthron, 11-NBA: 11-nitrobenzanthron, Druhý řádek zleva 1,9-DNBA: 1,9-dinitrobenzanthron, 3,9-DNBA: 3,9-dinitrobenzanthron, 3,11-DNBA: 3,11-dinitrobenzanthron, 3,9,11-TNBA: 3,9,11-trinitrobenzanthron.

Mutagenní vlastnosti autoři testovali na různých kmenech bakterie *Salmonella typhimurium*, a to v přítomnosti S9 jaterní mikrosomální frakce, ale i bez ní. Mutagenní vlastnosti těchto látek se pohybují v rozmezí od 6 do 208 400 rev/nmol pro kmen bakterie TA98 bez S9 frakce. S touto frakcí pro stejný kmen se mutagenita pohybuje kolem pouhých 21-1114 rev/nmol [54]. K dalším zajímavým výsledkům studie patří, že mutagenní aktivita NBA je minimálně ovlivněna fyzikálně - chemickými vlastnostmi látky. Zkoumané vlastnosti byly následující: energie nejnižšího neobsazeného orbitalu (LUMO), redukční potenciál jednotlivých sloučenin, orientace nitroskupiny a hydrofobní chování. Toto chování bylo určeno pomocí rozdělovacího koeficientu oktanol - voda [54].

Rozdělovací koeficient (P) je jednou z fyzikálních vlastností sledovaných látek často spojovaných s chováním sledované látky v organismu. Je definován jako poměr rovnovážných koncentrací látky ve dvou nemísitelných fázích vody a oktanolu. Určuje míru hydrofobního chování chemické látky. Jeho hodnota roste pro sloučeniny s nepolárními strukturami, jako je více aromatických jader nebo délka řetězce. A nabývá malých hodnot pro

sloučeniny s polární skupinou. Běžně se jeho hodnoty pohybují v rozdílu 12 řádů, proto se uvádí jako logaritmus (log P). V různých studiích se používá jako ukazatel schopnosti prostupovat membránami a interagovat s biologickými receptory. [56]

Ve studii byl log P stanovován pomocí chromatografie na reverzní fázi. Byla použita kolona o rozměrech 4,6x250 mm a mobilní fáze v poměru methanol:voda (70:30) o průtoku 1 ml/min. Hodnoty log P pro nitrobenzanthrony byly získány z retenčních objemů s použitím kalibrační přímky sestavené z publikovaných log P organických látek v rozmezí 0,95 - 6, 0. [53]

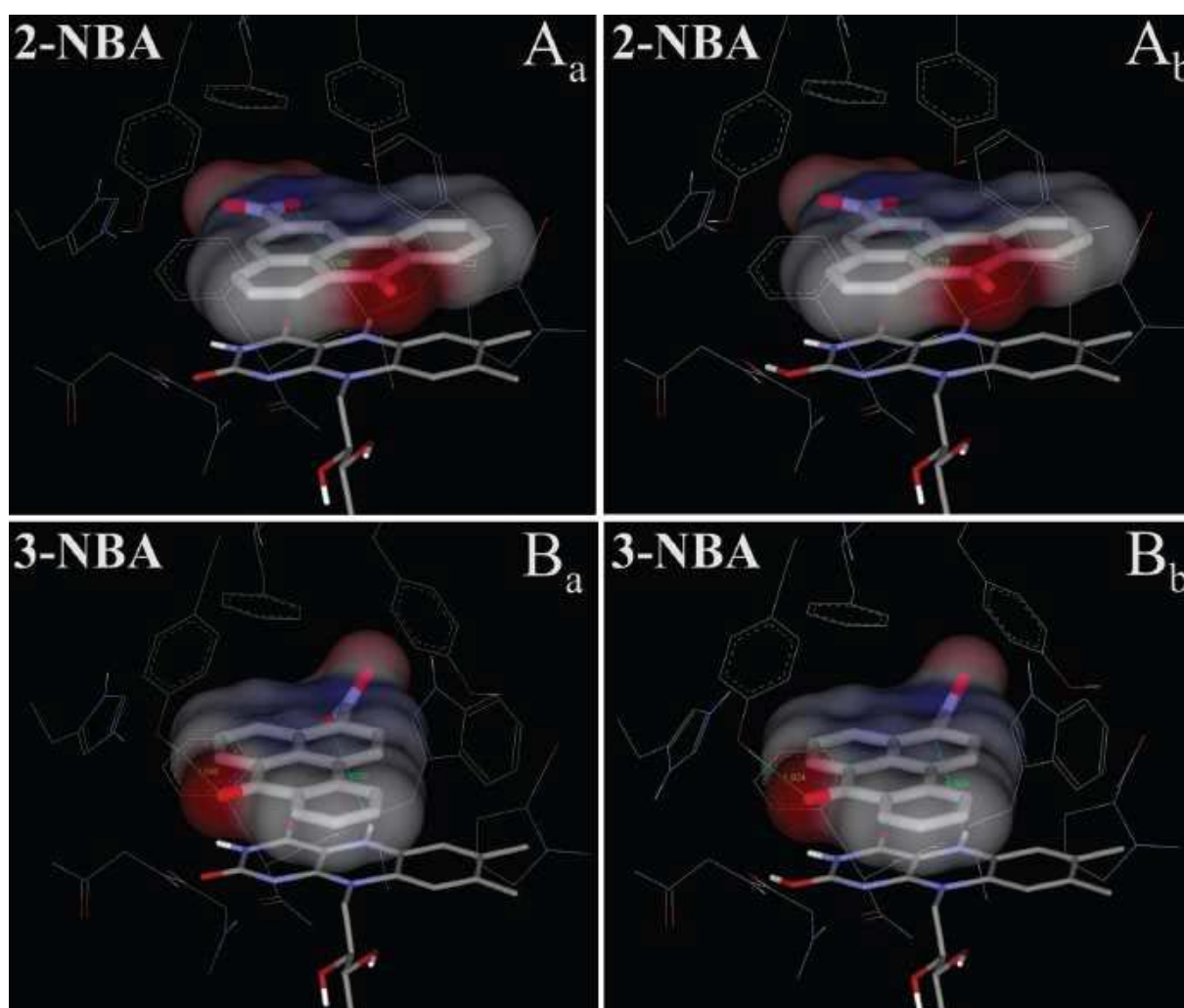
Pro sledované nitrobenzanthrony se hodnoty dekadických logaritmů rozdělovacích koeficientů pohybují v rozmezí od 3,60 do 3,99. Tento rozdíl pouhých 0,39 vedl autory k závěru, že prostupnost nitrobenzanthronů do buněk není rozhodujícím faktorem pro jejich mutagenní aktivitu. [54]

Tabulka 1: Přehled fyzikálně – chemických vlastností různých derivátů benzanthronu [54]. Dekadický logaritmus mutagenních vlastností u kmenu TA98, LUMO – energie nejnižšího neobsazeného molekulového orbitalu. E_{red} – redukční potenciál, logP – dekadický logaritmus rozdělovací rovnováhy oktanol – voda znázorňující hydrofobní chování látek a jejich prostupnost přes biologické membrány.

	Log TA98	LUMO (eV)	E _{red} (mV)	Log P	dihedrální úhel (stupně °)				
					1	2	3	9	11
1-NBA	3,75	-1.896	-1063	3,60	62,3				
2-NBA	2,20	-1,909	-1113	3,99		1,1			
3-NBA	5,32	-2,099	-987	3,90			0		
9-NBA	4,93	-1,929	-1087	3,79				2,5	
11-NBA	0,78	-1,722	-1084	3,67					64,2
1,9-DNBA	4,62	-2,435	-854	3,75	60,9			0,8	
3,9-DNBA	4,67	-2,605	-833	3,82			0,5	1	
3,11-DNBA	3,52	-2,417	-861	3,79			10,4		69,8
3,9,11-TNBA	4,47	-2,934	-703	3,61			13,8	1,9	63,7

U jiných studií se autoři zaměřili na ultimativní karcinogen – nitreniový ion, který vzniká při metabolické aktivaci nitrobenzanthronů. Zde bylo zjištěno, že mutagenní vlastnosti těchto sloučenin lze dát do souvislosti se stabilitou jejich nitreniového iontu [57]. U jednotlivých látek byl pozorován významný rozdíl u rovnovážných konstant příslušných hydrolytických

reakcí vedoucích ke vzniku ultimativního karcinogenu. Tato data ukazují, že metabolity 2-NBA se na příslušný iont rozpadají výrazně neochotněji, a to až o 3 – 4 řády hůře, než metabolity nejčastějšího karcinogenního nitrobenzanthronu 3-NBA [58]. Také byly pozorovány rozdíly v redukci 2- a 3-NBA pomocí bakteriálních reduktas a také savčí chinon:oxidoreduktasy [57]. Redukce 2-NBA pomocí chinon:oxidoreduktasy na rozdíl od redukce 3-NBA prakticky neprobíhá. Proto by se dal 2-NBA označit za špatný substrát reduktasy, a proto je jeho aktivace výrazně pomalejší. Pomocí výpočtů se však odhaduje, že vazba 2-NBA do aktivního místa enzymu probíhá s podobnou afinitou. I když v orientaci méně vhodné k redukci [58]. Mutagenita nitrobenzanthronů se pravděpodobně zvyšuje v savčích buňkách. Tyto organismy obsahují systém sulfotransferas a N-acetyltransferas, který participuje na aktivaci díky konjugačním reakcím. Tento systém je jiný než v bakteriálních buňkách [54,59].



Obrázek 15: Porovnání vazby 2- a 3- NBA do aktivního místa NQO1 [58].

2- NBA ve srovnání s 3-NBA

2-NBA (2-NBA, 2-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on) na rozdíl od svého izomeru 3-NBA (3-NBA, 3-nitro-7H-benz[de]anthracen-7-on) nepatří mezi nejsilnější mutageny.

3-NBA izomer je prokázaným karcinogenem pro hlodavce a potencionálním pro člověka [60]. Genotoxické účinky této látky byly prokázány tvorbou aduktů s DNA, která byla pozorována *in vitro* v buněčných kulturách a *in vivo* u laboratorních potkanů a myší. Pro 2-NBA byla pozorována jen minimální tvorba aduktů s DNA *in vitro*. [55,59,62]

Oba deriváty jsou hojně zastoupeny ve složkách životního prostředí a byly prokázány teprve nedávno. Byly detekovány ve spalínách dieselových motorů, proto by genotoxickou aktivitou mohli být zasaženi především lidé pracující v dopravě, zaměstnanci čerpacích stanic a pochopitelně různí mechanici autodílen a jiných opravárenských podniků. To potvrzuje nález metabolitů 3-NBA v moči horníků, vystavených zplodinám dieselových motorů. 2-NBA však majoritně vzniká přeměnou v atmosféře. [63–67]

Koncentrace 3-NBA v ovzduší je srovnatelná s běžnými polutanty jako jsou benzo(a)pyren, 1-nitropyren, 1,3-, 1,6-, a 1,8-dinitropyreny. 3-NBA se pohybuje v rozmezí od 0,6 do 6,6 p.p.m. Proto se denní příjem člověka může pohybovat až okolo 90 pg 3-NBA [68]. Některá data ukazují, že obsah 2-NBA ve vzorcích vzduchu může být až 70x větší než 3-NBA. Takto zjištěná koncentrace byla 495 pg/m³ pro 2-NBA, zatímco 3-NBA obsahoval pouhých 6,8 pg/m³. Proto je divné, že při tak rozdílné možnosti expozice organismu jsem nenašel žádná data, v kterých by byly detekovány metabolity 2-NBA ve vzorcích moči stejně, jako tomu bylo u 3-NBA [55].

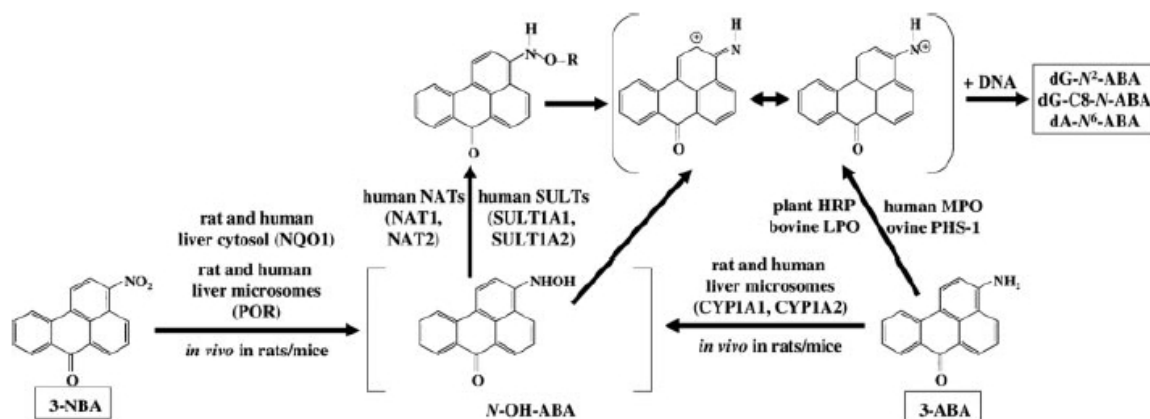
I když některé studie ukazují, že u 2-NBA dochází k tvorbě aduktu s DNA, není stále známa jeho přesná aktivační cesta, na rozdíl od jeho izomeru 3-NBA.

Stanovení aktivační cesty je důležitý krok pro posouzení individuální citlivosti organismů [55]. Na schématu (Obrázek 16) je znázorněna hlavní aktivační cesta 3-NBA v organismu. Hlavní redukční cesta z 3-NBA na N-hydroxy-3-aminobenzanthron (*N*-OH-ABA), která je první částí biotransformace, vede přes nitroredukcí. Ta je katalyzována pomocí cytosolárních reductas, kterými jsou hlavně NA(P)H:chinon-oxidoreduktasa (NQO1), minoritně pak xanthinoxidasa, nebo mikrosomální enzym NADPH:cytochrom-P450-reduktasa (POR). [68–71]

N-OH-ABA je nestabilní [68]. V druhé fázi biotransformace dochází k přeměně na nitreniový nebo karboniový iont. Tyto ionty reagují s DNA za vzniku kovalentních aduktů. Na druhé fázi se podílí *N,O*-acetyltransferasy (NAT) a sulfottransferasy (SULT), které jsou

obsaženy i v jaterních buňkách. U NAT se majoritně podílí NAT 2 a s menším podílem NAT 1. U SULT to jsou pak enzymy SULT1A1 a částečně SULT1A2.

Na schématu (Obrázek 16) je také znázorněna druhá cesta vedoucí ke vzniku *N*-OH-ABA, a to je zpětná oxidace hlavního metabolitu 3-aminobenzanthronu (3-ABA). Proto je oxidace 3-ABA považována za hlavní oxidační cestu. V játrech a v plicích je tento děj katalyzován pomocí enzymů z rodiny cytochromů P450. Jako hlavní enzymy této reakce vystupují CYP1A1 a CYP1A2. Dalším aktivačním enzymem mohou být peroxidasy, které pro tuto činnost mohou využít peroxid vodíku vzniklý při metabolické aktivaci 3-NBA. Tato cesta převládá v orgánech, ve kterých se CYP1A1 a CYP1A2 vyskytují jen minoritně, jako jsou ledviny, močový měchýř či prsní žlázy. Zástupci, kteří se na tomto mohou podílet, jsou prostaglandin-H-syntasa (PHS), laktoperoxidasa (LPO), myeloperoxidasa. Při těchto reakcích může dojít ke vzniku radikálů, které mohou poškodit DNA. [70,71]



Obrázek 16: Schéma metabolické aktivace 3-NBA v organismu [71]. 3-NBA je redukován NQO1 a POR na *N*-hydroxyaminobenzanthron. Z této látky dále vzniká nitreniový iont, který může přesmyknout na karbokationt.

Adukty 3-NBA a 2-NBA byly detekovány pomocí metody značení radioaktivním fosfátem „³²P-postlabelling“ a následnou HPLC nebo TLC. Adukty vznikají na purinových bázích a to na deoxyguanosinu (dG) a deoxyadenosinu (dA). Poměr aduktů je 70 % (dG) ku 30 % (dA). Vzniklé adukty byly identifikovány jako: 2-(2'-deoxyadenosin-N⁶-yl)-3-aminobenzanthron (dA-N⁶-ABA), N-(2'-deoxyguanosin -N²-yl)-3-aminobenzanthron (dG-N²-ABA) a N-(2'-deoxyguanosin -8-yl)-3-aminobenzanthron (dG-C8-N-ABA) [55].

Nejnověji byl také v moči detekován *N*-acetyl-S-(3-aminobenzanthron-2-yl)cystein (3-ABA-MA), a to pomocí hmotnostní spektrometrie (LC-ESI-MS) [72].

I když není známa přesná aktivační cesta 2-NBA, tak se na jejím určení pracuje. Nejnovější stanovení ukazují, že 2-NBA není vhodný substrát pro enzymy, které přeměňují 3-

NBA [58,73]. Ke vzniku aduktů 2-NBA s DNA v [59] došlo pravděpodobně pomocí jiných, zatím neurčených enzymů [73,74].

1.8 Spektrofotometrie

Použití spektrofotometrie v ultrafialové a viditelné části spektra (UV - VIS) je základní metodou v biochemické laboratoři. Většina biologicky aktivních látek kromě sacharidů má v této oblasti specifické absorpční pásy a jejich koncentraci lze stanovit na základě spektrálních vlastností. O oblasti UV spektra mluvíme při absorpci při vlnových délkách přibližně od 180 do 400 nm [75]. O viditelném spektru se hovoří při vlnových délkách od 400 do 750 nm [75,76].

Pro UV - VIS spektrofotometrii mají základní význam kvantované přechody elektronů ze základního do excitovaného stavu. Díky kvantování jednotlivých hladin mají význam jen ty fotony, které splňují podmínku, že jejich energie odpovídá energii přechodu elektronu mezi hladinami. Rámcově se zde uplatňují přechody mezi σ (vazebný) a σ^* (antivazebný). Tyto absorbují ve vzdálené UV oblasti a nejsou pro běžná stanovení použitelná. Daleko významnější přechody π (vazebný) a π^* (antivazebný) a n (nevazebný), které absorbují při vyšších vlnových délkách, jsou charakteristické pro molekuly s násobnými vazbami. Přechody $n \rightarrow \pi^*$ a $n \rightarrow \sigma^*$ jsou významné pro přechody látek s heteroatomy [76,77].

Čistě elektronová spektra by měla poskytnout čárové linie (spektra). Nicméně při běžném stanovení za laboratorní teploty získáváme spektra, ve kterých se zohledňuje i vibrace a rotace molekul, to vede k získání spojitého spektra. Na tvar spektra má kromě teploty vliv i použité prostředí, čím polárnější, tím více dochází k vyhlazování linií. Rozpouštědlo má také vliv na posun absorpčních maxim [76,77]. Části molekuly, které mají své specifické absorpční pásy, se označují jako chromofory. Typickým chromoforem je peptidová vazba s absorpčním pásmem v rozmezí 200 - 225 nm, absorpce bází nukleových kyselin při 260 nm [76,77].

Absorpční vlastností určitých chromoforů se využívá při enzymových reakcích, v kterých se může sledovat specifická absorbance NAD(P)H při 340 nm a její změna v průběhu reakce. Také se spektrofotometricky dá stanovit množství cytochromu P450 pomocí komplexu s CO po redukci hemu. Takto vzniklý komplex má při vlnové délce 450 nm specifický absorpční pás [76,77].

Základem kvantifikačních spektrofotometrických metod je Lambertův - Beerův zákon (Rovnice 2), který je spojením dvou samostatných zákonů. Lambertův zákon stanovuje závislost změny intenzity světla prošlého vzorkem na změně délky kyvety. Zatímco Beerův

zákon stanovuje závislost této intenzity na změně koncentrace. Jejich spojením získáme výsledný zákon, který se nejčastěji zapisuje:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

Rovnice 2

Kde „A“ je absorbance (záporný dekadicky logaritmus transmitance). „ ε “ značí extinkční (molární absorpční koeficient) „c“ je koncentrace sledovaného roztoku a „l“ je délka optického prostoru.

2 Cíl práce

Hlavním cílem práce bylo stanovit rozpustnost vybraných modelových karcinogenů (Sudanu I, ellipticinu a nitrobenzanthronů) ve vodném prostředí pomocí běžně dostupných spektroskopických technik. A také ověřit vliv hovězího sérového albuminu a popř. i dalšího proteinu na rozpustnost studovaných sloučenin. Dílčími cíli pak bylo určit extinkční koeficienty studovaných látek ve vodě i v methanolu. Ověřit k tomuto účelu již dříve zavedené spektroskopické metody pro stanovení rozpustnosti málo rozpustných látek a tuto techniku dále vylepšit za účelem zvýšení její citlivosti. Vylepšenou metodiku pak použít k určení rozpustnosti látky s velmi nízkou rozpustností ve vodě (2-NBA). Bude-li to možné, ověřit rozpustnost zájmových sloučenin také další metodikou a výsledky porovnat.

3 Materiál a metody

3.1 Laboratorní přístroje a chemikálie

Přístroje:

Spektrofotometr Hewlett - Packard 8453(HP 8453) s diodovým polem

Membránová čistírna vody s UV lampou-Millipore Simplicity 182

Ultrazvuková lázeň Elma E30H Elmasonic

Vodní lázeň

Centrifuga Beckmann ALEGRA x22R

Centrifuga Eppendorf 5418

Analytické váhy OHAUS discovery DU216CD

Třepačka Yellow-line

Chemikálie:

Deionizovaná voda

Fosfátový pufr o pH7

Dihydrogenfosforečnan draselný p.a. **LACHNER** Česká republika

Hydrogenfosforečnan didraselný p.a. **LACHNER** Česká republika

Ellipticin 5 a 10 mg **FLUKA** Švédsko

Sudan Yellow pro HPLC **BRITISH DRUG HOUSE** Velká Británie

2-nitrobenzanthron dar Doc. H.H. Schmeisera, Německé centrum pro výzkum rakoviny v Heidelbergu

Methanol pro chromatografické využití 99,9% **LACHNER** Česká republika

Dimetylsulfoxid 99,5% GC **ALDRICH - SIGMA** Německo

Hovězí sérový albumin

Lysozym

Software:

UV- VIS Chemstation Agilent

MS Excel 2003, Microsoft Corporation

Další vybavení

Mikroinjekční stříkačky 1 a 5 μ l

Skleněné dělené pipety 25, 2 a 1 ml

Kyvety s optickou drahou 9 cm (sklo), 3 cm (sklo) a 1 cm (křemen)

Teploměr

3.2 Metoda a postup práce

3.2.1 Příprava zásobních roztoků

Navážka Sudanu byla převedena do skleněné lahve se zábrusem a rozpuštěna v methanolu na výslednou koncentraci Sudanu I, která byla 1 mmol/l. Roztok byl při rozpouštění hodinu protřepáván a před použitím byl ponechán ve tmě dva dny. Kontrola celkového rozpuštění proběhla centrifugací na centrifuze Eppendorf malého vzorku zásobního roztoku a vizuální kontrolou sedimentu na dně mikrozkuřavky. Výsledný roztok byl jasně červeno oranžové barvy a po dobu práce byl stabilní.

Navážka ellipticinu byla rozpuštěna v methanolu a uchována ve skleněné zábrusové láhvi. Výsledná koncentrace byla 1 mmol/l. Roztok byl míchán na třepačce yellow line po dobu tří hodin. Úplné rozpuštění bylo kontrolováno, jako v předchozím případě, centrifugací a hledáním sraženiny v mikrozkuřavce. Výsledný roztok byl žlutě zářící.

Navážka 2-NBA byla rozpuštěna v dimethyl sulfoxidu (DMSO) tak, aby vznikl roztok o koncentraci 0,273 mmol/l. Byl zahříván a sonikován v sonikační lázni Elmasonic, dokud nedošlo k úplnému rozpuštění. To bylo kontrolováno centrifugací na centrifuze Eppendorf. Roztok byl nevýrazně žlutý.

3.2.2 Práce se spektrofotometrem a použité nastavení

Práce byla vypracována na jednopaprskovém spektrofotometru HP 8453 s diodovým polem. Spektrofotometr měří v rozsahu od 190 do 1100 nm s krokem jeden nanometr. Pro měření v této škále je vybaven dvěma lampami. V rozmezí vlnových délek 190 - 800 nm používá nízkotlakou deuteriovou lampu. Druhá wolframová lampa měří v rozmezí 340- 1100 nm[78]. Pro práci se spektrofotometrem jsem použil software od společnosti Agilent UV - Vis chemstation v němž jsem si připravil následující nastavení:

Sudan I:

Pro měření absorpance Sudanu I ve vodných roztocích jsem použil nastavení, které snímalo fixní vlnové délky ze spektra. A to 484 nm jako vlnovou délku maximální absorpce. Další dvě vlnové délky 350 nm a 600 nm jako referenční vlnové délky pro růst zákalu. Integrační doba během záznamu jednoho spektra byla 5 s a délka skleněné kyvety 3 cm (Obrázek 17, vpravo).

Pro měření methanolových roztoků byla použita integrační doba 5 s, ale délka kyvety jen 1 cm. Za vlnovou délku odpovídající maximální absorpci byla určena vlnová délka 285 nm a k ní lokální minima v 214 a 340 nm.

Ellipticin:

Ellipticin jsem měřil při stejné integrační době. Délka kyvety byla ve všech měřeních 1 cm. Pro měření ve vodných roztocích jsem vybral referenční vlnové délky o 260 a 330 nm. Největší hodnota absorpce byla u vlnové délky 300 nm. V methanolovém roztoku jsem jako vlnovou délku největší hodnoty absorpce zvolil 285 a jako referenční vlnové délky 250 a 320 nm.

2-NBA:

Ke sledování vodných roztoků 2-NBA jsem použil stejný integrační čas, nicméně použitá kyveta měla objem 500 ml a optickou dráhu 9 cm (Obrázek 17, vlevo). Vlnová délka maximální absorpce pro vodný roztok byla zvolena 404 nm. Jako reference 345 a 600 nm.

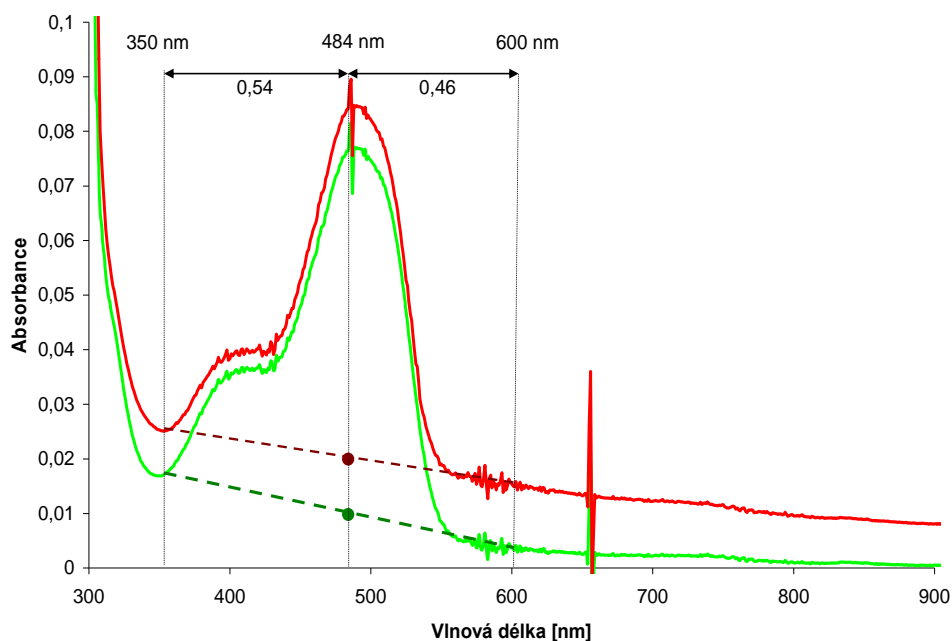


Obrázek 17: Kyvety pro měření vyšších objemů. Kyveta s optickou drahou 9 cm (vlevo). Kyveta s optickou drahou 3 cm (vpravo). Včetně stojánku k upevnění do přístroje.

3.2.3 Korekce vlnových délek

K redukci šumů se běžně používá vícebodová korekce na pozadí, k jejímu výpočtu se využívají dvě referenční vlnové délky, které ohraničují vlnovou délku maximální absorpce [78]. Protože práce probíhala na jednopaprskovém přístroji, který obecně trpí kolísáním intenzity zdroje světla v průběhu měření. Bylo potřeba zavést účinnou korekci, která tento jev bude eliminovat, a pokud možno i přispěje k přesnějšímu stanovení rozpustnosti, tím že bude zohledňovat vliv růstu pozadí po vysrážení vzorku. K tomuto účelu byla využita korekce, která od hodnoty absorpce u vlnové délky absorpčním maximu odečetla vážený průměr absorpencí vhodně zvolených vlnových délek před a za tímto maximem. Tyto hodnoty byly obecně voleny tak, aby v nich byla co nejmenší absorpce. Funkci korekce je možné dobře popsat podle spekter na obrázku (Obrázek 18). Tento graf znázorňuje dvě spektra přídavek, mezi kterými mělo dojít k vysrážení z roztoku. Zelené spektrum patří ještě pravému roztoku, zatímco červené spektrum již obsahuje sraženinu. Pokud bychom sledovali nárůst absorpance

pouze u vlnové délky 484 nm, tak bychom mohli dojít k názoru, že absorbance stále roste. Pokud hodnotám absorbancí 350 nm a 600 nm přiřadíme váhu podle vzdálenosti mezi jednotlivými vlnovými délkami tak, že rozdíl vzdálenosti mezi 350 nm a 600 nm bereme jako 250 jednotek a rozdíl 484 nm od 350 nm je 134 jednotek tak, celkový poměr délky této části je 0,54 poměr vzdáleností do jedné mezi 484 a 600 nm je 0,46. Váhu pak hodnotám přiřadíme podle vzdálenosti obráceně (čím blíže větší váha). Tímto postupem získáme hodnotu absorbance pro vlnovou délku 484 nm, ležící na lineární spojnici zvolených referenčních délek (hnědý nebo zelený bod v grafu). Odečtením této hodnoty od pravé absorbance pro 484 nm získáme očištěnou hodnotu absorbance od kolísání intenzity vůči nulovému vzorku.

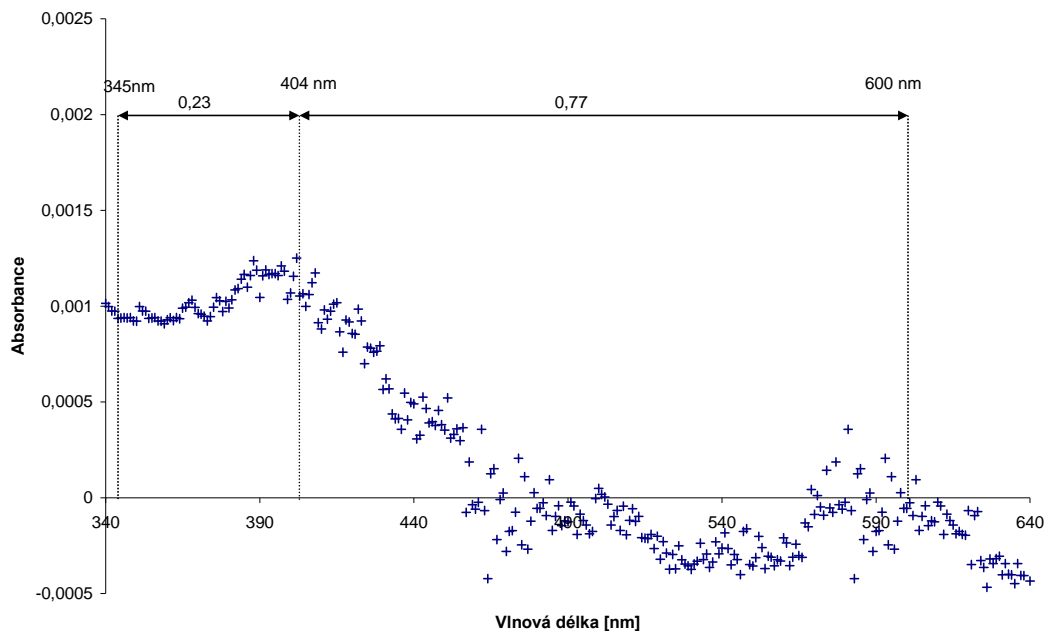


Obrázek 18: Znárodnění korekce na spektru Sudanu I. Zelená linka znázorňuje spektrum Sudanu I ve vodě o koncentraci 1,39 $\mu\text{mol/l}$. Červená linka znázorňuje spektrum roztoku Sudanu I po vysrážení o teoretické koncentraci 1,59 $\mu\text{mol/l}$. Hodnoty 0,54 a 0,46 znázorňují poměr vzdáleností mezi referenční vlnovou délkou a absorpčním maximem oproti celkové délce mezi jednotlivými referenčními body. Hnědý a zelený bod jsou body získané výpočtem ($0,46 \cdot A_{350} + 0,54 \cdot A_{600}$) a leží na linearizovaném úseku spektra, pokud by zde nebyla žádná absorpce.

Grafické znázornění pro vodný roztok Sudanu I a benzanthronu je zobrazeno ve spektrech těchto látek (Obrázek 18, Obrázek 19). Pro ellipticin je korekce znázorněna na spektru ellipticinu v methanolu (Obrázek 20). Účinnost takto získané korekce je znázorněna na grafu (Obrázek 21). U korigované hodnoty lze pozorovat změny v roztoku způsobené

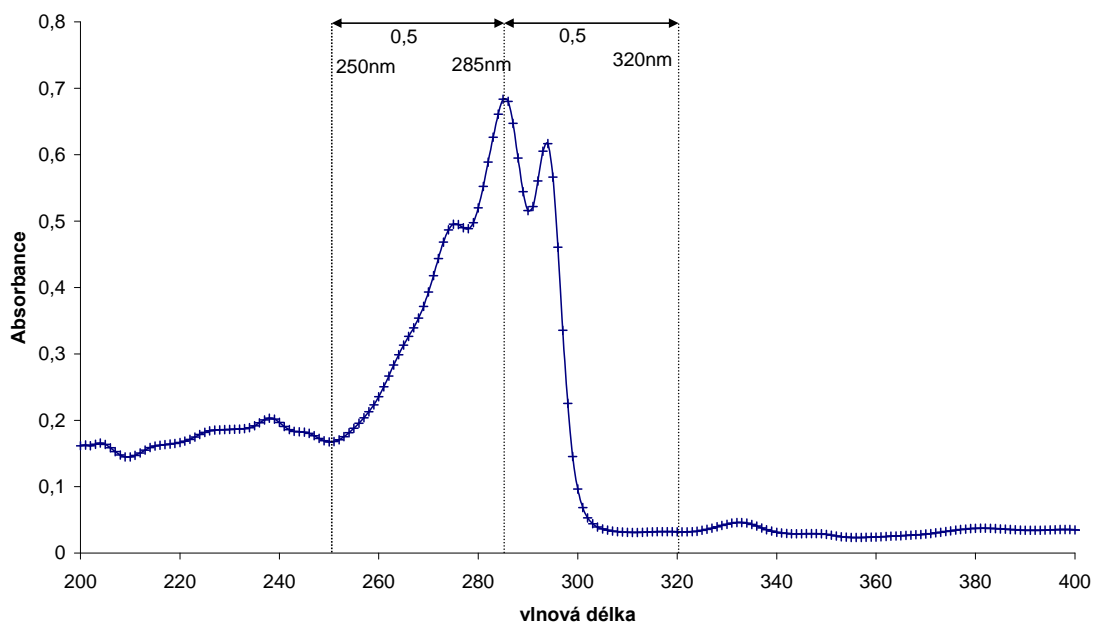
zákalem dřive, kromě odchylky od linearity také dochází k nárůstu chyby způsobené změnou hodnoty absorbance v čase.

Spektrum 2-nitrobenzanthronu ve vodě



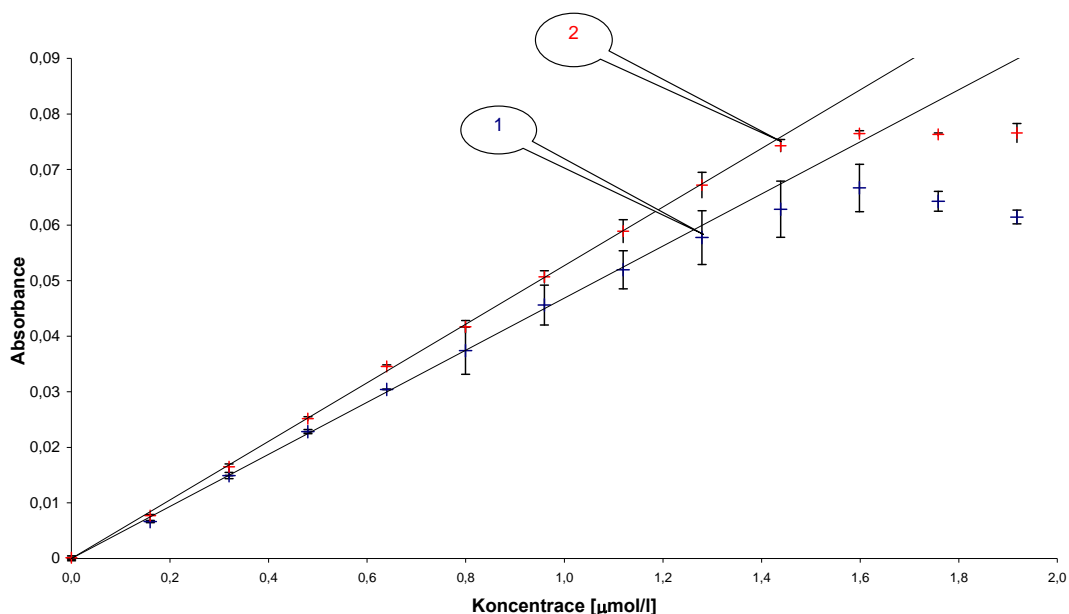
Obrázek 19: Spektrum 2-NBA ve vodě odpovídající koncentraci 2,1 nmol/l při teplotě 24°C. Grafické znázornění korekčního výpočtu $A_{404} - (0,77 * A_{345} + 0,23 * A_{600})$.

Grafické znázornění korekce ellipticinu



Obrázek 20: Spektrum ellipticinu v methanolu při koncentraci 4,99 $\mu\text{mol/l}$ a teplotě 23 °C. Grafické znázornění výpočtu korekce vlnových délek $A_{300} - (0,43 * A_{260} + 0,57 * A_{330})$

Znázornění účinnosti korekce v případě rozpustnosti Sudanu I



Obrázek 21: Graf zobrazuje odklon od Lambertova - Beerova zákona při stanovení rozpustnosti Sudanu I. Červené body zobrazují nárůst nekorigované absorbance zaznamenané při vlnové délce 484 nm. Modré body zaznamenávají nárůst absorbance korigované vlnové délky získané výpočtem $A_{484} - (0.46 \cdot A_{350} + 0.54 \cdot A_{600})$. U korekce je vidět již výrazný nárůst chyby při koncentraci 0,8 µmol/l a k odklonu od lineární průběhu dochází již v hodnotě 1,33 µmol/l. (bod 1) U nekorigované vlnové délky dochází až v hodnotě koncentrace 1,44 µmol/l (bod 2).

Protože každá látka má své specifické absorpční pásy pro dané rozpouštědlo, byly stanoveny tyto korigované hodnoty (Tabulka 2).

Tabulka 2: Přehled korigovaných vlnových délek pro jednotlivé látky a rozpouštědla

Rozpouštěná látka	Rozpouštědlo	Rovnice
Sudan I	voda	$A_{484} - (0.46 \cdot A_{350} + 0.54 \cdot A_{600})$
	methanol	$A_{481} - (0.48 \cdot A_{350} + 0.52 \cdot A_{600})$
Ellipticin	voda	$A_{300} - (0.43 \cdot A_{260} + 0.57 \cdot A_{330})$
	methanol	$A_{285} - (0.5 \cdot A_{250} + 0.5 \cdot A_{320})$
2-NBA	voda	$A_{404} - (0.77 \cdot A_{345} + 0.23 \cdot A_{600})$

3.2.4 Všeobecná ustanovení k metodám

Součástí všech metod bylo použití skleněného nádobí při práci s karcinogeny. Tím se omezovala sorpce těchto lipofilních látek na plastické špičky, či stěny mikrozkušavek.

V případech, kde bylo použití plastového nádobí nezbytné, jako byla centrifugace, je vše uvedeno.

Ke statistickému zpracování výsledku byl použit program Microsoft Office Excel 2003. Ze statistických funkcí, které tento program nabízí, byly použity funkce:

PRŮMĚR (číslo1, číslo2,...) která stanoví průměr z 1 až 30 hodnot [79].

SMODCH která určí směrodatnou odchylku (SD), je definována vztahem (Rovnice 3), kde „x“ je střední hodnota výběru PRŮMĚR (číslo1, číslo2,...) a „n“ je velikost hodnoty [79].

$$= \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}}$$

Rovnice 3

3.2.5 Stanovení extinkčních koeficientů u vodných roztoků Sudanu I a ellipticinu

Ke stanovení extinkčního koeficientu byl použit následující postup. Do různých objemů vody (3 ml, 20 ml a 25 ml) byl mikrostříkačkou přidáván zásobní roztok Sudanu I v methanolu o koncentraci 1 mmol/l, velikost přídavku byla v různých objemech (0,3 až 5 µl). Difuze do celého objemu byla zajištěna promícháním pomocí skleněné tyčinky a před vlastním záznamem spektra roztok stál dvě minut při laboratorní teplotě, následně se 3x zaznamenalo spektrum s časovým rozdílem jedné minuty. Měření bylo prováděno buď v křemenné kyvetě s optickou drahou 1 cm, nebo ve skleněné kyvetě s optickou drahou 3 cm. Extinkční koeficienty pak byly určeny ze směrnice lineární části grafu závislosti absorbance na koncentraci látky v roztoku.

U ellipticinu se postupovalo analogicky. Také byl přidáván roztok o koncentraci 1 mmol/l v methanolu do přebytku pufru o pH = 7. Tam se zamíchal skleněnou tyčinkou a po době dvou minut se 3x zaznamenalo spektrum s časovým rozdílem jedné minuty. Objem vody byl u ellipticinu konstantní (3 ml) a měnil se jen krok přídavků. Měření se prováděla v kyvetách s optickou drahou 1 cm. Velikost jednotlivých přídavků zásobního roztoku byla 0,3 - 5 µl. Nastavení spektrofotometru pro tuto metodu je popsáno výše.

3.2.6 Stanovení extinkčních koeficientů u vodných roztoků 2-NBA

Tato metoda v principu vycházela ze stejného základu jako dvě předcházející. Nicméně zde byly přidávány mikrolitry (0,5 - 50 μl) roztoků 2-NBA v DMSO o koncentraci 0,273 mmol/l. Přidávky byly důkladně rozmíchány v objemech vody 400 - 500 ml. Jako kyveta zde posloužila čtverhranná skleněná láhev o objemu 1000 ml, kterou jsem do přístroje upevnil pomocí moduritového stojánu (Obrázek 17). Protože docházelo k ohřívání kyvety, byla pod moduritový stojánek ještě umístěna izolační folie o šířce půl centimetru. Tato folie omezila ohřívání na minimum. Tato skleněná kyveta propouštěla vlnové délky v rozmezí 320-900 nm. Spektra se zaznamenávala po době dvou minut od vstříknutí vzorku 3x s časovým rozdílem jedné minuty

3.2.7 Stanovení extinkčních koeficientů u methanolových roztoků Sudanu I

Stanovení extinkčních koeficientů u Sudanu I probíhalo přidáváním methanolového roztoku do kyvety s obsahem rozpouštědla (3 ml). Po každém přidavku 5 μl bylo vše řádně zamícháno, pak se čekalo 5 minut, než došlo k proměření spektra. Ze spektra se odečetly vlnové délky, z nich se vypočetla korekce. A tato korekce byla použita pro výpočet extinkčního koeficientu. Optická dráha zde byla 1 cm. Přidavků bylo maximálně pět.

I při stanovení ellipticitu se vycházelo z pěti přidavků (5 μl) zásobního methanolového roztoku do přebytku methanolu (3 ml). Dále se vše promíchalo skleněnou tyčinkou a nechalo 5 minut ustálit. Pak se změřilo spektrum a z vybraných vlnových délek se vypočetla korekce. Touto korekcí se proložila lineární regresní přímka. Na konci stanovení byla změřena teplota.

3.2.8 Stanovení rozpustnosti pomocí ověření platnosti Lambertova - Beerova zákona

Stanovení byla prováděna podobně jako při určování extinkčních koeficientů ve vodných roztocích, jen s tím rozdílem, že přidávání zásobních roztoků se pokračovalo do chvíle, než došlo k zřetelné odchylce od linearity. Doba mezi jednotlivými přidavky byla 5 minut.

3.2.9 Stanovení koncentrace roztoku nad krystaly Sudanu I

Roztok byl připraven navážením Sudanu I do pùllitrové kónické baňky. K němu bylo přidáno 500 ml vody. Roztok se opakovaně zahřívá k 60°C a pak se za intenzivního třepání ochlazoval na laboratorní teplotu. Následně byl nechán 5 dní ve tmě, aby se ustálil. Pak byl

proměřen. Následně byl znovu změřen po 21 dnech a po 25 dnech, kdy se nechal ještě 24 hodin promíchávat na třepačce.

3.2.10 Stanovení koncentrace roztoku nad sraženinou elliptycinu ve vodě

Sraženina byla získána z měření rozpustnosti pomocí odchylky od Lambertova - Beerova zákona (3 ml). Roztok se sraženinou byl převeden do skleněné nádoby, ve které byl ponechán 2 dny, aby došlo k ustanovení rovnováhy a usazení pevné fáze. Z tohoto roztoku byly odpipetovány 2 ml, které byly odstředěny na centrifuze eppendorf (15 minut 14 000 rpm), v plastové mikrozkuhavce. Následně byl odebrán čirý roztok nad sraženinou. Tento roztok byl změřen v křemenné kyvetě o optické dráze 1 cm. Na konci stanovení byla změřena teplota.

3.2.11 Stanovení koncentrace roztoku nad krystaly elliptycinu a Sudanu I v methanolu.

Krystaly elliptycinu byly ve skleněné lahvičce částečně rozpuštěny v methanolu. Navážka byla připravena pro vznik 6 mmol/l roztoku v 5 ml methanolu. Roztok se nechal 2 hodiny třepat a následně ustálit tři dny ve tmě. Z tohoto roztoku bylo odpipetováno 3 μ l, tyto objemy se přidaly do nadbytku methanolu (3 ml), kde se proměřilo spektrum podle nastavení pro methanolvé roztoky elliptycinu. V křemenné kyvetě o optické dráze jeden centimetr. Výsledná koncentrace se získala výpočtem z kalibrační přímky s ohledem na ředění. Na konci stanovení byla změřena teplota.

Stanovení rozpustnosti Sudanu bylo provedeno obdobně jako předcházející stanovení elliptycinu. Navážka na stanovení však byla připravena na vznik 30 mmol/l roztoku. Následně se již pracovalo analogicky.

3.2.12 Stanovení vlivu proteinů pomocí ověření platnosti Lambertova - Beerova zákona

Vliv proteinů na rozpustnost byl sledován u hlavního proteinu krevní plasmy a to hovězího sérového albuminu, v koncentraci 5 μ mol/l. Do 3 ml tohoto roztoku byli po malých krocích (1 μ l) přidávány methanolvé roztoky Sudanu I nebo elliptycinu, po zamíchání byl měřen nárůst absorpce korigované vlnové délky pro danou látku ve vodném prostředí. Když došlo k vysrážení, které se na absorpčním spektru projevilo změnou směrnice přímky, pokračovalo se ještě několika body a pak bylo stanovení ukončeno. Mezi jednotlivými

přídavky byla prodleva 5 minut a v průběhu této doby byla zaznamenána 3 spektra. Stanovení probíhala za laboratorní teploty. Za stejných podmínek byl stanoven i vliv lysozymu.

3.2.13 Stanovení vlivu proteinů na rozpustnost stanovením koncentrace roztoku nad sraženinou

Přesycené roztoky Sudanu I a ellipticinu vzniklé ze stanovení v předešlé kapitole (3.2.12) byly převedeny do mikrozkušavek, v kterých se nechaly ustalovat jeden den ve tmě. Druhý den byly 15 minut centrifugovány na centrifuze Eppendorf při 14 000 rpm. Z mikrozkušavky bylo odebráno 1500 µl roztoku nad peletou vysrážené látky. Následně bylo změřeno spektrum v kyvetě o délce optického prostoru 1 cm a laboratorní teplotě 28°C a vypočtena koncentrace. Následně byl roztok přelit zpět do mikrozkušavky a uchován do dalšího dne. Stanovení proběhlo stejně jak první den.

4 Výsledky

4.1 Stanovení Sudanu I

4.1.1 Stanovení extinkčních koeficientů Sudanu I

Prvním krokem ve stanovení rozpustnosti Sudanu I bylo stanovení jeho extinkčních koeficientů pro vlnovou délku 484 nm, kterou jsem zvolil jako absorpční maximum. Průměrná hodnota získaná z 16 měření byla $\varepsilon_{484}=0,016 \pm 0,06 \text{ l}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Dále byl stanoven extinkční koeficient pro korigovanou vlnovou délku $\varepsilon_{484\text{kor}}$ je $0,013 \pm 0,02 \text{ l}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Tato vlnová délka byla zavedena z důvodu lepšího vyhodnocování výsledku rozpustnosti. Hodnoty směrnice, ze kterých byl korigovaný koeficient vypočten, jsou uvedeny v tabulce (Tabulka 3). Tabulka obsahuje informaci o délce kyvety a extinkční koeficient, pro korigovanou i nekorigovanou vlnovou délku pro každé provedené stanovení. Data jsou získána z několika zásobních roztoků, u kterých mohl být malinko odlišný titr Sudanu I, což by mohl být následek rozptylu hodnot. Nicméně tuto chybu již nemohu nikterak ověřit, proto zde prezentuji všechny hodnoty.

Tabulka 3 Přehled stanovení extinkčního koeficientu Sudanu I ve vodě

číslo měření	Směrnice*	délka kyvety [cm]	extinkční koeficient [l. $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$] **	korigovaný extinkční koeficient* [l. $\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]
1.	0,0299	3	0,011	0,010
2.	0,0391	3	0,017	0,013
3.	0,0307	3	0,012	0,010
4.	0,0436	3	0,019	0,015
5.	0,0363	3	0,014	0,012
6.	0,0343	3	0,012	0,011
7.	0,0398	3	0,037	0,013
8.	0,0327	3	0,013	0,011
9.	0,0098	1	0,010	0,010
10.	0,0227	3	0,009	0,007
11.	0,0411	3	0,014	0,014
12.	0,0416	3	0,016	0,014
13.	0,0418	3	0,016	0,014
14.	0,045	3	0,016	0,015
15.	0,048	3	0,016	0,016
16.	0,0469	3	0,017	0,016
Průměr			0,016	0,013
$\pm\text{SD}$			0,006	0,002

* korigovaná vlnová délka výpočtem $A_{484} - (0.46 \cdot A_{350} + 0.54 \cdot A_{600})$

** vlnová délka bez korekce A_{484}

Druhým stanovením, které bylo provedeno je stanovení extinkčních koeficientů pro methanolvé roztoky Sudanu I. zde byla zvolena vlnová délka 481 nm jako vrchol absorpčního maxima. Hodnota extinkčního koeficientu v methanolu byla potřeba znát pro stanovení rozpustnosti nad krystaly Sudanu I. Byla získána z relativně malého počtu tří měření, který byl označen jako postačující, protože Sudan I je v methanolu oproti jiným sledovaným látkám (3-NBA, 2-NBA) relativně dobře rozpustný a zde bylo sledováno ředění zásobního roztoku, na rozdíl od přidávání do vody, kde figurovalo směšování dvou rozpouštědel. Výsledná hodnota extinkčního koeficientu pro methanol v čisté ale i v korigované vlnové délce jsou následující: pro nekorigovanou vlnovou délku $\epsilon_{481} = 0,016 \pm 0,0002 \text{ l}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ a pro korigovanou vlnovou délku $\epsilon_{481\text{kor}} = 0,014 \pm 0,001 \text{ l}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Stejně jako u rozpustnosti ve vodě je zde přidána tabulka (Tabulka 4).

Tabulka 4: Přehled stanovení extinkčních koeficientů Sudanu I v methanolu 23°C

číslo měření	Směrnice*	délka kyvety [cm]	extinkční koeficient [$\text{l} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] **	korigovaný extinkční koeficient* [$\text{l} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
1.	0,0139	1	0,016	0,014
2.	0,0141	1	0,016	0,014
3.	0,0141	1	0,016	0,014
Průměr			0,016	0,014
±SD			0,0002	0,0001

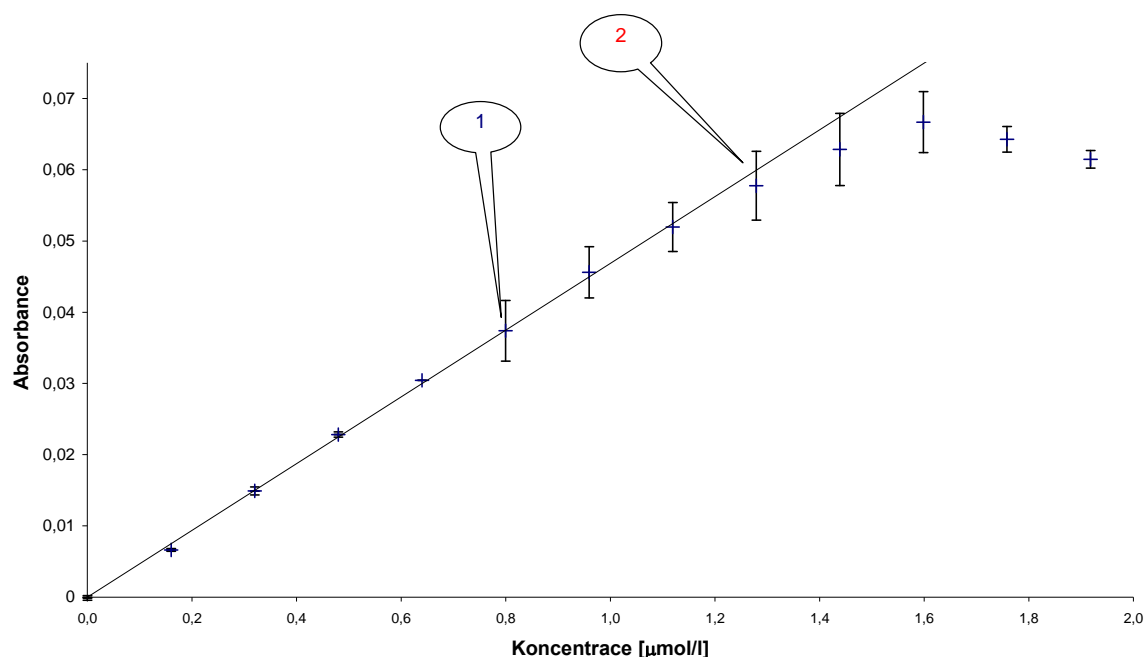
* korigovaná vlnová délka výpočtem $A_{481} - (0.48 \cdot A_{350} + 0.52 \cdot A_{600})$

** vlnová délka bez korekce A_{481}

4.1.2 Stanovení rozpustnosti Sudanu I

Metodou nazvanou stanovení rozpustnosti pomocí ověření platnosti Lambertova - Beerova zákona. Byla stanovena maximální koncentrace Sudanu I (Obrázek 22)

Znázornění účinnosti korekce v případě rozpustnosti Sudanu I



Obrázek 22: Graf zobrazuje závislost koncentrace na absorbanci korigované vlnové délky pro Sudan I $A_{484} - (0.46 \cdot A_{350} + 0.54 \cdot A_{600})$. modré body znázorňují změnu absorbance Sudanu I pro korigovanou vlnovou délku. Přímka znázorňuje teoretický průběh rozpouštění, kdyby probíhalo do nekonečna. „Bod 1“ místo nárůstu chyby – odpovídá koncentraci 0,87 $\mu\text{mol/l}$. „Bod 2“ zobrazuje odklon od Lambertova -Beerova zákona v hodnotě 1,33 $\mu\text{mol/l}$. Graf odpovídá hodnotám v prvním řádku tabulky (Tabulka 5).

Linearita stoupání je na grafu vidět až do hodnoty 1,11 $\mu\text{mol/l}$. Na grafu je patrný odklon již v hodnotě 1,33 $\mu\text{mol/l}$ – bod 2. Nicméně podle nárůstu chyb měření (vždy byla provedena 3 měření pro jeden přídavek) je patrné, že ke změnám v roztoku dochází již kolem hodnoty výsledné koncentrace 0,87 $\mu\text{mol/l}$ – bod 1. Další výsledky potvrzují, že k vysrážení dochází při průměrné koncentraci kolem 1,2 $\mu\text{mol/l}$ (Tabulka 5).

Tabulka 5: Přehled intervalů rozpustnosti Sudanu I ve vodě. Rozmezí koncentrací, při kterých dochází ke vzniku sraženiny Sudanu I

Velikost přídavku/objem kyvety [$\mu\text{l}/\mu\text{l}$]	Výrazný nárůst chyby měření [$\mu\text{mol/l}$]	Hodnota rozpustnosti (Odklon od linearity) [$\mu\text{mol/l}$]	T ($^{\circ}\text{C}$)
4/2500	0,87	1,33	25
1/2500	0,91	1,03	26,5
5/2500	0,99	1,29	-
0,5/2500	0,83	0,99	26
5/2500	0,99	1,19	24,5
Průměrná hodnota:	0,92	1,2	
SD	0,06	0,1	

Výsledné průměrné hodnoty jsou vypočteny z několika přídaveků o různé velikosti z toho důvodu, že většina hodnot pro stanovení byla provedena s hrubým krokem, s velikostí přídávku okolo 10 μl a následným zmenšováním kroku. Pro nejjasnější čitelnost dat se ukázaly jako nejlepší kroky o velikosti 4 a 5 μl . Dále byly provedeny i menší kroky o velikosti přídávku 1 a 0,5 μl . Nicméně u těchto velikostí přídaveků se růstem teploty vzorku projevil neúměrný nárůst délky stanovení a také nárůst chyb operátora, která vedla k vyloučení některých dat, bez statistického zpracování. Tyto nízké hodnoty byly použity protože, sledovaný nárůst chyby proběhl přibližně ve stejné koncentraci, i když k odklonu od linearity došlo o trochu dříve.

Další metodou využitou ke stanovení rozpustnosti Sudanu I bylo stanovení koncentrace roztoku nad krystaly. Hodnoty koncentrace nad krystaly byly měřeny při korigované vlnové délce pro Sudan I ve vodných roztocích. Byly stanoveny 5 dní (22°C) po rozpuštění a po 21 dnech (21°C), a také po 25 dnech (22°C). Při teplotě roztoku 22°C bylo $\text{pH} = 6,56$. Výslednou koncentraci Sudanu I nad krystaly měřenou touto metodou jsem nakonec stanovil z dat zjištěných pro 21. a 25. den. A výsledná hodnota byla $0,16 \pm 0,01 \mu\text{mol/l}$.

Tabulka 6: Přehled výpočtu koncentrací roztoků nad krystaly Sudanu I ve vodě

číslo měření	A ₄₈₄ kor*	extinkční koeficient [l.μmol ⁻¹ -cm ⁻¹]	délka kyvety [cm]	Koncentrace [μmol/l]
Po 5 dnech				
1.	9,60. 10 ⁻³	0,013	3	0,246
2.	9,07. 10 ⁻³	0,013	3	0,233
Po 21 dnech				
1.	5,66. 10 ⁻³	0,013	3	0,145
2.	6,35. 10 ⁻³	0,013	3	0,163
3.	7,26. 10 ⁻³	0,013	3	0,186
4.	5,69. 10 ⁻³	0,013	3	0,145
Po 25 dnech				
1.	6,80. 10 ⁻³	0,013	3	0,174
2.	6,53. 10 ⁻³	0,013	3	0,167
3.	6,46. 10 ⁻³	0,013	3	0,166

* korigovaná vlnová délka výpočtem $A_{484} - (0.46 \cdot A_{350} + 0.54 \cdot A_{600})$

K stanovení bylo využito krystalů, protože hodnoty získané stanovováním sraženiny nebyly reprodukovatelné. Hodnoty takto získané rozpustnosti jsou výrazně nižší než u rozpustnosti získané předešlou metodou. Proto se výsledkům budeme věnovat v diskuzi.

Posledním stanovením bylo stanovení rozpustnosti Sudanu I v methanolu, i toto stanovení bylo provedeno nad krystaly Sudanu I a přineslo zjištění, že rozpustnost je $12,3 \pm 0,4$ mmol/l. Data z jednotlivých měření jsou uvedena v tabulce (Tabulka 7).

Tabulka 7: Stanovení rozpustnosti Sudanu I v methanolu při 22°C

číslo měření	A kor*	extinkční koeficient [[l.μmol ⁻¹ -cm ⁻¹]	délka kyvety [cm]	Koncentrace v kyvetě [μmol/l]	Maximální rozpustnost [mmol/l]
1.	0,1691	0,014	1	12,08	12,153
2.	0,1726	0,014	1	12,329	12,403
3.	0,1652	0,014	1	11,807	11,878
4.	0,1757	0,014	1	12,553	12,954

* korigovaná vlnová délka výpočtem $A_{481} - (0.48 \cdot A_{350} + 0.52 \cdot A_{600})$

4.2 Stanovení ellipticinu

4.2.1 Stanovení extinkčních koeficientů ellipticinu

Stejně jako u Sudanu I proběhlo stanovení extinkčních koeficientů ve dvou rozpouštědlech – vodě a v methanolu. A i zde jsou uvedeny pro vlnovou délku odpovídající absorpčnímu maximu a pro její korigovanou hodnotu (Tabulka 8). Bylo provedeno 5 měření,

kteřá přinesla reprodukovatelné výsledky. Průměrná extinkčního koeficientu byla určena pro nekorigovanou vlnovou délku $\epsilon_{300}=0,073 \pm 0,005 \text{ l.}\mu\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ a pro korigovanou vlnovou délku $\epsilon_{300\text{kor}}=0,062 \pm 0,003 \text{ l.}\mu\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

Tabulka 8 Přehled stanovení extinkčních koeficientů ellipticinu ve vodě při 25°C

číslo měření	Směrnice*	délka kyvety [cm]	extinkční koeficient [l. $\mu\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$] **	korigovaný extinkční koeficient* [l. $\mu\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$]
1.	0,0584	1	0,066	0,058
2.	0,0651	1	0,075	0,065
3.	0,0645	1	0,076	0,065
4.	0,0578	1	0,068	0,058
5.	0,0626	1	0,078	0,063
Průměr			0,073	0,062
±SD			0,005	0,003

* korigovaná vlnová délka výpočtem $A_{300}-(0.43*A_{260}+0.57*A_{330})$

** vlnová délka bez korekce A_{300}

Extinkční koeficienty při stanovení v methanolu jsou v tabulce (Tabulka 9) i zde stejně jako u Sudanu I jsou pouze ze tří stanovení, která vykazovala extrémně malou chybu. Hodnoty jsou pak následující pro nekorigovanou vlnovou délku $\epsilon_{285}=0,044 \pm 0,0001 \text{ l.}\mu\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ a pro korigovanou vlnovou délku $\epsilon_{285\text{kor}}=0,015 \pm 0,001 \text{ l.}\mu\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$

Tabulka 9: Přehled stanovení extinkčních koeficientů ellipticinu v methanolu při teplotě 23°C

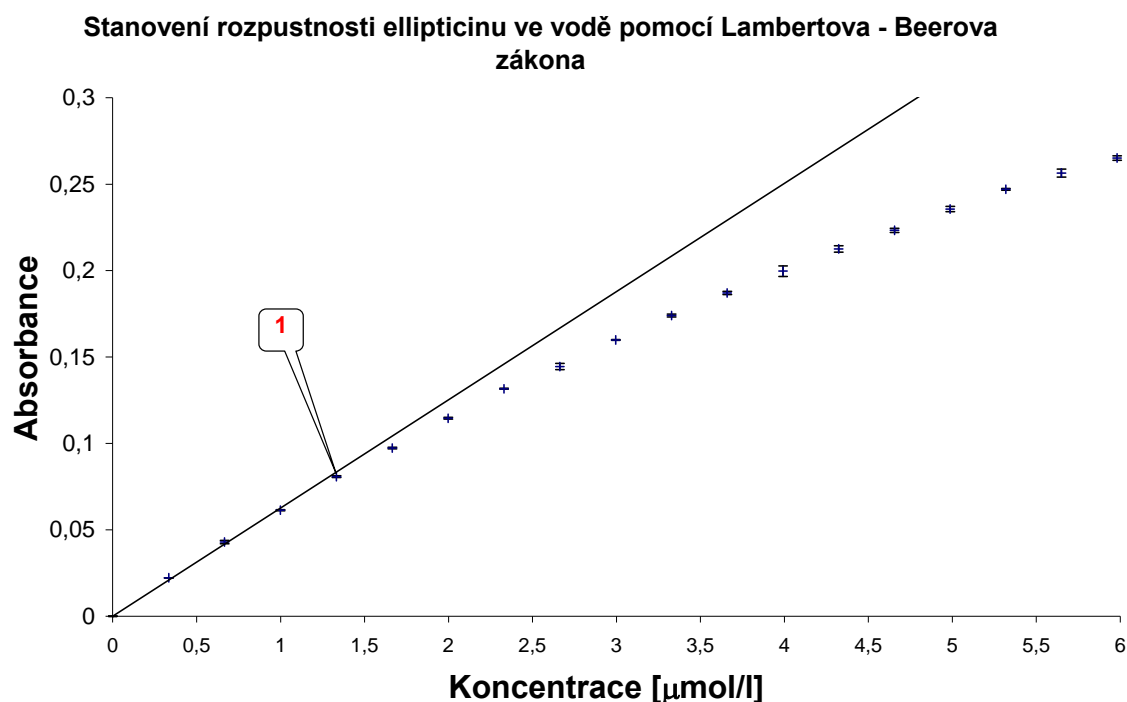
číslo měření	Směrnice*	délka kyvety [cm]	extinkční koeficient [$l \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] **	korigovaný extinkční koeficient* [$l \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
1.	0,115	1	0,138	0,115
2.	0,114	1	0,133	0,114
3.	0,114	1	0,133	0,114
Průměr			0,135	0,114
±SD			0,0021	0,0004

* korigovaná vlnová délka výpočtem $A_{285} - (0.5 \cdot A_{250} + 0.5 \cdot A_{320})$

** vlnová délka bez korekce A_{285}

4.2.2 Stanovení rozpustnosti ellipticinu

Stanovení rozpustnosti ellipticinu ve vodě metodou ověřením platnosti Lambertova - Beerova zákona je zobrazeno na grafu (Obrázek 23).



Obrázek 23: Graf závislosti koncentrace na absorbanci korigované vlnové délky $A_{300} - (0.43 \cdot A_{260} + 0.57 \cdot A_{330})$ pro ellipticin. Přímka znázorňuje teoretický lineární nárůst koncentrace. Modré body značí nárůst korigované vlnové délky. „Bod 1“ je odklon od Lambertova - Beerova zákona. Graf odpovídá hodnotám v druhém řádku tabulky (Tabulka 10).

K odklonu od přímky Lambertova - Beerova zákona dochází již při hodnotě 1,33 $\mu\text{mol/l}$. Výsledná koncentrace pak byla změřena z následujících hodnot (Tabulka 10) a výsledná průměrná hodnota rozpustnosti je $1,2 \pm 0,1 \mu\text{mol/l}$.

Tabulka 10: Stanovení rozpustnosti ellipticinu ve vodě

Velikost jednotlivého přídavku/objem květy [$\mu\text{l}/\mu\text{l}$]	Hodnota rozpustnosti (Odklon od linearity) [$\mu\text{mol/l}$]	T ($^{\circ}\text{C}$)
0,5/3000	1,23	23
1/3000	1,33	23,5
0,5/3000	0,99	23
0,3/3000	1,19	23,5
Průměr:	1,2 \pm 0,1	

Druhou metodou použitou pro stanovení rozpustnosti ellipticinu ve vodě bylo stanovení koncentrace roztoku nad sraženinou. Touto metodou byly získány výsledné koncentrace shrnuté v tabulce (Tabulka 11).

Tabulka 11: Znázornění výpočtu koncentrace ellipticinu nad sraženinou ve vodě.

číslo měření	$A_{300\text{kor}}$	extinkční koeficient [$\text{l}\cdot\mu\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$]	délka květy [cm]	Koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]
1.	0,0820	0,062	1	1,32
2.	0,0788	0,062	1	1,27

* korigovaná vlnová délka výpočtem $A_{300} - (0.43 \cdot A_{260} + 0.57 \cdot A_{330})$

Hodnoty rozpustnosti ellipticinu získané z obou metod jsou srovnatelné. U ellipticinu byla použita sraženina proto, že hodnoty takto získané nevykazovali známky zákalu a makroskopické sraženiny jako tomu bylo u Sudanu I.

Další stanovovanou hodnotou byla rozpustnost ellipticinu v methanolu. Ke stanovení byl použit extinkční koeficient pro korigovanou vlnovou délku. Výsledná hodnota směrnice methanolu byla stanovena ze tří přímek. Ta pak byla použita k výpočtu maximální koncentrace. Roztok ellipticinu byl ředěn, aby byla koncentrace v rozmezí kalibrační přímky. Přehled všech výpočtů je v tabulce (Tabulka 12) Výsledná koncentrace byla určena jako $4,23 \pm 0,003 \text{ mmol/l}$.

Tabulka 12: Znázornění výpočtu koncentrace nad krystaly ellipticinu

číslo měření	A_{kor}	extinkční koeficient [$l \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]	délka kyvety [cm]	Koncentrace v kyvetě [$\mu\text{mol/l}$]	Maximální koncentrace [mmol/l]
1.	0,4803	0,114	1	4,204	4,225
2.	0,4813	0,114	1	4,213	4,234
3.	0,4808	0,114	1	4,208	4,229
4.	0,4807	0,114	1	4,207	4,232

* korigovaná vlnová délka výpočtem $A_{285} - (0.5 \cdot A_{250} + 0.5 \cdot A_{320})$

4.3 Stanovení 2-NBA

4.3.1 Stanovení extinkčních koeficientů 2-NBA

Stanovení extinkčních koeficientů 2-NBA bylo provedeno stejně jako u předcházejících stanovení pro čistou a pro korigovanou vlnovou délku. Výsledné hodnoty jsou zatíženy poměrně velkou chybou, na kterou má vliv délka optické dráhy a tak i nárůst šumu pozadí. Výsledné extinkční koeficienty (Tabulka 13) jsou pro nekorigovanou vlnovou délku $\varepsilon_{404} = 0,07 \pm 0,02 \text{ l} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a pro korigovanou $\varepsilon_{404kor} = 0,049 \pm 0,008 \text{ l} \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

Tabulka 13: Přehled stanovení extinkčních koeficientů 2-NBA ve vodě

číslo měření	Směrnice*	délka kyvety [cm]	extinkční koeficient [$l \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$] **	korigovaný extinkční koeficient* [$l \cdot \mu\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
1.	0,4849	9	0,085	0,054
2.	0,3225	9	0,056	0,036
3.	0,3918	9	0,047	0,044
4.	0,5351	9	0,056	0,059
5.	0,4832	9	0,093	0,054
Průměr			0,07	0,049
±SD			0,02	0,008

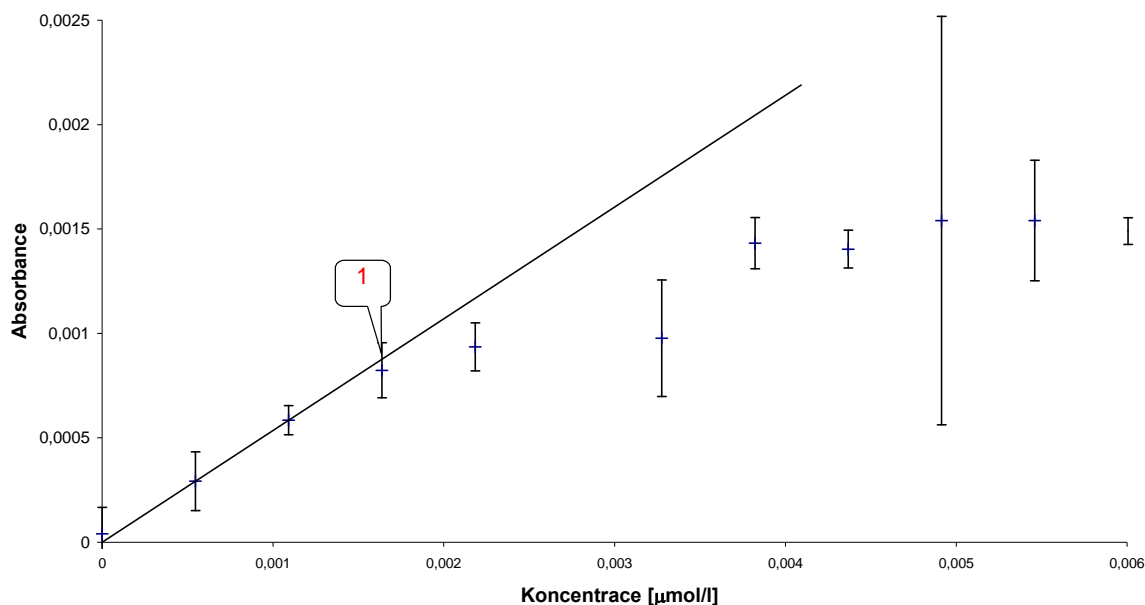
* korigovaná vlnová délka výpočtem $A_{404} - (0.77 \cdot A_{345} + 0.23 \cdot A_{600})$

** vlnová délka bez korekce A_{404}

4.3.2 Stanovení rozpustnosti 2-NBA

Do vody byl přidáván 0,273 mM zásobní roztok 2-NBA v DMSO. Tento roztok byl intenzivně zamíchán a nechán stát přibližně 2 minuty, aby se 2-NBA rozptýlil do celého objemu. Každý přídavek byl s časovým odstupem 1 minuty třikrát proměřen. Objem rozpouštědla byl 500 ml a délka optické dráhy 9 cm.

Stanovení rozpustnosti 2-NBA ve vodě pomocí Lambertova - Beerova zákona



Obrázek 24: Graf závislosti koncentrace na absorbanci korigované vlnové délky A_{404} ($0.77 \cdot A_{345} + 0.23 \cdot A_{600}$) Stanovení rozpustnosti 2-NBA ve vodě pomocí odchylky Lambertova – Beerova zákona. Chybové úsečky ukazují chybu vypočtenou ze tří paralelních měření. Bod 1 značí odklon od lineárního průběhu v hodnotě koncentrace 1,6 nmol/l. Graf odpovídá hodnotám v druhém řádku tabulky (Tabulka 14).

V případě 2-NBA došlo k odchýlení od linearity již při velmi nízké koncentraci (1,6 nmol/l) (Obrázek 24) Nad touto koncentrací absorbance nadále roste již jen málo a mění se v čase. Měření bylo zopakováno ještě 4x s různou velikostí přídávku (Tabulka 14). Průměrná hodnota rozpustnosti 2-NBA ve vodě určená touto metodou je 4 ± 2 nmol/l.

Tabulka 14: Stanovení rozpustnosti 2-NBA ve vodě

Velikost přídatku/objem rozpuštědla [$\mu\text{l}/\mu\text{l}$]	Hodnota rozpustnosti (Odklon od linearity) [$\mu\text{mol/l}$]	T ($^{\circ}\text{C}$)
0,5/500 000	0,0038	26
1/500 000	0,0016	24,5
1/500 000	0,0054	27,5
0,5/500 000	0,006	24
0,5/500 000	0,0032	24,5
Výsledná koncentrace:	0,004\pm0,002	

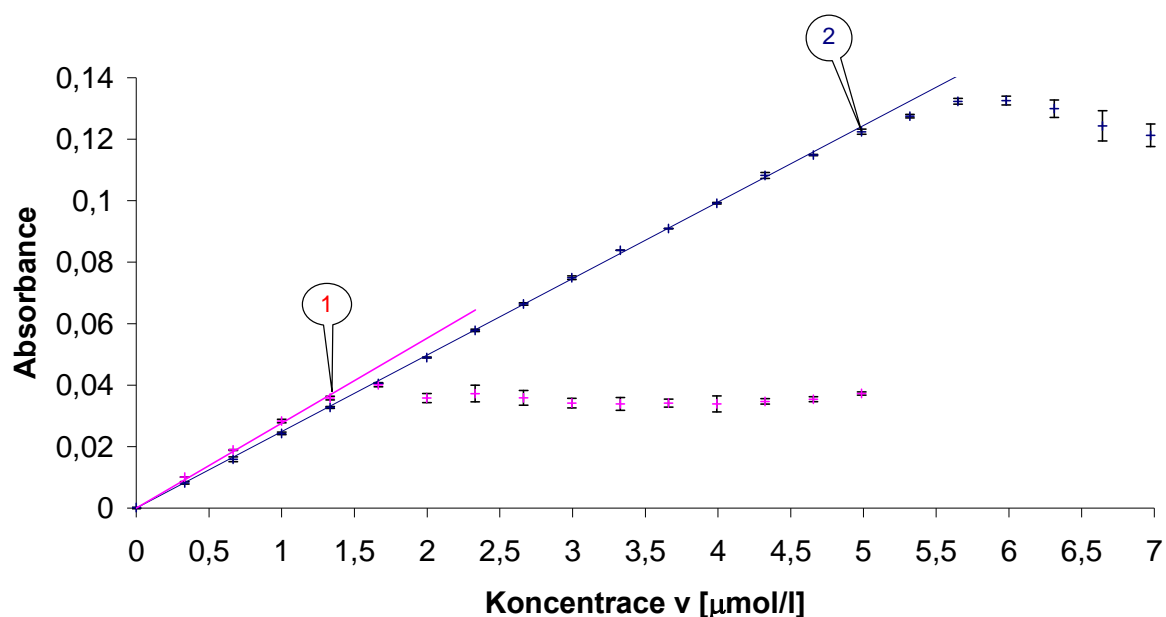
Vzhledem k problematickému odstranění špatně sedimentující pevné fáze a velmi nízkým hodnotám absorpce roztoku (kolem 0,001) se však nepodařilo hodnoty rozpustnosti stanovit i druhou používanou metodou tedy měřením absorpce roztoku nad pevnou fází.

4.4 Vliv proteinů na rozpustnost jednotlivých látek.

4.4.1 Stanovení vlivu proteinů na rozpustnost Sudanu I

Vliv albuminu na rozpustnost Sudanu I byl sledován postupným přidáváním zásobního roztoku Sudanu I do 5 $\mu\text{mol/l}$ vodného roztoku hovězího sérového albuminu (BSA). Odklon od linearity v tomto případě nastal až při mnohem vyšší koncentraci Sudanu I než v samotné vodě a to v bodě odpovídající koncentraci 5,0 $\mu\text{mol/l}$ Sudanu I (Obrázek 25, Bod 2).

Porovnání rozpustnosti Sudanu I ve vodě a v roztoku BSA



Obrázek 25: Graf znázorňuje rozdíl v rozpustnosti Sudanu I ve vodě (Bod 1 fialové body) a v 5 μ mol/l roztoku BSA (Bod 2 a modré body). Body 1 a 2 označují koncentrace při kterých dochází k odklonu od linearity Lambertova a Beerova zákona. Hodnota těchto bodů je 1,33 μ mol/l (Bod 1) pro vodu a 4,98 μ mol/l (Bod 2) pro roztok BSA. Absorbance byla vypočtena pro korigovanou vlnovou délku $A_{484}-(0.46 \cdot A_{350}+0.54 \cdot A_{600})$.

Rozpustnost Sudanu I se v přítomnosti BSA v porovnání s vodním roztokem výrazně zvýšila v průměru o 3,9 μ mol/l. Data vlivu BSA na rozpustnost byla pořízena ze 3 měření a vždy došlo k odklonu u hodnoty 5,0 μ mol/l.

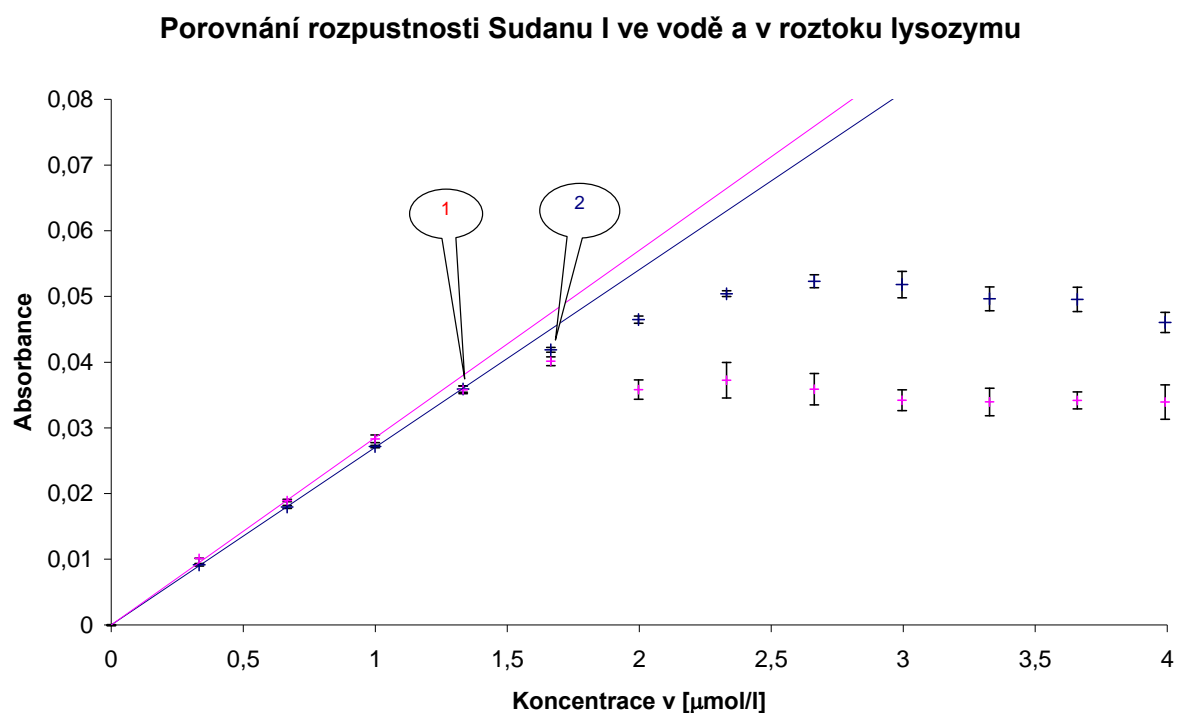
Ověření vlivu BSA na rozpustnost Sudanu I bylo provedeno proměřením absorbance titrovaného roztoku s nadbytkem Sudanu I po 24 a 48 hodinách stání při laboratorní teplotě (Tabulka 15). Takto získaná data potvrdila rozpustnost Sudanu I v přítomnosti BSA v rozmezí 4,7 - 4,8 μ mol/l a zároveň ukazuje systém je za tuto dobu již prakticky v rovnováze

Tabulka 15: Změna koncentrace Sudanu I v roztoku BSA v čase

	Směrnice*	Vypočtená koncentrace [μ mol/l]
24 hodin		
1	0,0249	4,7
48 hodin		
2	0,0249	4,8

* korigovaná vlnová délka výpočtem $A_{484}-(0.46 \cdot A_{350}+0.54 \cdot A_{600})$

Jako další modelový protein byl studován lysozym, který by na rozdíl od BSA, neměl vykazovat afinitu k lipofilním látkám. V přítomnosti lysozymu dochází jen k nepatrnému nárůstu rozpustnosti Sudanu I (Obrázek 26). Odklon od linearity v přítomnosti lysozymu byl zaznamenán při koncentraci Sudanu I 1,66 $\mu\text{mol/l}$, což odpovídá zvýšení rozpustnosti oproti vodnému prostředí o 0,3 $\mu\text{mol/l}$.

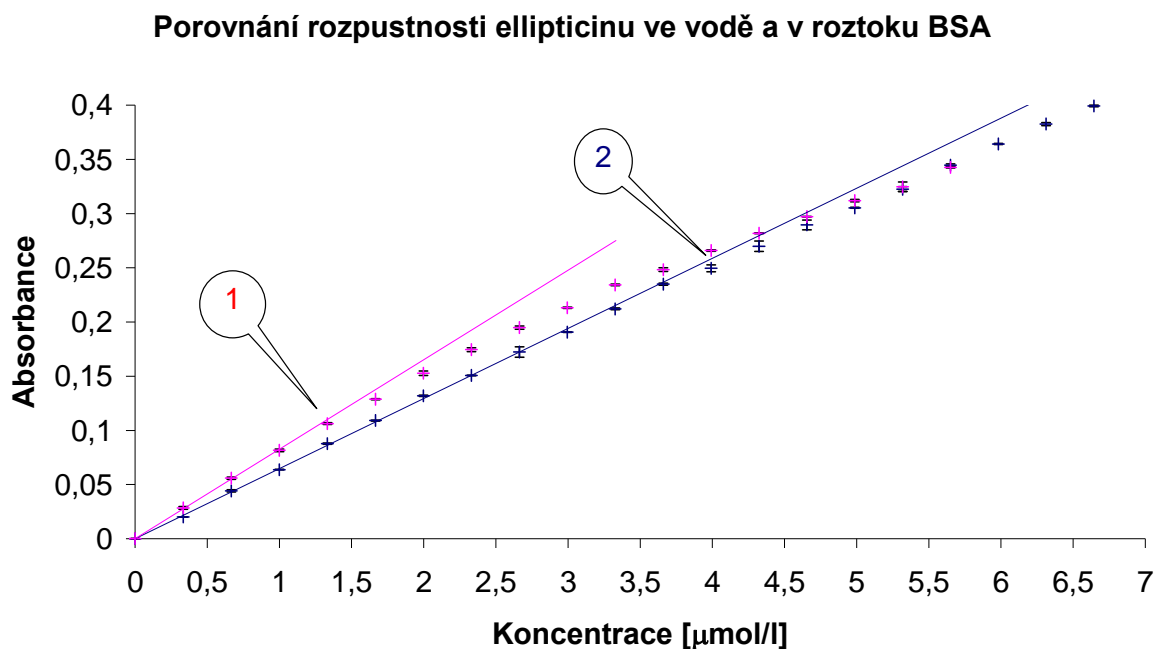


Obrázek 26: Graf znázorňuje odklon od linearity Lambertova - Beerova zákona v bodě, kde je dosaženo rozpustnosti Sudanu I, dochází k odklonu od lineárního průběhu. Modré body znázorňují rozpustnost v 5 $\mu\text{mol/l}$ roztoku Lysozymu. Fialové body znázorňují stejný děj ve vodném roztoku. Bod 1 vyznačuje odklon od lineárního průběhu pro vodný roztok v hodnotě koncentrace 1,33 $\mu\text{mol/l}$ a bod 2 znázorňuje tento děj v roztoku lysozymu, u hodnoty koncentrace 1,66 $\mu\text{mol/l}$. Absorbance byla vypočtena pro korigovanou vlnovou délku A_{484-} ($0.46 \cdot A_{350} + 0.54 \cdot A_{600}$).

4.4.2 Stanovení vlivu proteinů na rozpustnost ellipticinu

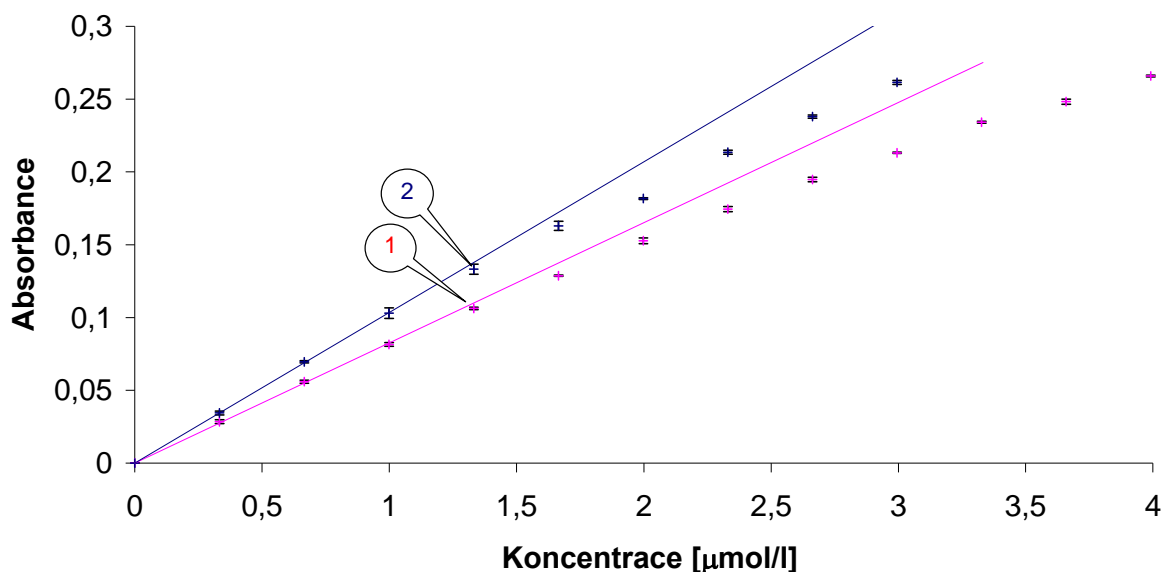
Při stanovení ellipticinu také došlo ke zvýšení jeho rozpustnosti v přítomnosti 5 $\mu\text{mol/l}$ roztoku BSA, nicméně v porovnání s roztoky Sudanu I toto zvýšení bylo menší než u Sudanu I (Obrázek 27). Stanovená rozpustnost v roztoku BSA určená touto metodou byla 3,99 $\mu\text{mol/l}$, pokud od této hodnoty odečteme stanovenou průměrnou hodnotu rozpustnosti ellipticinu ve vodě, tj. 1,2 $\mu\text{mol/l}$, získáme nárůst koncentrace o 2,79 $\mu\text{mol/l}$. Tato data byla získána ze tří stanovení s velikostí přídatku 1 μl , k odklonu vždy došlo při koncentraci 3,99 $\mu\text{mol/l}$.

Při porovnání rozpustnosti ellipticinu v roztoku lysozymu a ve vodě zůstává jeho rozpustnost prakticky nezměněna a nepřesáhne $1,33 \mu\text{mol/l}$, jak můžeme vidět na grafu (Obrázek 28).



Obrázek 27: Graf znázorňuje nárůst rozpustnosti ellipticinu v $5 \mu\text{mol/l}$ roztoku BSA (modrá řada) oproti vodnému roztoku (fialová řada). Body 1 a 2 znázorňují odklon od lineární průběhu rozpouštění, a jsou tedy hraniční koncentrací, které je možno dosáhnout. U roztoku BSA je to koncentrace $3,99 \mu\text{mol/l}$ za tím co u vody je to pouhých $1,33 \mu\text{mol/l}$. vynášená absorbance je pro korigovanou vlnovou délku $A_{300} - (0.43 \cdot A_{260} + 0.57 \cdot A_{330})$.

Porovnání rozpustnosti ellipticinu ve vodě a v roztoku lysozymu



Obrázek 28: Graf znázorňuje stanovování rozpustnosti ellipticinu metodou odchýlení od Lambertova-Beerova zákona ve vodě (fialová. bod 1) a v 5 $\mu\text{mol/l}$ roztoku lysozymu (modrá. bod 2). K odklonům dochází při stejné koncentraci a to při koncentraci 1,33 $\mu\text{mol/l}$. V grafu je vynášena korigovaná vlnová délka $A_{300}-(0.43 \cdot A_{260}+0.57 \cdot A_{330})$.

Metodou stanovení absorbance roztoku nad sraženinou po 24 a 48 hodinách byly získány hodnoty srovnatelné s předchozími (Tabulka 16).

Tabulka 16: Změna koncentrace ellipticinu v roztoku BSA v čase

	Směrnice*	Vypočtená koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]
24 hodin		
1.	0,0647	3,96
48 hodin		
2.	0,0647	4,12

* korigovaná vlnová délka výpočtem $A_{300}-(0.43 \cdot A_{260}+0.57 \cdot A_{330})$

5 Diskuze

Pro spektrofotometrická stanovení byla zvolena absorpční maxima, která se v daném úseku spektra jevila jako nejintenzivnější. Zatímco ve viditelné oblasti byla intenzita maximálně v setinách, v blízké ultrafialové oblasti byla absorbance výrazně intenzivnější (desetiny). Metody, kterými byl měřen Sudan I ve vodě, využívaly vlnové délky v oblasti VIS spektra, speciálně vlnovou délku 484 nm, i když tato látka vykazuje absorpční maximum při cca 490 nm. Tato vlnová délka byla zvolena, i když se nejedná o absolutní maximum, kvůli výskytu několika vadných pixelů na detektoru v oblasti maxima (490 nm). Proto byla zvolena nejvyšší hodnota ještě před touto chybou. Výhodou volby měření VIS oblasti byla větší variabilita při výběru kyvet, protože jsem mohl měřit v kyvetě s delší optickou drahou (3 cm) a také ve větších objemech (25 ml).

Pro stanovení rozpustnosti Sudanu I v methanolu byla použita vlnová délka 228 nm. Zde bylo zvoleno intenzivnější spektrum, na úkor objemu a optické dráhy, protože metoda vykazovala dostatečně reprodukovatelné výsledky.

Rozpustnost ellipticinu byla proměřovaná při vlnových délkách 300 nm pro vodu a 285 nm pro methanol. Obě tyto hodnoty byly měřeny v kyvetě o optické dráze 1 cm. A data byla reprodukovatelná.

Pro 2-NBA bylo provedeno jen stanovení při 404 nm. Ve skleněné kyvetě o optické dráze 9 cm. Teprve toto uspořádání poskytlo dostatečně vysokou citlivost, aby mohla být takto nízká hodnota rozpustnosti reprodukovatelně odečtena.

Ke stanovení rozpustností těchto látek byl používán jednopaprskový spektrofotometr s detektorem typu „diode array“. Jednopaprskové přístroje více „trpí“ kolísáním nulové linie, také proto byly zavedeny korekce na pozadí před i za absorpčním pásem (kapitola 3.2.3 str. 42). Tyto korekce také částečně mírnily vliv zákalu a nečistot, které by jinak znesnadňovaly měření velmi nízkých absorbancí, a tak přispěly k lepší reprodukovatelnosti výsledků. V případě stanovení extinkčního koeficientu Sudanu I ve vodě tak došlo k poklesu směrodatné odchylky stanovené pro 16 hodnot o více jako polovinu (Tabulka 3). U stejného stanovení pro ellipticin došlo k podobnému jevu (Tabulka 8). Na chybu stanovení v methanolu korekce významnější vliv neměla. Protože absorpce u zvolených vlnových délek byla silná (v desetinách) a nárůst v jiných úsecích spektra minimální (tisíciny).

Opačný extrém je stanovení 2-NBA ve vodě, kde i v kyvetě s optickou dráhou 9 cm se absorbance v okamžiku srážení pohybuje kolem 0,001. Zde korekce očistila vybrané vlnové délky od vlivu zákalu a stínění a zvýraznila zvolené absorpční maximum (404 nm), dostatečně natolik, že bylo možno stanovit extinkční koeficient a dokonce i rozpustnost 2-NBA.

Při porovnání extinkčních koeficientů vyšel s nejvyšší hodnotou pro vodné roztoky ellipticin, dále se umístil 2-NBA a extinkční koeficient pro Sudan I byl téměř 5x nižší. Porovnání extinkčních koeficientů ve vodě a methanolu ukazuje, že v případě Sudanu I je extinkční koeficient podobný, zatímco u ellipticinu je v methanolu takřka dvojnásobný.

Pro stanovení rozpustnosti jednotlivých sloučenin ve vodě bylo použito dvou metod. První využívala odchylky od Lambertova - Beerova zákona a druhá zjišťovala přímo koncentraci rozpuštěné látky nad sraženinou. Vypočtené koncentrace byly zhruba podobné pro obě metody. Výhodou obou metod je nenáročnost na instrumentaci, spektrofotometr nalezneme v každé laboratoři. Nicméně nevýhodou byla práce ve skle, protože látky jsou nepolární a v zásobních roztocích (hlavně Sudanu I) uchovávaných v plastu nebo dávkovaných plastovou špičkou pipety docházelo k poklesu koncentrací a k sorpci do plastů. Další nevýhodou byla náročnost na čistotu rozpouštědel, kdy u vody velice záleželo na čistotě jí samotné, ale i použitého laboratorního nádobí, protože sebemenší obsah prachu nebo jiných nečistot mohl výrazně snížit citlivost. S tím je spojena nevýhoda u metody pomocí Lambertova - Beerova zákona, kdy mohlo dojít k znečištění roztoku prachem nebo jednotlivé pipety či míchadla v průběhu delšího měření.

Rozpustnost je u všech zkoumaných látek vyšší v methanolu než ve vodě, což není vzhledem k jejich hydrofobní povaze příliš překvapující. Zajímavé ale je, že zatímco rozpustnost Sudanu I a ellipticinu ve vodě je přibližně podobná a pohybuje se okolo 1 $\mu\text{mol/l}$ pro Sudan I a 1,2 $\mu\text{mol/l}$ pro ellipticin. Rozpustnost v methanolu se pro tyto dvě látky liší přibližně 3x. Roztok Sudanu I měl rozpustnost až 12,3 mmol/l , zatímco ellipticin, který byl ve vodě rozpustnější, měl rozpustnost jen kolem 4,2 mmol/l . Takto zjištěná hodnota rozpustnosti Sudanu I byla o něco nižší než hodnota uvedená v literatuře (17 mmol/l) [36], tento publikovaný údaj byl však také zaznamenán při teplotě vyšší o 3°C, než při které byl zjišťován v této mé práci.

Stanovení měřením koncentrace nad sraženinou potvrdilo rozpustnost ellipticinu v blízkosti hodnoty získané pomocí odchylky od Lambertova - Beerova zákona. Tedy kolem hodnoty (1,2 $\mu\text{mol/l}$). U Sudanu I však byla výsledná hodnota rozpustnosti stanovená nad

sraženinou nereprodukovatelná, protože se nikdy zcela nepodařilo odstranit lehkou plovoucí sraženinu ze směsi. Filtrace se také neukázala jako vhodná, jelikož docházelo k sorpci Sudanu I na filtry a také k dalšímu znečišťování roztoku (hodnoty velmi kolísaly, proto tato data v práci nejsou uvedena). Proto byla k tomuto experimentu využita krystalická pevná fáze Sudanu I, v tomto případě však byla výsledná hodnota rozpustnosti 6x menší než u metody vycházející z odchýlení od Lambertova - Beerova zákona. Rozdíl by mohl být vysvětlen právě krystalickou formou Sudanu I použitou pro tento experiment. Tento experiment byl prováděn dostatečně dlouho, aby byl systém blízko rovnováhy, protože při prodloužení rozpouštění o 4 dny vzrostla koncentrace Sudanu I jen nesignifikantně (o 6 %). Hodnota rozpustnosti Sudanu I ve vodě mohla být také srovnatelná s údaji v literatuře ($0,1 \pm 0,08 \mu\text{mol/l}$) [36]. V uvedené práci použili ne příliš vhodnou klasickou metodu měření koncentrace nad pevnou fází s následnou filtrací, což se pravděpodobně odrazilo ve vysokém rozptylu jejich výsledků v rozmezí $0,02 - 0,26 \mu\text{mol/l}$!

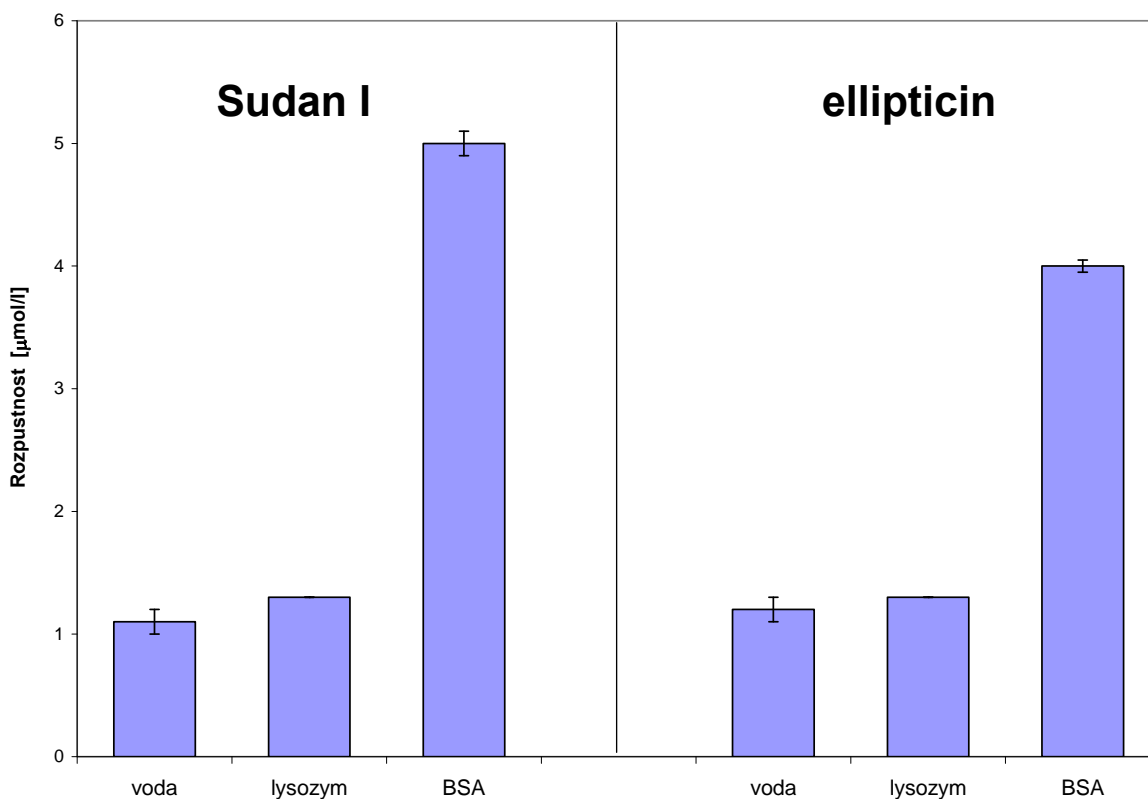
Rozdíl mezi hodnotami rozpustnosti Sudanu I nad čerstvou voluminosní sraženinou oproti sraženině krystalické by mohl být způsoben jinou povahou pevné fáze. Mohlo by se například jednat o přítomnost amorfni formy pevného Sudanu I s nízkou hustotou oproti formě krystalické. Na což ostatně ukazují i markantní rozdíly v rychlosti sedimentace ve vodě zmiňované výše.

2-NBA má proti ostatním studovaným sloučeninám rozpustnost výrazně nižší (4 nmol/l). V porovnání s rozpustností jeho izomeru derivátu 3-NBA, kterou jsem stanovoval v bakalářské práci, je tato hodnota 1000x menší. Hodnota rozpustnosti 3-NBA ve vodě byla $3,8 \mu\text{mol/l}$ [80]. Takto nízká hodnota rozpustnosti by mohla mít významný vliv na biologickou dostupnost 2-NBA, např. při interakci s enzymy s obvyklou afinitou. Toto by mohlo zdůvodňovat fakt, proč je 2-NBA mnohem méně mutagenní. Také by to mohlo přispět k vysvětlení, proč jeho redukce chinon:oxidoreduktasou *in vitro* prakticky neprobíhá, i když podle výsledků modelování by se jeho vazba do vazebného místa této reduktasy měla lišit od 3-NBA jen minimálně [57,58].

Vliv proteinů na rozpustnost se u obou sledovaných sloučenin projevil nárůstem jejich rozpustnosti v roztoku BSA (Obrázek 29). BSA má podle literatury pro Sudan I jedno vazné místo [30]. Při sledované koncentraci by tedy teoreticky mělo dojít k nárůstu až na hodnotu odpovídající součtu koncentrace BSA a rozpustnosti Sudanu I tedy celkem $6,1 \mu\text{mol/l}$. Pozorovaný nárůst, přestože byl zřetelný, však této hodnoty rozpustnosti nedosáhl. Je možné, že použitý BSA nebyl zcela zbaven jiných ligandů, které mohly částečně blokovat vazbu

Sudanu I. Dalším důvodem proč tomu tak je, by mohla být nízká afinita Sudanu I k BSA. V literatuře se uvádí disociační konstanta komplexu Sudan I-BSA jejíž hodnota je 8 $\mu\text{mol/l}$ [30]. Vzhledem k tomu, že rozpustnost Sudanu I ve vodě je jen 1,2 $\mu\text{mol/l}$ je pravděpodobné, že nedochází k plné saturaci BSA a určité procento vazebných míst tak zůstává neobsazené. K nárůstu rozpustnosti v roztoku BSA oproti vodě, došlo i v případě ellipticinu, zde nebyl nárůst tak markantní, pouhých 2,79 $\mu\text{mol/l}$ což odpovídá asi 56% saturaci BSA. Zdůvodnění může být obdobné jako u Sudanu I, tj. obsazení vazebných míst na molekule BSA jinými ligandy a nedostatečná koncentrace ellipticinu pro úplnou saturaci proteinu. Vzhledem k nižšímu stupni saturace však můžeme očekávat, že afinita ellipticinu k BSA bude poněkud nižší než v případě Sudanu I.

U vzorku lysozymu k žádnému výraznějšímu nárůstu koncentrace sledovaných látek nedošlo (Obrázek 29), toto zjištění odpovídá předpokladu, že u molekuly lysozymu nedochází k významné vazbě na protein. Popsaný nepatrný nárůst rozpustnosti Sudanu I je vzhledem k přesnosti měření nesignifikantní.



Obrázek 29: Porovnání vlivu proteinů na rozpustnost. U obou sledovaných látek je vidět výrazný nárůst rozpustnosti u 5 $\mu\text{mol/l}$ roztoku BSA,

6 Závěr

Předkládaná práce se zabývala stanovením rozpustnosti jednotlivých modelových karcinogenů, studovaných v laboratoři, jako možného faktoru ovlivňujícího jejich biologickou dostupnost. Podařilo se stanovit rozpustnost Sudanu I, ellipticinu a 2-nitrobenzanthronu ve vodném prostředí i methanolu. K tomu byly částečně použity spektrofotometrické metody již dříve vypracované v mé bakalářské práci, tyto metody ale byly dále vylepšeny, především z hlediska zvýšení citlivosti. Díky tomu se podařilo stanovit rozpustnost i velmi málo rozpustné zájmové sloučeniny – 2-NBA.

V prvním bodě bylo ověřeno, že dříve zavedené spektrofotometrické techniky pro stanovení rozpustnosti dokážou poměrně přesně a reprodukovatelně stanovit rozpustnosti jednotlivých málo rozpustných látek a získat extinkční koeficienty pro jednotlivé látky ve vodě i v methanolu. Stanovení bylo úspěšné po zavedení korekcí, které očišťovaly hodnoty absorbance od rušivých vlivů kolísání základní linie a částečně i zákalu. Extinkční koeficienty byly stanoveny pro všechny látky v obou rozpouštědlech jak s korekcí, tak bez korekce. Všechny jsou přehledně uvedeny v tabulce (Tabulka 17).

Dále byla stanovena rozpustnost ellipticinu, Sudanu I i 2-NBA pomocí metody, která využívala odchylky od Lambertova - Beerova zákona. Rozpustnost ellipticinu a Sudanu I ve vodě byla potvrzena metodou stanovení rozpustnosti nad sraženinou. Rozpustnost v methanolu byla stanovena metodou nad krystaly. Ta v případě Sudanu I mohla být porovnána s hodnotou uvedenou v literatuře. Rozpustnosti všech látek uvádím v souhrnné tabulce (Tabulka 18). Bylo zjištěno, že na rozdíl od ostatních sloučenin je rozpustnost 2-NBA ve vodě až 1000x nižší, což může částečně vysvětlit jeho výrazně sníženou mutagenitu např. ve srovnání s jeho izomerem 3-NBA.

Bylo ověřeno, že výše zmiňované metody stanovení rozpustnosti tedy sledování odchylky od Lambertova a Beerova zákona i měření vlivu proteinu na koncentraci látky v roztoku nad sraženinou, mohou být použity pro sledování vazby dvou modelových látek Sudanu I a ellipticinu na protein. Důležitým zjištěním také je, že albuminy dokážou vázat Sudan I i ellipticin, a mohou tak fungovat jako rezervoár i přenašeč těchto látek v organismu..

Tabulka 17: Přehled extinkčních koeficientů pro všechny látky ve vodě a v methanolu

Látka/ rozpouštědlo	extinkční koeficient [l.μmol⁻¹.cm⁻¹] vlnová délka	korigovaný extinkční koeficient [l.μmol⁻¹.cm⁻¹] vlnová délka
Sudan I/ voda	0,016 ± 0,006 A ₄₈₄	0,013 ± 0,002 A ₄₈₄ -(0.46*A ₃₅₀ +0.54*A ₆₀₀)
ellipticin/ voda	0,073 ± 0,005 A ₃₀₀	0,062 ± 0,003 A ₃₀₀ -(0.43*A ₂₆₀ +0.57*A ₃₃₀)
2-NBA/voda	0,07 ± 0,02 A ₄₀₄	0,049 ± 0,008 A ₄₀₄ -(0.77*A ₃₄₅ +0.23*A ₆₀₀)
Sudan I/ methanol	0,016 ± 0,0002 A ₄₈₁	0,014 ± 0,0001 A ₄₈₁ -(0.48*A ₃₅₀ +0.52*A ₆₀₀)
ellipticin/ methanol	0,135 ± 0,0021 A ₂₈₅	0,114 ± 0,0004 A ₂₈₅ -(0.5*A ₂₅₀ +0.5*A ₃₂₀)

Tabulka 18: Přehled stanovených rozpustností všech sledovaných látek ve vodě a v methanolu.

Látka	Rozpustnost ve vodě [μmol/l]	Rozpustnost v methanolu [mmol/l]
Sudan I	1,2 ± 0,1*	12,3 ± 0,4
ellipticin	1,2 ± 0,1	4,23 ± 0,003
3-NBA	3,8**	13 ± 0,6**
2-NBA	0,004 ± 0,002	0,84 ± 0,02**

* v roztoku rovnováže s krystalickou fází je rozpustnost 0,16 ± 0,01 μmol/l

** Data převzata z [80]

7 Citovaná literatura

1. Zhoubné nádory v roce 2010 ÚZIS ČR URL: <http://www.uzis.cz/rychle-informace/zhoubne-nadory-roce-2010> [Accessed April 27, 2013].
2. Stiborova, M. (2005) Studium enzymů biotransformujících xenobiotika jako nástroj k poznání mechanismu působení karcinogenů a konstrukce kancerostatik nové generace. URL: <http://archiv.otevrena-veda.cz/users/Image/default/C2Seminare/MultiObSem/001.pdf> [Accessed May 12, 2013].
3. Stiborova, M., Miksanova, M. (1999) Molekulární mechanismus kancerogeneze. *Živa*. **4**, 146.
4. Voet, D., Voet, J.G. (1995) *Biochemie* (Victoria Publishing a.s., Praha).
5. Stiborova, M. (2010) *Xenobiochemie* (Přednáška na PřF UK, Praha, Katedra biochemie).
6. Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2009) *Essential Cell Biology* (Garland Science).
7. Hynie, S. (2003) *Speciální farmakologie* (Karolinum, Praha).
8. Stiborova, M. (2010) *Biochemie jako teoretický základ biomedicíny* (Přednáška na PřF UK, Praha, Katedra biochemie).
9. P. Stratil, V. Kuban (2004) Princip Karcinogeneze a přírodní karcinogenní sloučeniny v potravinách. *Chem. Listy* **98**, 379–384.
10. Knejzlik, Z., Kaš, J., Ruml, T. (2000) Mechanismus vstupu xenobiotik do organismu a jejich detoxikace. *Chem. Listy* **94**, 913–918.
11. Stiborova, M., Martinek, V., Paca, J., Hudecek, J. (2004) Enzymy metabolizující kontaminanty životního prostředí. *Chem. Listy* **98**, 876–890.
12. Lüllmann, H., Mohr, K., Hein, L. (2007) *Barevný atlas farmakologie* (Grada Publishing a.s., Praha).
13. Stiborova, M. (2002) Aromatické nitrosločeniny: kontaminanty životního prostředí a potenciální karcinogeny pro člověka. *Chem. Listy* **98**, 784–791.
14. Chroma, L., Macková, M., Macek, T., Martinek, V. (2001) Rostlinné cytochromy P450 a peroxidasy a jejich úloha při degradaci kontaminantů životního prostředí. *Chem. Listy* **95**, 212–222.
15. Omura, T. (2010) Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system. *J. Biochem.* **147**, 297–306.
16. Nelson, D.R., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman, J.J., Feyereisen, R., Waxman, D.J., Waterman, M.R., Gotoh, O., Coon, M.J., Estabrook, R.W., Gunsalus, I.C., Nebert, D.W.

- (1996) P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* **6**, 1–42.
17. Anzenbacher, P., Anzenbacherová, E. (2001) Cytochromes P450 and metabolism of xenobiotics. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 737–747.
 18. Gutierrez, P.L. (2000) The role of NAD(P)H oxidoreductase (DT-Diaphorase) in the bioactivation of quinone-containing antitumor agents: a review. *Free Radic. Biol. Med.* **29**, 263–275.
 19. Belinsky, M., Jaiswal, A.K. (1993) NAD(P)H:quinone oxidoreductase1 (DT-diaphorase) expression in normal and tumor tissues. *Cancer Metastasis Rev.* **12**, 103–117.
 20. Solubility (2013) *Wikipedia, the free encyclopedia*. URL: <http://en.wikipedia.org/w/index.php?title=Solubility&oldid=568292314> [Accessed August 22, 2013].
 21. Calvert, J.G. (1990) Glossary of atmospheric chemistry terms (Recommendations 1990). *Pure and Applied Chemistry* **62**, 2167–2219.
 22. Blasko, A., Leahy-Dios, A., Nelson, W.O., Austin, S.A., Killion, R.B., Visor, G.C., Massey, I.J. (2001) Revisiting the Solubility Concept of Pharmaceutical Compounds. *Monatshefte fuer Chemie* **132**, 789–798.
 24. Lipinski, C.A. (2000) Drug-like properties and the causes of poor solubility and poor permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **44**, 235–249.
 25. Koutsoukos, P.G., Kofina, A.N., Kanellopoulou, D.G. (2007) Solubility of salts in water: Key issue for crystal growth and dissolution processes. *Pure Appl. Chem* **79**, 825–850.
 25. Yang, W., Chen, Z., Jiang, X., Hu, Y., Li, Y., Shi, Y., Wang, J. (2013) Solubility of succinic anhydride in different pure solvents and binary solvent mixtures with the temperature range from 278.15 to 333.15 K. *J. Mol. Liq.* **180**, 7–11.
 26. Beck, B., Kramer, C., Clark, T. (2008) Prediction of Aqueous Solubility in the early Drug Discovery Phase. URL: http://www.eyesopen.com/2008_eurocup_presentations/Beck_EuroCUP_II.pdf.
 27. Hampl, F., Paleček, J., Rádl, S. (2007) *Farmakochemie* (VŠCHT, Praha).
 28. Peters, T. (1996) *All about albumin: biochemistry, genetics, and medical applications* (Academic Press, San Diego).
 29. Petitpas, I., Bhattacharya, A.A., Twine, S., East, M., Curry, S. (2001) Crystal structure analysis of warfarin binding to human serum albumin: anatomy of drug site I. *J. Biol. Chem.* **276**, 22804–22809.
 30. Zhang, Y.-Z., Dai, J., Zhang, X.-P., Yang, X., Liu, Y. (2008) Studies of the interaction between Sudan I and bovine serum albumin by spectroscopic methods. *Journal of Molecular Structure* **888**, 152–159.

31. Ohyoshi, E., Hamada, Y., Nakata, K., Kohata, S. (1999) The interaction between human and bovine serum albumin and zinc studied by a competitive spectrophotometry. *J. Inorg. Biochem* **75**, 213–218.
32. Peters, C.W., Kruse, U., Pollwein, R., Grzeschik, K.H., Sippel, A.E. (1989) The human lysozyme gene. Sequence organization and chromosomal localization. *Eur. J. Biochem.* **182**, 507–516.
33. Øllgaard, H., Frost, L., Galster, J., Hansen, O. (1998) *Survey of Azo-colorants in Denmark: Consumption, Use, Health and Environmental Aspects* (Danish Environmental Protection Agency, København).
34. Chung, K.T., Cerniglia, C.E. (1992) Mutagenicity of azo dyes: structure-activity relationships. *Mutat. Res.* **277**, 201–220.
35. Xu, H., Heinze, T.M., Chen, S., Cerniglia, C.E., Chen, H. (2007) Anaerobic metabolism of 1-amino-2-naphthol-based azo dyes (Sudan dyes) by human intestinal microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 7759–7762.
36. Abraham, M.H., Amin, M., Zissimos, A.M. (2002) The lipophilicity of Sudan I and its tautomeric forms. *Phys. Chem.* **4**, 5748–5752.
37. Stiborova, M., Martinek, V., Semanská, M., Hodek, P., Dračinský, M., Cvačka, J., Schmeiser, H.H., Frei, E. (2009) Oxidation of the carcinogenic non-aminoazo dye 1-phenylazo-2-hydroxy-naphthalene (Sudan I) by cytochromes P450 and peroxidases: a comparative study. *Interdiscip Toxicol.* **2**, 195–200.
38. Stiborova, M., Martinek, V., Rydlova, H., Hodek, P., Frei, E. (2002) 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.
39. Dracinsky, M., Cvacka, J., Semanska, M., Martinek, V., Frei, E., Stiborova, M. (2009) Mechanism of Formation of (Deoxy)guanosine Adducts Derived from Peroxidase-Catalyzed Oxidation of the Carcinogenic Nonaminoazo Dye 1-Phenylazo-2-hydroxynaphthalene (Sudan I). *Chem. Res. Toxicol.* **22**, 1765–1773.
40. Stiborova, M., Asfaw, B., Frei, E., Schmeiser, H.H., Wiessler, M. (1995) Benzenediazonium ion derived from Sudan I forms an 8-(phenylazo)guanine adduct in DNA. *Chem. Res. Toxicol.* **8**, 489–498.
41. Mathe, G., Triana, K., Pontiggia, P., Blanquet, D., Hallard, M., Morette, C. (1998) Data of pre-clinical and early clinical trials of acriflavine and hydroxy-methyl-ellipticine reviewed, enriched by the experience of their use for 18 months to 6 years in combinations with other HIV1 virostatics. *Biomed. Pharmacother.* **52**, 391–396.
42. Stiborova, M., Frei, E. (2001) Targeting of ellipticine drugs on tumor cells. *Chem. Listy* **95**, 549–555.
43. Stiborova, M., Poljakova, J., Martinkova, E., Borek-Dohalska, L., Eckschlager, T., Kizek, R., Frei, E. (2011) Ellipticine cytotoxicity to cancer cell lines -- a comparative study. *Interdiscip Toxicol.* **4**, 98–105.

44. Vranova, I. (2012) *Mechanismus působení protinádorového léčiva ellipticinu v cílových tkáních jeho účinku* - Diplomová práce (Univerzita Karlova, Praha).
45. Stiborova, M., Sejbál, J., Borek-Dohalska, L., Aimova, D., Poljakova, J., Forsterova, K., Rupertova, M., Wiesner, J., Hudecek, J., Wiessler, M., Frei, E. (2004) The anticancer drug ellipticine forms covalent DNA adducts, mediated by human cytochromes P450, through metabolism to 13-hydroxyellipticine and ellipticine N-2-oxide. *Cancer Res.* **64**, 8374–8380.
46. Poljakova, J., Sulc, M., Forsterova, K. (2005) Oxidation of an antitumor drug ellipticine by peroxidases. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*
47. Stiborova, M., Poljakova, J., Ryslava, H., Dracinsky, M., Eckschlager, T., Frei, E. (2007) Mammalian peroxidases activate anticancer drug ellipticine to intermediates forming deoxyguanosine adducts in DNA identical to those found in vivo and generated from 12-hydroxyellipticine and 13-hydroxyellipticine. *Int. J. Cancer.* **120**, 243–251.
48. Stiborova, M., Arlt, V.M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Kotrbova, V., Moserova, M., Hudecek, J., Phillips, D.H., Frei, E. (2008) Role of hepatic cytochromes P450 in bioactivation of the anticancer drug ellipticine: Studies with the hepatic NADPH: Cytochrome P450 reductase null mouse. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **226**, 318–327.
49. Stiborova, M., Bieler, C.A., Wiessler, M., Frei, E. (2001) The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts. *Biochem. Pharmacol.* **62**, 1675–1684.
50. Poljakova, J., Eckschlager, T., Hrabeta, J., Hrebackova, J., Smutny, S., Frei, E., Martinek, V., Kizek, R., Stiborova, M. (2009) The mechanism of cytotoxicity and DNA adduct formation by the anticancer drug ellipticine in human neuroblastoma cells. *Biochem. Pharmacol.* **77**, 1466–1479.
51. Stiborova, M., Stiborova-Rupertova, M., Borek-Dohalska, L., Wiessler, M., Frei, E. (2003) Rat microsomes activating the anticancer drug ellipticine to species covalently binding to deoxyguanosine in DNA are a suitable model mimicking ellipticine bioactivation in humans. *Chem. Res. Toxicol.* **16**, 38–47.
52. Arlt, V.M., Glatt, H., Muckel, E., Pabel, U., Sorg, B.L., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H. (2002) Metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone by human acetyltransferases and sulfotransferase. *Carcinogenesis* **23**, 1937–1945.
53. Enya, T., Suzuki, H., Watanabe, T., Hirayama, T., Hisamatsu, Y. (1997) 3-Nitrobenzanthrone, a Powerful Bacterial Mutagen and Suspected Human Carcinogen Found in Diesel Exhaust and Airborne Particulates. *Environmental Science & Technology* **31**, 2772–2776.
54. Takamura-Enya, T., Suzuki, H., Hisamatsu, Y. (2006) Mutagenic activities and physicochemical properties of selected nitrobenzanthrones. *Mutagenesis* **21**, 399–404.
55. Arlt, V.M. (2005) 3-Nitrobenzanthrone, a potential human cancer hazard in diesel exhaust and urban air pollution: a review of the evidence. *Mutagenesis* **20**, 399–410.

56. Bhat, K.L., Garg, A., Bock, C.W. (2002) Calculated values of the octanol-water partition coefficient and aqueous solubility for aminoazobenzene dyes and related structures. *Dyes Pigment* **52**, 145–159.
57. Reynisson, J., Stiborová, M., Martínek, V., Gamboa da Costa, G., Phillips, D.H., Arlt, V.M. (2008) Mutagenic potential of nitrenium ions of nitrobenzanthrones: correlation between theory and experiment. *Environ. Mol. Mutagen.* **49**, 659–667.
58. Stiborova, M., Martinek, V., Svobodova, M., Sistkova, J., Dvorak, Z., Ulrichova, J., Simanek, V., Frei, E., Schmeiser, H., Phillips, D., Arlt, V. (2010) Mechanisms of the Different DNA Adduct Forming Potentials of the Urban Air Pollutants 2-Nitrobenzanthrone and Carcinogenic 3-Nitrobenzanthrone. *Chem. Res. Toxicol.* **23**, 1192–1201.
59. Arlt, V.M., Glatt, H., Gamboa da Costa, G., Reynisson, J., Takamura-Enya, T., Phillips, D.H. (2007) Mutagenicity and DNA adduct formation by the urban air pollutant 2-nitrobenzanthrone. *Toxicol. Sci.* **98**, 445–457.
60. Nagy, E., Zeisig, M., Kawamura, K., Hisamatsu, Y., Sugeta, A., Adachi, S., Möller, L. (2005) DNA adduct and tumor formations in rats after intratracheal administration of the urban air pollutant 3-nitrobenzanthrone. *Carcinogenesis* **26**, 1821–1828.
61. Arlt, V.M., Stiborova, M., Hewer, A., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H. (2003) Human enzymes involved in the metabolic activation of the environmental contaminant 3-nitrobenzanthrone: evidence for reductive activation by human NADPH:cytochrome p450 reductase. *Cancer Res.* **63**, 2752–2761.
62. Bieler, C.A., Cornelius, M.G., Stiborova, M., Arlt, V.M., Wiessler, M., Phillips, D.H., Schmeiser, H.H. (2007) Formation and persistence of DNA adducts formed by the carcinogenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone in target and non-target organs after intratracheal instillation in rats. *Carcinogenesis* **28**, 1117–1121.
63. Arlt, V.M., Gingerich, J., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H., Douglas, G.R., White, P.A. (2008) Genotoxicity of 3-nitrobenzanthrone and 3-aminobenzanthrone in MutaMouse and lung epithelial cells derived from MutaMouse. *Mutagenesis* **23**, 483–490.
64. Arlt, V.M., Stiborova, M., Henderson, C.J., Osborne, M.R., Bieler, C.A., Frei, E., Martinek, V., Sopko, B., Wolf, C.R., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H. (2005) Environmental pollutant and potent mutagen 3-nitrobenzanthrone forms DNA adducts after reduction by NAD(P)H:quinone oxidoreductase and conjugation by acetyltransferases and sulfotransferases in human hepatic cytosols. *Cancer Res.* **65**, 2644–2652.
65. Vom Brocke, J., Kraus, A., Whibley, C., Hollstein, M.C., Schmeiser, H.H. (2009) The carcinogenic air pollutant 3-nitrobenzanthrone induces GC to TA transversion mutations in human p53 sequences. *Mutagenesis* **24**, 17–23.
66. Seidel, A., Dahmann, D., Krekeler, H., Jacob, J. (2002) Biomonitoring of polycyclic aromatic compounds in the urine of mining workers occupationally exposed to diesel exhaust. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **204**, 333–338.

67. Phousongphouang, P.T., Arey, J. (2003) Sources of the atmospheric contaminants, 2-nitrobenzanthrone and 3-nitrobenzanthrone. *Atmos. Environ.* **37**, 3189–3199.
68. Nagy, E., Adachi, S., Takamura-Enya, T., Zeisig, M., Möller, L. (2007) DNA adduct formation and oxidative stress from the carcinogenic urban air pollutant 3-nitrobenzanthrone and its isomer 2-nitrobenzanthrone, in vitro and in vivo. *Mutagenesis* **22**, 135–145.
69. Arlt, V.M., Cole, K.J., Phillips, D.H. (2004) Activation of 3-nitrobenzanthrone and its metabolites to DNA-damaging species in human B lymphoblastoid MCL-5 cells. *Mutagenesis* **19**, 149–156.
70. Stiborova, M., Arlt, V.M., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Frei, E., Schmeiser, H.H., Phillips, D.H. (2005) Molecular mechanism of genotoxicity of the environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **149**, 191–197.
71. Stiborova, M., Dracinska, H., Hajkova, J., Kaderabkova, P., Frei, E., Schmeiser, H.H., Soucek, P., Phillips, D.H., Arlt, V.M. (2006) The environmental pollutant and carcinogen 3-nitrobenzanthrone and its human metabolite 3-aminobenzanthrone are potent inducers of rat hepatic cytochromes P450 1A1 and -1A2 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase. *Drug Metab. Dispos.* **34**, 1398–1405.
72. Linhart, I., Mraz, J., Hanzlikova, I., Silhánková, A., Frantik, E., Himl, M. (2012) Carcinogenic 3-nitrobenzanthrone but not 2-nitrobenzanthrone is metabolised to an unusual mercapturic acid in rats. *Toxicol. Lett.* **208**, 246–253.
73. Stiborova, M., Cechova, T., Borek-Dohalska, L., Moserova, M., Frei, E., Schmeiser, H.H., Paca, J., Arlt, V.M. (2012) Activation and detoxification metabolism of urban air pollutants 2-nitrobenzanthrone and carcinogenic 3-nitrobenzanthrone by rat and mouse hepatic microsomes. *Neuro Endocrinol. Lett.* **33**, 8–15.
74. Cechova, T. (2012) *Studium metabolismu vzdušných polutantů a mutagenů 3-nitrobenzanthronu a 2-nitrobenzanthronu* - Diplomová Práce (Univerzita Karlova, Praha).
75. McMurry, J. (2007) *Organická chemie* (VUTIUM, Brno).
76. Kodicek, M., Karpenko, V. (2000) *Biofyzikální chemie* (Academia, Praha).
77. Obsil, T. (2012) *Biofyzikální chemie I* (Přednáška na PřF UK, Praha, Katedra fyzikální chemie).
78. Agilent (2000) Agilent 8453 UV-visible Spectroscopy System. URL: <http://www.chem.agilent.com/Library/usermanuals/Public/G1103-90004.pdf>, 27.5.2011.
79. Nápověda pro Microsoft Excel 2003 URL: <http://office.microsoft.com/cs-cz/excel-help/interaktivni-referencni-prirucka-prikazu-aplikaci-excel-2003-az-excel-2007-HA010149151.aspx> [Accessed December 5, 2013].
80. Reboun, M. (2011) *Vztah mezi mutagenitou a rozpustností nitrobenzanthronů ve vodných i nevodných rozpouštědlech* - Bakalářská práce (Univerzita Karlova, Praha).