

Received: 2014.07.11
Accepted: 2015.04.30
Published: 2015.06.12

Addukty hemoglobiny jako biomarkery narażenia człowieka na wybrane ksenobiotyki*

Hemoglobin adducts as biomarkers of human exposure to selected xenobiotics

Bożena Bukowska

Katedra Biofizyki Skażeń Środowiska, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytet Łódzki

Streszczenie

W środowisku życia i pracy pojawia się coraz więcej nowych substancji o pochodzeniu antropogenicznym działających toksycznie. Jednocześnie poszukuje się nowych sposobów oceny narażenia ludzi na te substancje. Od wielu lat przydatnymi markerami, a dokładniej biomarkernami dawki biologicznie skutecznej są addukty hemoglobiny. W pracy omówiono literaturę głównie z lat 2010-2014, która dotyczy adduktów hemoglobiny ze związkami toksycznymi o właściwościach elektrofilowych. W interakcjach z ksenobiotykami ważne są miejsca nukleofilowe hemoglobiny, np. grupy tiolowe, aminowe, karboksylowe i hydroksylowe. Do takich połączeń dochodzi najczęściej w wyniku reakcji związków z N-terminalną grupą aminową waliny w Hb, z azotem imidazolu histydyny i grupą sulfhydrylową cysteiny $\beta 93$. Addukty Hb charakteryzują się dużą dostępnością, długim okresem występowania (do 120 dni) w krwiobiegu, dużą trwałością, mają bezpośredni kontakt z wszystkimi komórkami organizmu. Pomiar zawartości adduktów hemoglobiny z określonymi związkami chemicznymi wykorzystuje się do oceny narażenia na liczne ksenobiotyki, takie jak: akrylamid; substancje obecne w dymie tytoniowym: np. benzo(α)piren i benzoantracen, tlenek etylenu, aminy aromatyczne, substancje stosowane na dużą skalę w przemyśle np. glicidol czy naftalen i jego pochodne. Od niedawna wskazuje się też na możliwość oznaczania adduktów hemoglobiny z metabolitami estrogenów: 2,3- oraz 3,4-chinonem 17- β estradiolu, jako wskaźników informujących o podwyższonym ryzyku zachorowania na raka piersi. Addukty białkowe są wykorzystywane alternatywnie zamiast adduktów DNA do oceny narażenia na różne klasy substancji elektrofilowych.

Słowa kluczowe:

biomarkery • addukty • hemoglobina • akrylamid • estradiol • benzopiren • naftalen • tlenek etylenu • aminy aryłowe

Summary

In the living and working environments more and more new substances of anthropogenic origin exerting toxic properties appear. Simultaneously, the evaluation of human exposure is assessed. For many years adducts of hemoglobin (Hb) have been useful markers of the exposure of humans to various xenobiotics. These adducts are also termed biologically effective dose biomarkers. This paper focuses on a review of literature, mainly from the years 2010-2014, which refers to the hemoglobin adducts of toxic compounds with electrophilic properties. In the interactions of xenobiotics with hemoglobin, groups such as thiol, amino, carboxyl and hydroxyl of this hemoprotein are involved. These combinations occur most often in the reaction of xenobiotics with

*Praca została sfinansowana ze środków statutowych Katedry Biofizyki Skażeń Środowiska Wydziału Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Łódzkiego nr 505/387/R.

	<p>an N-terminal amino group of valine in Hb, imidazole nitrogen of histidine and cysteine sulfhydryl β93. Hb adducts are characterized by high availability, a long period of occurrence (up to 120 days) in the circulatory system, and high durability, and they have contact with all cells of the body. The measurement of hemoglobin adducts can be potentially used in the assessment of exposure to many xenobiotics such as acrylamide; substances present in tobacco smoke, e.g. benzo(α)pyrene and benzanthracene, ethylene oxide, aryl amines; and substances used on a large scale in industry such as glycidol and naphthalene and its derivatives. Recently the possibility of determination of hemoglobin adducts with estrogen metabolites has been postulated as indicators informing about heightened risk of breast cancer. Protein adducts are used as an alternative to DNA adducts for different classes of electrophilic substances.</p>
<p>Keywords:</p>	<p>biomarkers • adducts • hemoglobin • acrylamide • estradiol • benzopyrene • naphthalene • ethylene oxide • aryl amines</p>
<p>Full-text PDF:</p>	<p>http://www.phmd.pl/fulltxt.php?ICID=1156936</p>
<p>Word count:</p>	<p>5037</p>
<p>Tables:</p>	<p>–</p>
<p>Figures:</p>	<p>8</p>
<p>References:</p>	<p>58</p>

Adres autorki: prof. dr hab. Bożena Bukowska, Katedra Biofizyki Skażeń Środowiska, ul. Pomorska 141/143, 90-236 Łódź; e-mail: bukow@biol.uni.lodz.pl

Wykaz skrótów: **1,2-NPQ** – 1,2-naftochinon (1,2-naphthoquinone); **1,4-NPQ** – 1,4-naftochinon (1,4-naphthoquinone); **ABP-hyd-Val** – addukt pochodnej 4,4'-diizocyjanianu difenylometanu z hemoglobina (adduct of 4,4'-diphenylmethane diisocyanate with hemoglobin); **AcMDA** – N-acetylo-4,4'-metylenodianilina (N-acetyl-4,4'-methylenedianiline); **DAG** – olej jadalny zawierający diacyloglicerol w stężeniu 80% (edible oil containing diacylglycerol at the concentration of 80%); **DDT** – 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorofenyl)etan (1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane); **DIC** – diizocyjaniany (diisocyanates); **diHOPrVal** – addukt glicydolu z hemoglobina (glycidol adduct with hemoglobin); **E2-2,3-P** – 2,3-chinon 17-β estradiolu (2,3-quinone 17-β estradiol); **E2-3,4-Q** – 3,4-chinon 17-β estradiolu (3,4-quinone 17-β estradiol); **ETS** – środowiskowy dym tytoniowy (environmental tobacco smoke); **HDI** – diizocyjanian heksano-1,6-diylu (hexamethylene-1,6-diisocyanate); **HOEtVal** – addukt tlenku etylenu z hemoglobina (ethylene oxide adduct of hemoglobin); **HPB** – 4-hydroxy-1-(3-pirydylo)-1-butanon (4-hydroxy-1-(3-pyridyl)-1-butanone); **IARC** – Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (International Agency for Research on Cancer); **IPDI** – diizocyjanian izoforonu (isophorone diisocyanate); **IUPAC** – Międzynarodowa Unia Chemii Czystej i Stosowanej (International Union of Pure and Applied Chemistry); **MDA** – 4,4'-dianilinometan (4,4'-dianilinomethane); **MDI** – 4,4'-diizocyjanian difenylometanu (4,4'-diphenylmethane diisocyanate); **NDI** – diizocyjanian naftalenu (naphthalene diisocyanate); **NNK** – 4-(metylnitrosoamino)-1-(3-pirydylo)-1-butanon (4-(methylnitrosoamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone); **NNN** – N-nitrozonornikotyna (nitrosonornicotine); **NPO** – 1,2-epoksy-naftalen (naphthalene-1,2-oxide); **TDI** – diizocyjanian toluenu (toluene diisocyanate); **WWA** – wielocykliczne węglowodory aromatyczne (polycyclic aromatic hydrocarbons).

WSTĘP

Biologiczne markery, to istotne elementy tzw. sekwencji wydarzeń zapoczątkowanej ekspozycją na czynniki szkodliwe, a zakończonej konkretną chorobą. Pojęcie „biomarker” jest używane w szerokim zakresie obejmującym większość analiz świadczących o interakcji między układem biologicznym a chemicznymi, fizycznymi czy też biologicznymi czynnikami środowiskowymi.

Biomarker można określić jako mierzalne zmiany w komórkach organizmu, a także zachodzących w nich procesach biochemicznych wywołane przez wchłonięty ksenobiotyk. Biomarkery są swoistymi znacznikami i dowodami na wchłonięcie substancji toksycznej do organizmu. Musi uwzględniać zależność między stężeniem substancji szkodliwych lub ich metabolitów w materiałach wskaźnikowych (np. we krwi czy moczu) lub zaburzeniami w procesach biochemicznych a zmianami w narządach

krytycznych, takich jak wątroba, nerki, serce czy mózg [24]. Wyróżnia się biomarkery ekspozycji, skutków oraz wrażliwości [24,35,30]:

I. Biomarkery ekspozycji są to możliwe do zmierzenia, obecne w organizmie egzogenne substancje, ich metabolity lub produkty ich interakcji z docelowymi cząsteczkami lub komórkami, świadczące o narażeniu danej osoby na określone ksenobiotyki. Dostarczają bezpośrednich dowodów ekspozycji osób narażonych na dany czynnik środowiskowy, ale nie mierzą skutków szkodliwych. Można je podzielić na:

- biomarkery dawki wewnętrznej – wskazujące na obecność danego czynnika toksycznego w organizmie (np. benzen przejawia się obecnością kwasu mukonowego lub katecholu we krwi lub moczu; wielocykliczne węglowodory aromatyczne ocenia się oznaczając 1-hydroksy-benzo(α)piren w moczu; cynk może powodować pojawienie się protoporfiryny cynkowej w moczu, a narażenie na metale ciężkie ujawnia się ich obecnością we włosach);
- biomarkery dawki biologicznie skutecznej - terminem tym określa się ilość wchłoniętego ksenobiotyku, która reaguje ze składnikami komórki, takimi jak DNA czy białka. Przykładem są addukty z hemoglobina oznaczane we krwi do 120 dni od narażenia; addukty z albuminami oznaczane w osoczu do 20 dni od narażenia czy też addukty związków elektrofilowych z DNA;

II. Biomarkery skutków to mierzalne zmiany o charakterze biochemicznym, fizjologicznym, behawioralnym, które powstały w organizmie pod wpływem związków toksycznych lub ich metabolitów. W zależności od wielkości mogą być rozpoznane jako łączące się z już obecnymi lub mogącymi się pojawić zaburzeniami zdrowotnymi. Są nimi zmiany cytogenetyczne (aberracje chromosomowe, mikrojądra, wymiany chromatyd siostrzanych), uszkodzenia łańcucha DNA (pęknięcia jedno- i dwuniciowe). Obecność różnych onkoprotein ras, p21, fcs czy beta w moczu, krwi, ślinie w stanach zdrowotnych niewskazujących na występowanie objawowych skutków choroby nowotworowej pojawiających się przy narażeniu na azbest, benzo(a)piren (policykliczne węglowodory aromatyczne) czy polichlorowane bifenyle).

III. Biomarkery wrażliwości są wskaźnikami wrodzonej lub nabytej zdolności organizmu do odpowiedzi wywołanej ekspozycją na specyficzny ksenobiotyk. Biomarkerów wrażliwości poszukuje się głównie wśród polimorficznych wersji genów kodujących enzymy biorące udział w metabolizowaniu związków chemicznych lub naprawie DNA (np. polimorfizm genów cytochromu P450, transferaz, acetylotransferaz czy paraoksonazy 1). Ponadto wcześniejsza ekspozycja na substancje chemiczne indukująca odpowiedź immunologiczną może uwrażliwić daną osobę na kolejną ekspozycję, np. przez rozwinięcie się nadwrażliwości płucnej po ekspozycji na pył czy związki chemiczne [26].

ADDUKTY KSENOBIOTYKÓW Z DNA LUB BIAŁKAMI

Bardzo przydatną metodą w określaniu dawki biologicznie skutecznej jest oznaczanie adduktów jakie związki rakotwórcze (lub ich metabolity) tworzą z białkami lub DNA. Addukt powstaje, gdy niskocząsteczkowy związek wiąże się z cząsteczką biologiczną. Większość związków rakotwórczych to związki elektrofilne lub ulegające transformacji do metabolitów o takich właściwościach. Elektrofilne związki rakotwórcze mogą się wiązać kowalencyjnie z miejscami nukleofilnymi w białkach lub DNA, tworząc odpowiednie addukty [50].

Addukty z DNA, jeśli nie są usunięte, mogą zapoczątkować powstanie mutacji. Addukty z DNA bada się wykorzystując głównie limfocyty - jednojądrzaste komórki krwi, niekiedy komórki nabłonka złuszczone z płuc, komórki pęcherza moczowego oraz komórki pochodzące z różnych tkanek pobrane podczas biopsji [31].

Addukty związków toksycznych z DNA są uważane za czynniki mogące potencjalnie powodować powstawanie nowotworów, a addukty z białkami za wskaźniki ekspozycji na dany czynnik. Natomiast białkowe uważa się za ważny substytut tworzenia adduktów z DNA, ponieważ wiele chemicznych czynników rakotwórczych wiąże się z taką samą kinetyką zarówno z DNA, jak i białkami krwi [36].

Addukty z albuminami surowicy krwi są syntetyzowane głównie w wątrobie, w której wiele związków prokancerogennych ulega przemianie w aktywne metabolity o właściwościach kancerogennych. Albuminy należą do białek o stosunkowo długim okresie półtrwania wynoszącym 20–24 dni, dlatego też addukty z nimi służą jako biomarkery opóźnionej ekspozycji [30].

Addukty z hemoglobina

Hemoglobina jest podstawowym białkiem występującym w erytrocytach, krążących w całym organizmie i mających kontakt ze wszystkimi jego komórkami. Określanie adduktów z białkami, a zwłaszcza hemoglobina to dobry sposób monitorowania narażenia na związki genotoksyczne *in vivo*. Addukty z Hb są trwałymi produktami reakcji ze związkami elektrofilowymi, przez co ich analiza umożliwia ocenę narażenia na związki toksyczne. Jednocześnie dane literaturowe wskazują na proporcjonalność powstawania adduktów związków elektrofilowych z DNA lub hemoglobina [30] i dlatego są wykorzystywane zamiast adduktów DNA dla różnych klas substancji elektrofilowych [51,54].

Związki te bezpośrednio lub po aktywacji metabolicznej mogą reagować z resztami aminokwasów hemoglobiny, takimi jak grupy tiolowe, aminowe, karboksylowe i hydroksylowe [34].

Do oznaczeń adduktów hemoglobiny jest konieczne ich wyizolowanie z erytrocytów, a także derywatywacja (tj. przekształcenie w odpowiednie pochodne umożliwiające

ce oznaczenia analityczne). Analizy przeprowadza się za pomocą chromatografii gazowej i spektrofotometrii masowej. Pomiar zawartości adduktów hemoglobiny jest dobrą metodą oznaczeń licznych ksenobiotyków, np.: akrylamidu, akrylonitrylu, buta-1,3-dieniu, 3,3'-dichlorobenzyny, tlenku etylenu i innych. Ciągłe trwają także prace mające na celu opracowanie nowych bardziej precyzyjnych metod (np. z użyciem kalpain) do oceny zmodyfikowanych przez ksenobiotyki łańcuchów białkowych hemoglobiny [36].

Addukty hemoglobiny ze związkami elektrofilowymi wydają się najbardziej przydatnymi do biologicznego monitoringu. W porównaniu z innymi biomarkerami, wykazują wiele korzystnych cech, takich jak:

- łatwość i możliwość pozyskania materiału w dużych ilościach,
- możliwości oznaczeń w długim okresie czasu ze względu na czas życia erytrocytów w krwiobiegu (około 120 dni),
- brak naprawy uszkodzeń,
- trwałość adduktów,
- dostępność metod identyfikacji chemicznej [30].

Addukty hemoglobiny określa się jako biomarkery dawki biologicznie skutecznej, a ze względu na stosunkowo długą trwałość cząsteczki hemoglobiny, brak systemów naprawczych, są wykorzystywane w monitorowaniu narażonych populacji, głównie jako biomarker narażenia skumulowanego [31].

Natomiast dyskusyjnym jest oznaczanie poziomu adduktów Hb w narażeniu na wysokie dawki związków toksycznych w krótkim czasie. Badania Johansona i wsp. wykazały u 4 ochotników bardzo niski poziom adduktów styrenu z Hb po dwugodzinnej inhalacji parami styrenu o stężeniu 50 ppm [25].

Istotne zastosowanie mają addukty, jako pośrednie wskaźniki między ekspozycją a skutkiem. Hagmar i wsp. oznaczyli poziom adduktów akrylamidu z Hb u 210 pracowników narażonych na środek chemiczny do spoinowania zawierający akrylamid i N-metyloakryloamid [18]. 47 pracowników miało poziom w prawidłowym zakresie (0,02-0,07 nmol/g globiny), natomiast pozostałe 163 osoby w podwyższonym aż do maksymalnego (17,7 nmol/g globiny). Na podstawie oceny uszkodzeń układu nerwowego (u 50 pracowników) objawiających się mrowieniem i drętwieniem rąk i stóp oraz skorelowaniem tych objawów z poziomem adduktów autorzy wykazali zależność skutku od dawki.

Badania Mayer i wsp. wskazują natomiast na korelację między poziomem adduktów hemoglobiny (markery efektu biologicznego) [30] a markerami odpowiedzi genetycznej [34]. Autorzy wykazali u osób palących liniową korelację między poziomem adduktów tlenku epoksydu z Hb a zaburzeniami w wymianie chromatyd siostrzanych. Zmiany dotyczą głównie stosunku liczby komórek o dużej częstotliwości wymian chromatyd siostrzanych (SCE_{HFC}) do średniej liczby wymian chromatyd na komórkę (SCE) (34).

Pomiar zawartości adduktów hemoglobiny jest metodą oceny narażenia na liczne ksenobiotyki występujące w dymie papierosowym, skażające środowisko naturalne, występujące w środowisku pracy lub powstające w procesach technologicznych przetwarzania produktów spożywczych. Ze względu na główne źródło pochodzenia związku tworzącego addukt z Hb wyróżnia się kilka grup adduktów, przy czym podział ten jest umowny, gdyż wiele związków ma kilka źródeł pochodzenia, np. tlenek etylenu czy akrylamid:

1. Addukty hemoglobiny z niektórymi substancjami obecnymi w dymie tytoniowym: aminy aromatyczne w tym 4-aminobifenyl i wielocykliczne węglowodory aromatyczne np. benzo(α)piren, ale także tlenek etylenu.
2. Addukty hemoglobiny z wybranymi substancjami stosowanymi w dużej ilości w przemyśle: tlenek etylenu; naftalen i jego pochodne diizocyjaniany oraz glicidol.
3. Addukty hemoglobiny z substancjami powstającymi powszechnie przy przetwarzaniu żywności np. akrylamidem, ale też glicidolem.
4. Addukty hemoglobiny z metabolitami estrogenów 2,3- oraz 3,4-chinonem 17- β estradiolu, powstającymi w nadmiarze m.in. w wyniku skażenia środowiska ksenobiotykami, takimi jak: 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorofenyl)etan (DDT) czy dioksyny.
5. Addukty hemoglobiny z dialdehydem malonowym produktem uszkodzeń oksydacyjnych w komórkach.

ADDUKTY HEMOGLOBINY Z SUBSTANCJAMI OBECNYMI W DYMIE TYTONIOWYM

Dym tytoniowy składa się z ponad 4 000 substancji chemicznych, z których większość zaliczono do związków toksycznych. Wśród kancerogenów dymu tytoniowego wymienia się: wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, aromatyczne związki azowe, N-nitrozoaminy, aminy aromatyczne, związki nieorganiczne i inne. Addukty związków zawartych w dymie tytoniowym z białkami i DNA są jednocześnie biomarkerami ekspozycji i biomarkerami skutku. Do najczęściej oznaczanych adduktów należą połączenia 4-aminobifenylu z hemoglobina i benzo(α)pirenu z DNA oraz z albuminami krwi [13].

Addukty z aminami aromatycznymi

Wśród amin aromatycznych występujących w dymie tytoniowym na szczególną uwagę zasługują: 4-aminobifenyl, 2-naftyloamina, o-toluidyna, a także 2,6-dimetyloanilina.

Dwie pierwsze są uznanym czynnikiem ryzyka w rozwoju nowotworów złośliwych pęcherza moczowego u ludzi, a o-toluidyna i 2,6-dimetyloanilina prawdopodobnie indukują rozwój raka pęcherza moczowego. Uważa się, że większość aryloamin jest substancjami prokancerogennymi, które do uzyskania toksycznych właściwości wymagają aktywacji metabolicznej, która przebiega w wyniku N-acetylacji, N-hydroksylacji i tworzenia adduktów DNA z produktami metabolicznego rozpadu w nabłonku pęcherza moczowego [12,46]. Stwierdzono, że O-acety-

lowanie grupy hydroksylowej N-fenylohydroksyloaminy powoduje powstanie N-acetoksyaryloaminy, która może tworzyć bardzo reaktywny kation nitrenu (aminylen), ostateczny metabolit odpowiedzialny za tworzenie adduktów z DNA [33]. Murata i Kawanishi wykazali, że N-nitrozowe i N-hydroksylowe postaci aryloamin mogą wywoływać uszkodzenie DNA, w tym powstawanie 7,8-dihydro-8-okso-2'-deoksyguanozyny, za pośrednictwem tworzenia się reaktywnych form tlenu [33]. Nitrozowe i N-hydroksylowe pochodne rakotwórczych aryloamin mogą się przyczyniać do procesu rakotwórczego przez tworzenie H_2O_2 .

Do najczęściej oznaczanych adduktów z ksenobiotykami obecnymi w dymie tytoniowym należą połączenia 4-aminobifenylu z hemoglobina. Pozwalają na ocenę narażenia na dym tytoniowy w czasie około 4 miesięcy. Addukty 4-aminobifenylu z hemoglobina występują także u biernych palaczy i mogą stanowić 10-20% stężenia tego adduktu oznaczanego u aktywnych palaczy [35].

Obecność adduktów z 4-aminobifenylem we krwi palaczy zależy również od rodzaju palonego tytoniu. Dym tytoniowy z ciemnego tytoniu zawiera więcej amin aromatycznych niż dym z tytoniu Virginia lub mieszanego. Hoffmann i wsp. stwierdzali większe ryzyko zachorowania na nowotwory złośliwe pęcherza moczowego wśród palaczy papierosów z tytoniu ciemnego w porównaniu z palaczami tytoniu Virginia lub mieszanego [20].

Tao i wsp. oznaczyli we krwi 1183 osób zamieszkujących w Szanghaju poziom adduktów hemoglobiny z 4-aminobifenylem i 2,6-dimetyloanilina i ocenili związek między jego wielkością a występowaniem raka pęcherza moczowego [46]. W swoich analizach uwzględnili wpływ palenia (u badanych osób) na powstawanie adduktów i występowanie nowotworu. Badaniami objęto 581 pacjentów z rakiem pęcherza oraz 602 osoby zdrowe. Stwierdzono, że poziom adduktów hemoglobiny z 4-aminobifenylem i 2,6-dimetyloanilina był znacząco wyższy u pacjentów i można go było wiązać z ryzykiem wystąpienia raka pęcherza moczowego. Zależność dotyczyła osób niepalących, u których 4-aminobifenyl i 2,6-dimetyloanilin nie pochodziły z dymu tytoniowego.

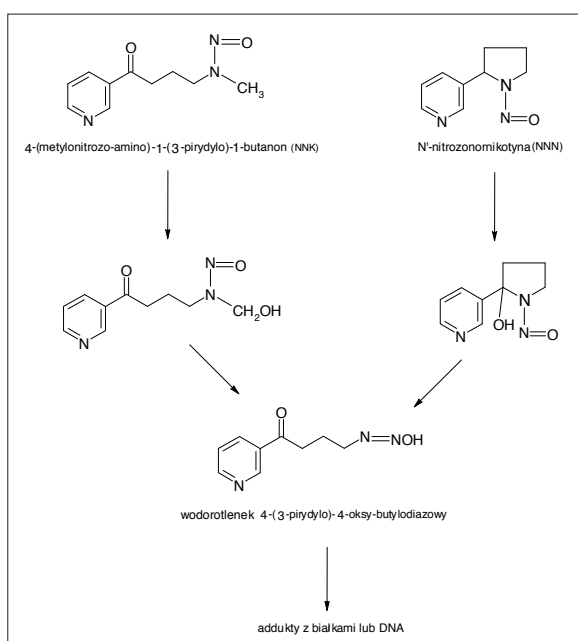
AROMATYCZNE AMINY HETEROCYKLICZNE

W kondensacie dymu tytoniowego są obecne aminy aromatyczne, które przyczynowo wiążą się z nowotworami złośliwymi pęcherza moczowego. Wśród zidentyfikowanych w dymie tytoniowym N-nitrozoamin szczególnie toksyczne są dwie pochodne, tj. N-nitrozonornikotyna (NNN) i 4-(metylonitrozoamino)-1-(3-pirydylo)-1-butanon (NNK) [19].

W pierwszym etapie przemian w wyniku enzymatycznej α -hydroksylacji powstają nietrwałe α -hydroksynitrozoaminy, które następnie ulegają rozpadowi do dwuazowych wodorotlenków, aldehydów i ketonów. Zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo* wyka-

zono, iż NNK w wyniku pirydyloksybutylacji i metylacji tworzy addukty z DNA.

Metaboliczna aktywacja 4-(metylonitrozoamino)-1-(3-pirydylo)-1-butanonu (NNK) powoduje powstawanie wodorotlenku 4-(3-pirydylo)-4-oksobutylo-diazowego. Ten sam związek tworzy się także w wyniku α -hydroksylacji N-nitrozonornikotyny (NNN). Hydroksylowanie węgla sąsiadującego z azotem nitrozowym (C-hydroksylacja) jest głównym szlakiem wytwarzania adduktów z DNA i z białkami [12]. Wodorotlenek 4-(3-pirydylo)-4-oksobutylo-diazowy (ryc. 1) łączy się bezpośrednio do białek i DNA, a następnie w wyniku kwaśnej hydrolizy (addukty z DNA) lub zasadowej (addukty z białkami) w układzie *in vitro* przekształca się do (4-hydroxy-1-(3-pirydylo)-1-butanonu (HPB).



Ryc. 1. Tworzenie adduktów z hemoglobina i DNA przez metabolit N-nitrozoamin, tj. N-nitrozonornikotyny (NNN) oraz 4-(metylonitrozoamino)-1-(3-pirydylo)-1-butanonu (NNK) (wg [19])

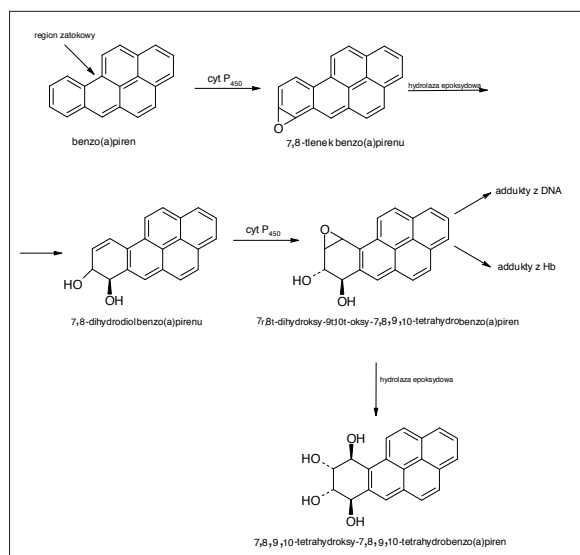
W badaniach przeprowadzonych przez Hechta i wsp. wykazano u około 22% palaczy (n = 101) podwyższony poziom uwolnionego z adduktów z hemoglobina 4-hydroxy-1-(3-pirydylo)-1-butanonu (HPB) (zakres 200-1600 fmole/g Hb) [19]. Poziom HPB u osób niepalących był zwykle poniżej granicy wykrywalności.

WIELOCYKLICZNE WĘGLOWODORY AROMATYCZNE

Wielocykliczne węglowodory aromatyczne (WWA) stanowią liczną grupę związków zawierających od dwóch do kilku, a nawet kilkunastu pierścieni aromatycznych w cząsteczce. Silnie rakotwórczymi przedstawicielami tej grupy są najszerzej zbadane benzo(α)piren oraz benzo(α)antracen. WWA tworzą się w wyniku spalania materii organicznej przy ograniczonym dostępie tlenu. Występują w znacznej ilości w dymie tytoniowym, w produktach

grilowanych lub w atmosferze zakładów przemysłowych, bowiem powstają jako produkt uboczny w niektórych procesach technologicznych. Jak wynika z badań ponad 10 tys. pracowników rocznie jest w Polsce narażonych na związki chemiczne z grupy WWA (benzo(α)piren, dibenzo(*a,h*)antracen, benzo(α)antracen, benzo(*b*)fluoranten, benzo(*k*)fluoranten, chryzen) oraz benzen [27].

Wielocykliczne węglowodory aromatyczne są metabolizowane przez mikrosomalne enzymy cytochromu P450 do związków mogących tworzyć trwałe połączenia z DNA (np. epoksydów), co może doprowadzić do powstawania nowotworów. Epoksydacja benzo(α)pirenu przez cytochrom P450 w pozycji 7,8 prowadzi do powstania toksycznego metabolitu, a w pozycji 4,5 do nieaktywnego metabolitu wydalanego z organizmu. Aktywacja metaboliczna wielopierścieniowych węglodorów aromatycznych u ludzi indukuje powstanie adduktów z DNA z metabolitami benzo(α)pirenu obecnych w płucach ludzi i białych krwinkach [34]. Podobne addukty mogą być tworzone z białkami w tym i hemoglobina. Istotną rolę w neutralizacji epoksydów odgrywa hydrolaza epoksydowa, która przekształca epoksydy w nietoksyczne diole (ryc. 2).

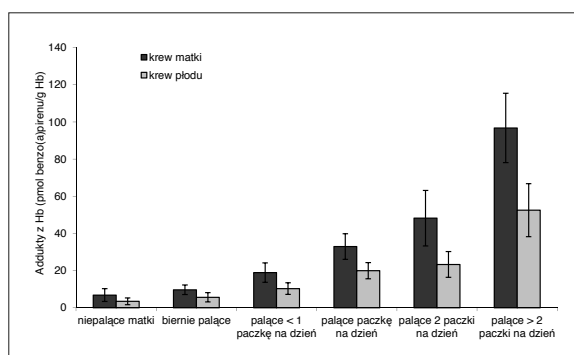


Ryc. 2. Jeden ze szlaków metabolicznych benzo(a)pirenu prowadzący do powstania najbardziej rakotwórczego metabolitu 7*r*,8*t*-dihydroksy-9*t*,10*t*-oksy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo(a)pirenu (wg [14,51])

Scherer i wsp. oznaczyli poziom adduktów benzo(α)pirenu z hemoglobina u osób narażonych w różnym stopniu na dym tytoniowy [41]. Oznaczony poziom adduktów był równy 0,105±0,020 fmol/mg Hb u osób palących (27 osób) i 0,068±0,014 fmol/mg Hb u osób niepalących (42 osoby). Autorzy sugerują, że dieta i palenie są głównymi źródłami narażenia na WWA osób nienarażonych zawodowo na te związki. Natomiast wpływ środowiskowego dymu tytoniowego (ETS) na poziom adduktów benzo(α)pirenu z Hb jest znikomy.

Myers i Pinorini oszacowali wpływ dymu tytoniowego na poziom adduktów Hb z benzo(α)pirenem u matek i ich

plodów [34]. Stwierdzili korelację między wzrostem poziomu tych adduktów we krwi matek i ich plodów a liczbą wypalanych papierosów (ryc. 3).



Ryc. 3. Poziom adduktów hemoglobiny z benzo(a)pirenem oznaczonych w próbkach krwi matek i ich plodów (wg [34])

ADDUKTY POWSTAJĄCE Z SUBSTANCJAMI STOSOWANYMI NA DUŻĄ SKALĘ W PRZEMYSŁE

Tlenek etylenu

Tlenek etylenu (epoksyetan) ma szerokie zastosowanie do gazowej sterylizacji sprzętu medycznego, głównie jednorazowego użytku, przypraw spożywczych, środków farmaceutycznych. Stosowany jest także jako środek bakterio- i grzybobójczy (np. w konserwacji książek), a także wykorzystywany w produkcji glikolu etylenowego, trietanoloaminy oraz do syntezy polieteru. Tlenek etylenu zaklasyfikowano jako związek: „rakotwórczy kategorii 2”, „mutagenny kategorii 2.” i „Ft” – substancja działająca toksycznie na płód oraz „I” – substancja o działaniu drażniącym [43].

Tlenek etylenu jest związkiem, na który narażonych jest wiele grup zawodowych. Jak wykazały badania przeprowadzone w latach 2008–2010, na tlenek etylenu byli narażeni pracownicy ponad 200 zakładów pracy, w tym 1000 lub więcej kobiet w skali kraju [27].

Źródłem tlenu etylenu jest również dym tytoniowy, który zawiera znaczne ilości etylenu (150–250 µg/papieros) oraz śladowe ilości jego metabolitu tlenu etylenu – około 0,02 µg/papieros. Badacze szwedzcy przypuszczają, że prawdopodobnie aż 15% przypadków raka płuca u palaczy można wyjaśnić endogennym tworzeniem tlenu etylenu z wdychanego z dymem etylenu [12]).

Wystawienie na działanie tlenu etylenu w wyniku narażenia zawodowego, jak i w wyniku narażenia na dym tytoniowy powoduje powstanie adduktów hydroksyetylowych z hemoglobina. Zdarza się to w wyniku reakcji z N-terminalną grupą aminową (waliną), z azotem imidazolu histydyny i grupą sulfhydrylową cysteiny β 93. Walker i wsp. przeprowadzili eksperymenty, w których wykazali, że wraz z czasem narażenia na tlenek etylenu wzrasta liczba adduktów N-(2-hydroksyety-

lo)-waliny (HOEtVal) z hemoglobina aż do osiągnięcia plateau [55].

Bono i wsp. zbadali korelację między poziomem dwóch markerów, tzn. adduktu hemoglobiny HOEtVal we krwi oraz kotyniny (metabolitu nikotyny) w moczu [3]. Badania przeprowadzono u 100 dzieci w wieku 3-13 lat, które były narażone bądź nie na środowiskowy dym tytoniowy (ETS) (w tym szczególnie na tlenek etylenu). Wykazano korelację między poziomem adduktów HOEtVal we krwi (nieswoistego biologicznego markera dawki skutecznej), a obecnością kotyniny w moczu (markera swoistego wewnętrznej dawkowania) podczas biernej ekspozycji na dym tytoniowy. Stwierdzili, że u dzieci niepoddanych działaniu ETS, żyjących w mieście, poziom adduktów HOEtVal wyniósł 2,64 pmol/g Hb (a stężenie kotyniny w moczu - 13,69 ng/ml), natomiast u narażonych na dym tytoniowy wyniósł aż 10,78 pmol/g Hb (stężenie kotyniny odpowiednio 22,49 ng/ml).

Addukty hemoglobiny z 2,3-epoxy-1-propanolem

Glicydol (2,3-epoxy-1-propanol) jest półproduktem stosowanym w syntezie wielu związków aktywnych biologicznie mających zastosowanie w medycynie, kosmetologii i chemii gospodarczej. Jest półproduktem w syntezie środków powierzchniowo czynnych, które wchodzi w skład preparatów kosmetycznych do nawilżania i oczyszczania skóry, także do produkcji detergentów i środków dezynfekujących. Glicydol stosuje się do wytwarzania plastyfikatorów, barwników do tkanin, związków fotochemicznych, kauczków, lakierów i tworzyw sztucznych. Stosuje się go również w syntezie wielu związków biologicznie aktywnych w tym leków przeciwwirusowych i przeciwbólowych [11].

Glicydol jest związkiem bardzo reaktywnym o charakterze elektrofilowym, a więc zdolnym do reagowania z biocząsteczkami, takimi jak DNA czy białka. Został sklasyfikowany przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (IARC) jako "prawdopodobnie rakotwórczy dla ludzi" (grupa 2A). Istnieje wiele dowodów o jego rakotwórczości dla zwierząt (głównie myszy i szczurów) brak jest natomiast badań epidemiologicznych w pełni potwierdzających jego rakotwórcze działanie na ludzi [15].

Glicydol może tworzyć addukt z waliną hemoglobiny o nazwie N-(2,3-dihydroksy-propylo)-walina Hb (diHOPrVal). Honda i wsp. zbadali przydatność adduktów Hb z glicydołem do oceny narażenia na ten związek analizując na szczurach kinetykę tworzenia adduktów diHOPrVal i ich eliminację [21]. Zastosowano glicydol w dawkach 0-75 mg/kg masy ciała. Poziom adduktów był mierzony po 24 godzinach od podania związku. Autorzy obserwowali zależność tworzenia adduktów z Hb od dawki glicydolu w układzie *in vivo*. Następnie autorzy w doświadczeniach *in vitro* na krwi pełnej szczurów oraz ludzi zmierzili stałą szybkości drugiego rzędu (K_{val}) dla reakcji glicydolu z N-końcową waliną w Hb. Stwierdzili, że wartość K_{val} wynio-

śla odpowiednio dla szczurów $6,7 \pm 1,1$ oraz $5,6 \pm 1,3$ pmol/g białka Hb na μMxh dla ludzi, co wskazywało na brak różnic między badanymi gatunkami. Honda i wsp. sugerują, że oznaczanie adduktów diHOPrVal jako biomarkerów ekspozycji glicydolu można stosować do ilościowej oceny, jak i do oceny ryzyka narażenia ludzi na ten związek. Ponadto stwierdzili, że reaktywność Hb z glicydołem jest porównywalna z reaktywnością Hb z innymi związkami elektrofilowymi, takimi jak akrylamid czy jego metabolit glicydamid [23].

Interesujące były również badania dotyczące analizy adduktów z glicydołem powstających przy spożywaniu artykułów spożywczych. DAG jest unikalnym olejem jadalnym, który zawiera diacyloglicerol w stężeniu 80% lub większym. W ostatnich latach wykazano, że zapobiega gromadzeniu się tkanki tłuszczowej. Związek ten wprowadzono jako środek spożywczy do obrotu w Japonii. Jednak w marcu 2009 r. Federalny Instytut Oceny Ryzyka w Niemczech (Federal Institute for Risk Assessment) wyraził obawy dotyczące bezpieczeństwa stosowania estrów kwasów tłuszczowych glicerolu obecnych w rafinowanych olejach jadalnych. Zastrzeżenia wynikały z możliwości uwalniania się z nich podczas trawienia rakotwórczego dla zwierząt glicydolu [1].

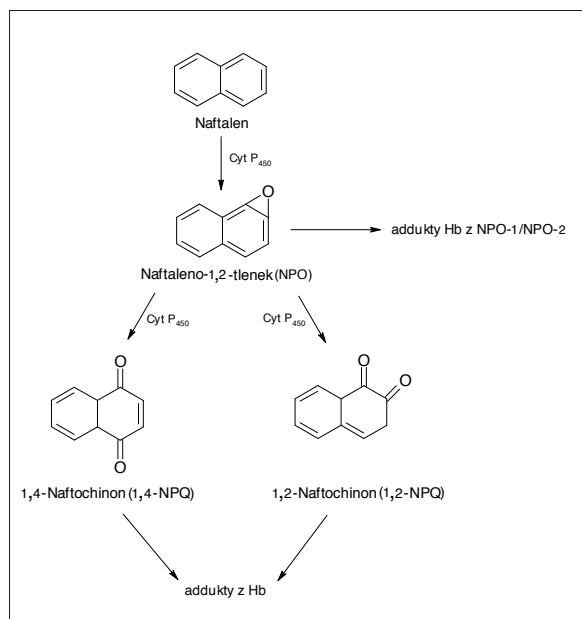
W związku z tym Honda i wsp. ocenili poziom adduktów z glicydołem u osób spożywających ten olej [22]. Próbkę krwi pobrano od 6 osób niespożywających oleju DAG i od 7 jego konsumentów. Stwierdzono obecność adduktów glicydolu z Hb (diHOPrVal) we wszystkich próbkach na porównywalnym poziomie. Autorzy sugerują, że spożycie tego oleju nie podwyższa poziom adduktów glicydolu z Hb. Badania Honda i wsp. prowadzone na liczniejszych grupach konsumentów również potwierdziły bezpieczeństwo stosowania oleju DAG w tym zakresie [21]. Średnie poziomy diHOPrVal u 7 konsumentów wynosiły odpowiednio 6,9 pmol/g globiny, a w grupie kontrolnej liczącej 42 osoby 7,3 pmol/g globiny. W drugim eksperymencie porównano poziomy adduktu u 12 konsumentów przed i po stosowaniu oleju DAG. W badaniu tym także nie wykazano żadnej znaczącej zmiany w poziomach diHOPrVal. Średni poziom diHOPrVal wyniósł $7,1 \pm 3,1$ pmol/g globiny dla konsumentów olejów DAG i $7,5 \pm 1,4$ pmol/g globiny dla grupy kontrolnej.

Addukty hemoglobiny z naftalenem

Naftalen jest stosowany jako surowiec i półprodukt w przemyśle chemicznym, w produkcji tworzyw sztucznych i barwników, a także jako środek odstraszający mole, odświeżający powietrze i środek czynny powierzchniowo. Wykorzystuje się go także w procesach produkcji insektycydów, fungicydów, lakierów, pokostów oraz do zabezpieczania drewna. Jest składnikiem dymu papierosowego, a także ubocznym produktem niepełnego spalania, co sprawia że powszechnie występuje w otoczeniu człowieka. Pracownicy są narażeni na duże stężenia naftalenu przy produkcji skóry syntetycznej, środków garbarskich, żywic, barwników, środków powierzchni-

wo czynnych. Ostre narażenie człowieka na naftalen jest związane z powstaniem zaćmy, niedokrwistości hemolitycznej i toksycznym działaniem na płuca [54]. Właściwości hemolityczne przypisuje się 1- i 2-naftolom oraz 1,2-naftochinonowi, natomiast zdolność wywoływania zaćmy – 1,2-naftochinonowi. Działanie toksyczne na płuca jest związane z powstawaniem glutationowych adduktów 1,2-tlenku naftalenu i tym samym zmniejszaniem puli wolnego glutationu zredukowanego [43]. Naftalen to substancja rakotwórcza kategorii 3, z przypisanym zwrotem określającym zagrożenie „ograniczone dowody działania rakotwórczego (R40)” [43].

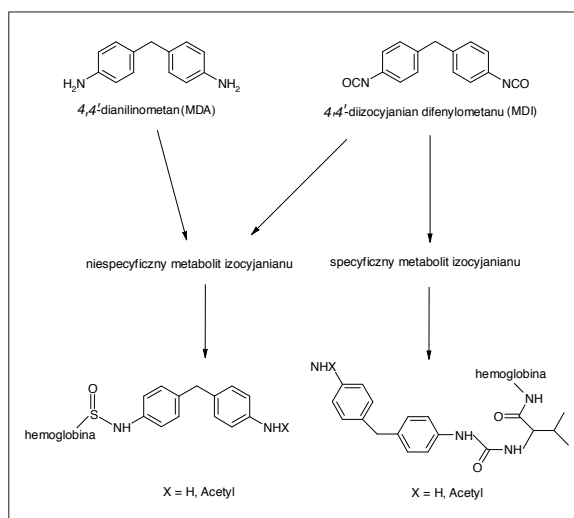
Waidyanatha i Rappaport zbadali powstawanie białkowych adduktów u myszy Swiss Webster, którym podawano dootrzewnowo naftalen w dawkach 1,56-200 mg/kg m.c. [54]. Naftalen jest metabolizowany przez monooksygenazy do naftaleno-1,2-tlenku (NPO), a ta pochodna jest przekształcana dalej do 2 reaktywnych metabolitów 1,2-naftochinonu (1,2-NPQ) oraz 1,4-naftochinonu (1,4-NPQ) (ryc. 4). Wykazano obecność 2 adduktów Hb z NPO w zależności od wiązania przez siarkę hemoglobiny do pozycji 1 w pierścieniu naftalenowym (NPO-1) lub w pozycji 2 (NPO-2), a także addukty z metabolitami naftaleno-1,2-tlenku, tj. 1,2-NPQ i 1,4-NPQ. Największą zawartość adduktów stwierdzono po podaniu myszom 200 mg/kg i przyjmowały one odpowiednio wartości: $5,14 \pm 1,66$ (NPO-1); $4,43 \pm 1,32$ (NPO-2); $2,22 \pm 0,35$ (1,2-NPQ) oraz $2,03 \pm 0,16$ (1,4-NPQ). Zawartość adduktów wzrastała wraz z dawką podanego naftalenu w przypadku pochodnych NPO-1 i NPO-2 oraz 1,4-NPQ (choć w mniejszym stopniu), natomiast poziom adduktów z 1,2-NPQ nie zmieniał się z dawką.



Ryc. 4. Toksyczność naftalenu. Powstawanie białkowych adduktów u myszy Swiss Webster z reaktywnymi metabolitami naftalenu: 1,2-epoksynaftalenu (NPO-1 i NPO-2) oraz jego pochodnymi 1,2-naftochinonem (1,2-NPQ) oraz 1,4-naftochinonem (1,4-NPQ) (wg [54])

Addukty hemoglobiny z diizocyjanianami

Diizocyjaniany należą do grupy silnie elektrofilnych związków chemicznych wykorzystywanych do produkcji poliuretanów. W przemyśle powszechnie stosuje się: diizocyjanian toluenu (TDI), 4,4'-diizocyjanian difenylometanu (MDI) i diizocyjanian heksano-1,6-diyłu (HDI), natomiast rzadziej diizocyjanian naftalenu (NDI) i diizocyjanian izoforonu (IPDI) (ryc. 5).



Ryc. 5. Addukty hemoglobiny z 4,4'-dianilinometanem (MDA) i 4,4'-diizocyjanianem difenylometanu (MDI) (wg [16])

Narażenie na diizocyjaniany jest jedną z najczęstszych przyczyn astmy zawodowej, której częstość w krajach rozwiniętych szacuje się 5-15% u osób dorosłych. Narażenie na te związki chemiczne dotyczy osób zatrudnionych przy produkcji pianki poliuretanowej, plastikowych opakowań, laminatów i farb poliuretanowych [45].

MDI, a także jego analog 4,4'-dianilinometan (MDA), reagują z białkami czy też tiolami niskocząsteczkowymi, np. z glutationem [40], bezpośrednio lub po enzymatycznej aktywacji. Ponadto oba związki wykazują działanie cytotoksyczne, a MDA może mieć wpływ genotoksyczny [2]. Niektóre badania wykazały, że addukty MDA lub jego metabolitu *N*-acetylo-4,4'-metylenodianiliny (AcMDA) nie są swoistymi markerami narażenia na MDI [40], ponieważ nie jest możliwe rozróżnienie ekspozycji na MDA i niezależnie tylko na MDI.

Natomiast Gries i Leng opracowali metodę chromatograficznej detekcji adduktu 5-izopropyl-3-[4-(4-aminobenzyl)-fenylo]hydantoiny (ABP-hyd-Val) we krwi ludzkiej, który można uznać jako swoisty biomarker narażenia na MDI [16]. Autorzy ci sugerują, że metodę można stosować do oceny narażenia na MDI od niskich stężeń (próg oznaczenia - 10 ng ABP-hyd-Val/g białka hemoglobiny). Swoisty addukt hemoglobiny (ABP-hyd-Val) z izocyjanianem tworzy się w wyniku karbamylowania przez izocyjanian NH_2 -terminalnej waliny łańcuchów globiny α i β w hemoglobinie.

ADDUKTY HEMOGLOBINY Z AKRYLAMIDEM STOSOWANYM W PRZEMYSŁE I POWSTAJĄCYM PRZY PRODUKCJI ŻYWNOSCI

Akrylamid, znany również jako 2-propenamid (według IU-PAC) lub amid kwasu akrylowego, jest związkiem organicznym stosowanym w przemyśle głównie do produkcji poliakrylamidu używanego w elektroforezie, w laboratoriach biotechnologicznych, do uzdatniania wody pitnej oraz oczyszczania ścieków. Innym ważnym zastosowaniem tego związku jest stabilizacja gruntów rolnych. Akrylamid w postaci spolimeryzowanej występuje także w kosmetykach (np.: kremach, balsamach do ciała, szamponach) oraz jako dodatek do opakowań na żywność, takich jak papier i tektury. Akrylamid występuje również w tytoniu [37,58].

W 1994 r. akrylamid został sklasyfikowany przez Międzynarodową Agencję do Badań nad Rakiem, jako związek prawdopodobnie rakotwórczy dla ludzi, na podstawie badań przeprowadzonych na myszach i szczurach [47]. Według systemu klasyfikacji Unii Europejskiej akrylamid występuje w drugiej kategorii jako prawdopodobnie rakotwórczy i mutagenny oraz w trzeciej, jako substancja, która może powodować upośledzenie płodności [6].

Początkowo uważano, że źródłem akrylamidu w żywności jest poliakrylamid dodawany do nawozów sztucznych w celu stabilizacji gleb. Jednak nie przypuszczano, że jego źródłem w ludzkich organizmach może być także sama żywność [58].

W 2002 r. znacznie wzrosło zainteresowanie akrylamidem ze względu na badania szwedzkich naukowców donoszących, że stosunkowo duża ilość akrylamidu jest generowana podczas smażenia oraz pieczenia różnorodnych pokarmów, w tym głównie ziemniaków, produktów zbożowych oraz kawy w temperaturach powyżej 120°C. Od tego czasu rozpoczęto intensywne badania, których celem jest zmniejszenie zawartości tego związku w żywności [38]. Badania epidemiologiczne prowadzone na dużą skalę w ciągu ostatnich lat nie dostarczyły na razie niepodważalnych dowodów, że akrylamid przyjmowany z diety może inicjować powstawanie nowotworów u ludzi.

Rakotwórczość akrylamidu (stwierdzona w badaniach na zwierzętach) wynika z jego zdolności do kowalencyjnej modyfikacji materiału genetycznego po uprzednim zmetabolizowaniu do glicydamid, który ma zdolność tworzenia adduktów z DNA.

ADDUKTY HEMOGLOBINY Z AKRYLAMIDEM

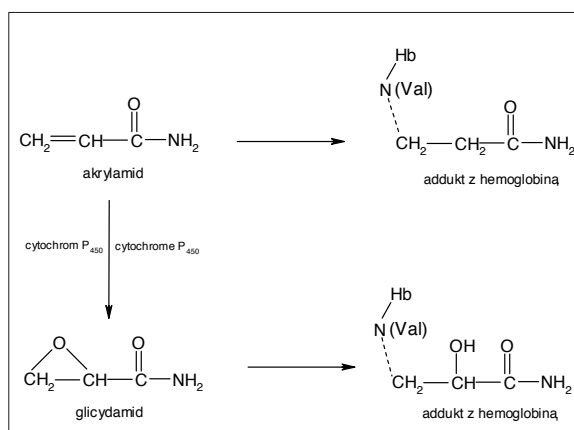
Bardzo trudno jest ocenić narażenie człowieka na działanie akrylamidu ze względu na liczne źródła tego związku, tj. występowanie akrylamidu w różnej ilości w zróżnicowanej diecie człowieka czy ekspozycję na tę substancję ze źródeł, takich jak dym tytoniowy oraz przez narażenie zawodowe.

Ocena ekspozycji na ten związek odbywa się na podstawie analizy stężenia biomarkerów, takich jak addukty akryla-

midu lub jego metabolitu glicydamid z DNA lub hemoglobina [47] powstających w wyniku reakcji akrylamidu i glicydamidu z nukleofilowym miejscem tych makrocząsteczek. Obecność adduktów z akrylamidem pozwala na określenie współczynnika przekształcenia akrylamidu do glicydamidu, porównanie wpływu różnych jego dawek oraz ocenę wielkości dawki, przy której występują efekty niepożądane [10,37].

Addukty tworzone z DNA wykorzystuje się głównie do oceny genotoksyczności akrylamidu, a obecność adduktów z hemoglobina do oceny działania neurotoksycznego i nowotworowego tej substancji. Wiadomo, że długotrwały kontakt z akrylamidem może być przyczyną uszkodzenia zakończeń nerwowych w ośrodkowym i obwodowym układzie nerwowym. Skutkiem takiego uszkodzenia mogą być zaburzenia neurologiczne i motoryczne, takie jak osłabienie, mrowienie i drętwienie kończyn, drgawki, a także ataksja [37]. Takie objawy obserwował Hagmar i wsp. u pracowników zawierających podwyższony poziom adduktów z akrylamidem [18].

Ponadto addukty powstałe w wyniku połączenia akrylamidu z hemoglobina są obecne we krwi u ludzi przez ok. 120 dni, u szczurów – 60 dni, zaś u myszy – 40 dni, co wiąże się z czasem życia krwinek czerwonych u tych gatunków [53]. Zarówno addukty akrylamidu, jak i jego metabolitu – glicydamid – z hemoglobina lub DNA są stabilne [47]. W przypadku hemoglobiny są tworzone od końca N-terminalnego peptydu, na którym znajduje się wolna grupa aminowa, pochodząca od waliny (ryc. 6) [48].



Ryc. 6. Addukty hemoglobiny z akrylamidem i glicydamidem [wg [48]]

Poziom adduktów hemoglobiny tworzonych z akrylamidem i jego metabolitem glicydamidem jest proporcjonalny do dawki ksenobiotyku oddziałującej na organizm [52]. Szczególnie wśród pracowników narażonych zawodowo na akrylamid stwierdza się podwyższone stężenie adduktów akrylamidu (15–1884 pmol/g) i adduktów glicydamidu (17,8–1376 pmol/g) z hemoglobina (w porównaniu z grupami nienarażonymi zawodowo) [32].

Wzrost stężenia adduktów obserwuje się u osób, które spożywały produkty spożywcze zawierające toksyczny

akrylamid. Produkty bogate w akrylamid to: chipsy, frytki ziemniaczane, kawa, chleb pełnoziarnisty, pieczywo chrupkie, krakersy, płatki śniadaniowe. Przeprowadzono badania, których celem było sprawdzenie czy akrylamid spożywany z produktami spożywczymi wykazuje działanie rakotwórcze. Badania wykazały zależność występowania adduktów akrylamidu i glicydamid z hemoglobina u ludzi (szczególnie u palaczy) konsumujących produkty „bogate” w akrylamid. Nie potwierdzono natomiast, aby środowiskowe i zawodowe narażenie na ten związek miało wpływ na proces nowotworzenia u ludzi [37,53].

Brisson i wsp. zbadali poziom adduktów akrylamidu z hemoglobina u 195 niepalących nastolatków w wieku 10-17 lat mieszkających w Montrealu w Kanadzie [4]. Zawartość adduktów hemoglobiny z akrylamidem i glicydamidem była odpowiednio 45,4 i 45,6 pmol/g globiny. Stwierdzony poziom adduktów z hemoglobina był wyższy niż wartość ustalona na podstawie badań biomonitoringowych, co może sugerować potrzebę zmniejszenia (ograniczenia) narażenia tej populacji na akrylamid.

Xie i wsp. niedawno przeanalizowali związek między obecnością adduktów hemoglobiny z akrylamidem i glicydamidem a ryzykiem wystąpienia raka jajnika u kobiet [56]. Badania były prowadzone u 263 pacjentek ze zdiagnozowanym nowotworem i u 515 kobiet zdrowych. W ocenie korelacji brano ponadto pod uwagę wiele innych czynników, takich jak zażywanie doustnych środków antykoncepcyjnych, wskaźnik masy ciała, spożywanie alkoholu, palenie tytoniu, aktywność fizyczną, a także spożycie kofeiny. Naukowcy stwierdzili, że brak jest korelacji między poziomem akrylamidu a ryzykiem wystąpienia raka jajnika.

ADDUKTY HEMOGLOBINY Z METABOLITAMI ESTROGENÓW

Addukty z 2,3- oraz 3,4-chinonem 17-β estradiolu

Nowotwór piersi dotyka średnio jedną na dziesięć kobiet i jest jedną z głównych przyczyn zgonów wśród kobiet w wieku 40-50 lat w krajach rozwiniętych. Światowa Organizacja Zdrowia (World Health Organization) wymienia estrogeny jako jeden z ważniejszych czynników sprzyjających rozwojowi nowotworów piersi. Estrogeny mogą nie tylko promować rozwój nowotworów przez stymulację proliferacji, zmiany różnicowania komórek i ekspresji genów, ale także inicjować proces kancerogenezy za pośrednictwem reaktywnych metabolitów [28].

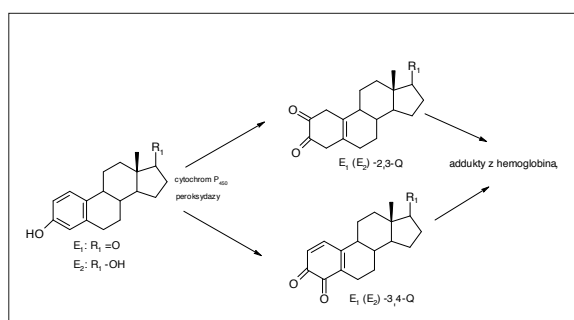
Estrogeny w wyniku aktywacji metabolicznej tworzą liczne metabolity powodujące powstawanie adduktów z DNA, które mogą spowodować uszkodzenia DNA i onkogenne mutacje [7]. Zahid i wsp. wskazują, że takimi toksycznymi metabolitami estrogenów są 2,3- oraz 3,4-chinon 17-β estradiolu (E2-2,3-P i E2-3,4-Q) [57].

Chinony np. 3,4-chinon estradiolu (E2-3,4-Q) mogą się łączyć z DNA i w wyniku reakcji addycji Michaela tworzyć addukty, takie jak 4-hydroksyestradiolo-1(α,β)-7- N-gu-

anina czy 4-hydroksyestradiolo-1(α,β)-N³-adenina [27].

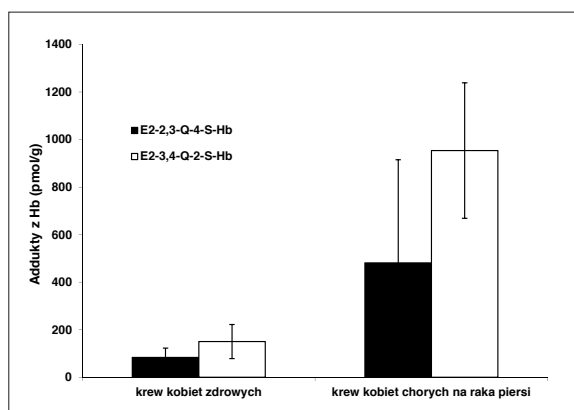
Wiele czynników (oprócz predyspozycji genetycznych) może wpływać na wytwarzanie chinonów estrogenów u ludzi, w tym także czynniki środowiskowe (polichlorowane bifenyle, wielocykliczne węglowodory aromatyczne, dioksyny i itd) [5,44].

Ostatnio Lin i wsp., stwierdzili, że addukty hemoglobiny z 2,3- oraz 3,4-chinonem 17-β estradiolu mogą być ważnym wskaźnikiem ryzyka zachorowania kobiet na raka piersi (ryc. 7) [29].



Ryc. 7. Powstawanie adduktów hemoglobiny z chinonowymi metabolitami estradiolu (wg [29])

Badania prowadzili wśród kobiet na Tajwanie, gdzie rak piersi występuje zazwyczaj w młodszym wieku niż w krajach zachodnich [8]. Badacze wykazali 6-krotny wzrost poziomu tych adduktów u 143 kobiet z Tajwanu chorych na raka piersi w porównaniu z grupą 147 kobiet zdrowych (ryc. 8). Jak sugerują autorzy różnorodność czynników środowiskowych, na które są narażeni ludzie zamieszkujący te tereny może wpływać na ekspresję genów zaangażowanych w metabolizm estrogenów. Czynniki środowiskowe mogą wpływać negatywnie na homeostazę estrogenów i zwiększać wytwarzanie chinonów estrogenów, co następnie prowadzi do generowania mutagennych uszkodzeń DNA u ludzi. Zdaniem Lin i wsp. podwyższony poziom adduktów chinonu estrogenu z białkiem hemoglobiny może być istotnym wskaźnikiem ryzyka zachorowania na raka piersi [29].



Ryc. 8. Poziom adduktów metabolitów estrogenów z hemoglobina u osób zdrowych i pacjentów z rakiem piersi (wg [29])

ADDUKTY HEMOGLOBINY Z DIALDEHYDEM MALONOWYM

Dialdehyd malonowy jest jednym z końcowych produktów procesu peroksydacji lipidów. Powstaje w błonach komórkowych na skutek prooksydacyjnego działania wielu czynników chemicznych i fizycznych. Jego podwyższone stężenie może zaburzać integralność i funkcję błon komórkowych. Proces peroksydacji lipidów wzrasta w komórkach narażonych na działanie stresu oksydacyjnego, np. w czasie infekcji, w stanach zapalnych, w procesach starzenia, chorobach neurodegeneracyjnych i nowotworowych [17].

Określenie poziomu adduktu dialdehydu malonowego z hemoglobina przy zastosowaniu chromatografii sprzężonej ze spektrofotometrem mas jest złożoną, ale jednocześnie precyzyjną i czułą metodą w analizie produktów peroksydacji lipidów. Jest to metoda bardziej dokładna niż powszechnie stosowana ocena poziomu produktów reagujących z kwasem tiobarbiturowym metodą spektrofotometryczną. Oszacowano, że u osób zdrowych zawartość adduktów dialdehydu malonowego z Hb wynosi 0,01-10 nanomoli dialdehydu na g Hb [49].

Cipierre i wsp. wykorzystując pomiar adduktów dialdehydu malonowego z hemoglobina porównali ich poziom u wcześniaków i donoszonych noworodków [9]. Zebrano

próbki krwi po urodzeniu od 60 zdrowych noworodków (29 donoszonych i 31 wcześniaków), a także w pierwszych miesiącach życia od 50 noworodków urodzonych przedwcześnie bez powikłań w rozwoju. Stężenie adduktów oznaczane tuż po urodzeniu było istotnie wyższe u wcześniaków (8,8 nanomoli/g Hb) niż u noworodków donoszonych (4,6 nanomoli/g Hb). Autorzy sugerują, że analiza adduktów może być stosowana do oceny stresu oksydacyjnego u wcześniaków.

PODSUMOWANIE

Badania poziomu adduktów z hemoglobina wielu ksenobiotyków pozwalają na ocenę narażenia na dany związek, a szczególnie określenie dawki biologicznie skutecznej. W niektórych przypadkach pozwala to oszacować zagrożenie rozwojem choroby na etapie umożliwiającym działania prewencyjne. Prawdopodobnie będzie można wykorzystywać te biomarkery dawki skumulowanej do oceny ryzyka zachorowania narażonych osób na określoną chorobę np. raka piersi, jak w przypadku narażenia na metabolity estrogenów [29]. Określenie ilościowych zależności (ekspozycja-dawka-skutek zdrowotny) poszczególnych adduktów hemoglobiny z konkretną chorobą pozwoli na realne oszacowanie ryzyka związanego z jej wystąpieniem.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Bakhiya N., Abraham K., Gurtler R., Appel K.E., Lampen A.: Toxicological assessment of 3-chloropropane-1,2-diol and glycidol fatty acid esters in food. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2011; 55: 509-521
- [2] Bolognesi C., Baur X., Marczyński B., Norppa H., Sepai O., Sabbioni G.: Carcinogenic risk of toluene diisocyanate and 4,4'-methylene-diphenyl diisocyanate: epidemiological and experimental evidence. *Crit. Rev. Toxicol.*, 2001; 31: 737-772
- [3] Bono R., Vincenti M., Schiliro T., Traversi D., Pignata C., Scursatone E., Dotti G., Gilli G.: Cotinine and N-(2-hydroxyethyl)valine as markers of passive exposure to tobacco smoke in children. *J. Expo. Anal. Environ. Epidemiol.*, 2005; 15: 66-73
- [4] Brisson B., Ayotte P., Normandin L., Gaudreau É., Bienvenu J.F., Fennell T.R., Blanchet C., Phaneuf D., Lapointe C., Bonvalot Y., Gagné M., Courteau M., Snyder R.W., Bouchard M.: Relation between dietary acrylamide exposure and biomarkers of internal dose in Canadian teenagers. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.*, 2014; 24: 215-221
- [5] Brody J.G., Moysich K.B., Humblet O., Attfield K.R., Beehler G.P., Rudel R.A.: Environmental pollutants and breast cancer: epidemiologic studies. *Cancer*, 2007; 109: 2667-2711
- [6] Carere A.: Genotoxicity and carcinogenicity of acrylamide: a critical review. *Ann. Ist. Super. Sanita*, 2006; 42: 144-155
- [7] Cavalieri E., Rogan E.: Unbalanced metabolism of endogenous estrogens in the etiology and prevention of human cancer. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2011; 125: 169-180
- [8] Cheng S.H., Tsou M.H., Liu M.C., Jian J.J., Cheng J.C., Leu S.Y., Hsieh C.Y., Huang A.T.: Unique features of breast cancer in Taiwan. *Breast Cancer Res. Treat.*, 2000; 63: 213-223
- [9] Cipierre C., Hajš S., Maucourt-Boulch D.M., Steghens J.P., Picard J.V.: Malondialdehyde adduct to hemoglobin: a new marker of oxidative stress suitable for full-term and preterm neonates. *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2013; 2013: 694014
- [10] European Food Safety Authority 11th Scientific Colloquium: Acrylamide carcinogenicity - new evidence in relation to dietary exposure. *Summ. Rep.*, 2008; 11: 1-27
- [11] Fajdek A., Wróblewska A., Milchert E.: Znaczenie i zastosowania glicydolu. *Chemik*, 2010; 64: 362-375
- [12] Florek E.: Skład chemiczny i kancerogeny dymu tytoniowego. *Alkoholizm i Narkomania*, 1999; 3: 333-347
- [13] Gan J., Skipper P.L., Gago-Dominguez M., Arakawa K., Ross R.K., Yu M.C., Tannenbaum S.R.: Alkyl aniline-hemoglobin adducts and risk of non-smoking-related bladder cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 2004; 96: 1425-1431
- [14] Gawlik M., Brandys J.: Benzo(α)piren a procesy jednoelektronowego utleniania w organizmie. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2008; 41: 1016-1022
- [15] Glycidol. Some Industrial Chemicals. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.*, 2000; 77: 469-486
- [16] Gries W., Leng G.: Analytical determination of specific 4,4'-methylene diphenyl diisocyanate hemoglobin adducts in human blood. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013; 405: 7205-7213
- [17] Grosicka-Maciąg E.: Biologiczne skutki stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem pestycydów. *Postępy Hig. Med. Dośw.*, 2011; 65: 357-366
- [18] Hagmar L., Törnqvist M., Nordander C., Rosén I., Bruze M., Kautiainen A., Magnusson A.L., Malmberg B., Aprea P., Granath F., Axmon A.: Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scand. J. Work Environ. Health*, 2001; 27: 219-226
- [19] Hecht S.S., Carmella S.G., Foiles P.G., Murphy S.E., Peterson L.A.: Tobacco-specific nitrosamine adducts: studies in laboratory animals and humans. *Environ. Health Perspect.*, 1993; 99: 57-63

- [20] Hoffmann D., Hecht S.S.: Advances in tobacco carcinogenesis. Handbook of Experimental Pharmacology, 1990; 94: 63-102
- [21] Honda H., Fujii K., Yamaguchi T., Ikeda N., Nishiyama N., Kasamatsu T.: Glycidol exposure evaluation of humans who have ingested diacylglycerol oil containing glycidol fatty acid esters using hemoglobin adducts. Food Chem. Toxicol., 2012; 50: 4163-4168
- [22] Honda H., Onishi M., Fujii K., Ikeda N., Yamaguchi T., Fujimori T., Nishiyama N., Kasamatsu T.: Measurement of glycidol hemoglobin adducts in humans who ingest edible oil containing small amounts of glycidol fatty acid esters. Food Chem. Toxicol., 2011; 49: 2536-2540
- [23] Honda H., Törnqvist M., Nishiyama N., Kasamatsu T.: Characterization of glycidol-hemoglobin adducts as biomarkers of exposure and in vivo dose. Toxicol. Appl. Pharmacol., 2014; 275: 213-220
- [24] Indulski J.A.: Biomarkery i ocena ryzyka. Pojęcia i zasady. Kryteria zdrowotne środowiska, tom 155, Instytut Medycyny Pracy, Łódź 1995
- [25] Johanson G., Ernstgård L., Gullstrand E., Löf A., Osterman-Golkar S., Williams C.C., Sumner S.C.: Styrene oxide in blood, hemoglobin adducts, and urinary metabolites in human volunteers exposed to ¹³C₈-styrene vapors. Toxicol. Appl. Pharmacol., 2000; 168: 36-49
- [26] Kapka-Skrzypczak L., Cyranka M., Kruszewski M., Turski W.A.: Środki ochrony roślin a zdrowie rolników – Biomarkery oraz możliwości ich wykorzystania do oceny ekspozycji na pestycydy. Medycyna Ogólna i Nauki o Zdrowiu (MONZ), 2011; 17: 28-32
- [27] Konieczko K., Pałaszewska-Tkacz A., Czerczak S.: Czynniki chemiczne o działaniu rakotwórczym lub mutagennym w środowisku pracy w Polsce w latach 2008-2010. Med. Pr., 2013; 64: 181-192
- [28] Licznarska B., Baer-Dubowska W.: Intrakrynologia estrogenów a terapia i chemioprewencja w nowotworach piersi. Postępy Hig. Med. Dośw., 2010; 64: 220-230
- [29] Lin C., Hsieh W.C., Chen D.R., Kuo S.J., Yu W.F., Hu S.W., Sue H.J., Ko M.H., Juan C.H., Chung K.S., Lin P.H.: Hemoglobin adducts as biomarkers of estrogen homeostasis: Elevation of estrogenquinones as a risk factor for developing breast cancer in Taiwanese Women. Toxicol. Lett., 2014; 225: 386-391
- [30] Mayer J., Warburton D., Jeffrey A.M., Pero R., Walles S., Andrews L., Toor M., Latriano L., Wazneh L., Tang D., Tsai W.Y., Kuroda M., Perera F.: Biologic markers in ethylene oxide-exposed workers and controls. Mutat Res., 1991; 248: 163-176
- [31] Mielżyńska D.: Narażenie na substancje o działaniu kancerogennym – biomarkery narażenia: Instytut Medycyny Pracy i Zdrowia Środowiskowego, Sosnowiec. http://www.ietu.katowice.pl/wpr/Dokumenty/Materialy_szkoleniowe/Szkol2/09-mielzynska.pdf (27.05.2014)
- [32] Moorman W.J., Reutman S.S., Shaw P.B., Blade L.M., Marlow D., Vesper H., Clark J.C., Schrader S.M.: Occupational exposure to acrylamide in closed system production plants: air levels and biomonitoring. J. Toxicol. Environ. Health A, 2012; 75: 100-111
- [33] Murata M., Kawanishi S.: Mechanisms of oxidative DNA damage induced by carcinogenic arylamines. Front. Biosci., 2011; 16: 1132-1143
- [34] Myers S.R., Pinorini M.T.: Hemoglobin adducts of benzo[a]pyrene in tobacco smokers: characterization of benzo[a]pyrene adducts in maternal and fetal blood samples. Polycyclic Aromatic Compounds, 2000; 21: 167-186
- [35] Piekoszewski W., Florek E.: Markery narażenia na dym tytoniowy. Katedra i Zakład Toksykologii Akademia Medyczna im. Karola Marcinkowskiego, Poznań 2001
- [36] Pieri M., Miraglia N., Genovese G., Guadagni R., Acampora A., Sannolo N.: New perspectives in hemoglobin adducts analysis: selective digestion with Calpain I. Prevent Res., 2014; 3: 121-130
- [37] Pingot D., Pyrzanowski K., Michałowicz J., Bukowska B.: Toksyczność akrylamidu i jego metabolitu glicydamid. Medycyna Pracy, 2013; 64: 259-271
- [38] Pyrzanowski K., Michałowicz J., Pingot D., Bukowska B.: Charakterystyka metod biologicznych, chemicznych i fizycznych ograniczających obecność akrylamidu w żywności. Bromat. Chem. Toksykol., 2013; 46: 216-224
- [39] Reisser M., Schmidt B.F., Brown W.E.: Synthesis, characterization and solvolysis of mono- and bis-S-(glutathionyl) adducts of methylene-bis-(phenylisocyanate) (MDI). Chem. Res. Toxicol., 2002; 15: 1235-1241
- [40] Robert A., Ducos P., Francin J.M., Marsan P.: Biological monitoring of workers exposed to 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate (MDI) in 19 French polyurethane industries. Int. Arch. Occup. Environ. Health, 2007; 80: 412-422
- [41] Scherer G., Frank S., Riedel K., Meger-Kossien I., Renner T.: Bio-monitoring of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons of non-occupationally exposed persons. Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev., 2000; 9: 373-380
- [42] Shin A., Kang D., Choi J.Y., Lee K.M., Park S.K., Noh D.Y., Ahn S.H., Yoo K.Y.: Cytochrome P450 1A1 (CYP1A1) polymorphisms and breast cancer risk in Korean women. Exp. Mol. Med., 2007; 39: 361-366
- [43] Sitarek K.: Naftalen. Dokumentacja dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy, 2006; 2: 143-158
- [44] Sitarek K., Szymczak W.: Epoksyetan. Dokumentacja dopuszczalnych wielkości narażenia zawodowego. Podstawy i Metody Oceny Środowiska Pracy, 2010; 2: 79-107
- [45] Świerczyńska-Machura D., Pałczyński C.: Wybrane patogenezy i kliniczne aspekty astmy wywołanej ekspozycją zawodową na diizocyjaniany. Med. Pr., 2012; 63: 97-103
- [46] Tao L., Day B.W., Hu B., Xiang Y.B., Wang R., Stern M.C., Gago-Dominguez M., Cortes V.K., Conti D.V., Van Den Berg D., Pike M.C., Gao Y.T., Yu M.C., Yuan J.M.: Elevated 4-aminobiphenyl and 2,6-dimethylaniline hemoglobin adducts and increased risk of bladder cancer among lifelong nonsmokers - the Shanghai bladder cancer study. Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev., 2013; 22: 937-945
- [47] Tareke E., Lyn-Cook B., Robinson B., Ali S.: Acrylamide: a dietary carcinogen formed in vivo? J. Agric. Food Chem., 2008; 56: 6020-6023
- [48] Törnqvist M., Paulsson B., Osterman-Golkar S.: Biomonitoring of acrylamide. W: Acrylamide and other hazardous compounds in heat-treated foods, red.: K. Skog, J. Alexander. Woodhead Publishing Limited, Cambridge 2006; 163-194
- [49] Törnqvist M., Kautiainen A.: Adducted proteins for identification of endogenous electrophiles. Environ. Health Perspect., 1993; 99: 39-44
- [50] Trzeciak A.: Uszkodzenia DNA w komórkach ssaków. Postępy Biologii Komórki, 2001; 28: 407-429
- [51] US EPA, 2010. Toxicological review of acrylamide. In Support of Summary Information on the Integrated Risk Information System (IRIS)
- [52] Vikström A.C., Abramsson-Zetterberg L., Naruszewicz M., Athanassiadis I., Granath F.N., Törnqvist M.: In vivo doses of acrylamide and glycidamide in humans after intake of acrylamide-rich food. Toxicol. Sci., 2011; 119: 41-49
- [53] Vikström A.C., Warholm M., Paulsson B., Axmon A., Wirfält E., Törnqvist M.: Hemoglobin adducts as a measure of variations in exposure to acrylamide in food and comparison to questionnaire data. Food Chem. Toxicol., 2012; 50: 2531-2539
- [54] Waidyanatha S., Rappaport S.M.: Hemoglobin and albumin adducts of naphthalene-1,2-oxide, 1,2-naphthoquinone and 1,4-na-

phthoquinone in Swiss Webster mice. *Chem. Biol. Interact.*, 2008; 172: 105-114

[55] Walker V.E., Fennell, T.R. Upton P.B., MacNeela J.R., Swenberg J.A.: Molecular dosimetry of DNA and hemoglobin adducts in mice and rats exposed to ethylene oxide. *Environ. Health Perspect.*, 1993; 99: 11-17

[56] Xie J., Terry K. L., Poole E.M., Wilson K.M., Rosner B.A., Willett W.C., Vesper H.W., Tworoger S.S.: Acrylamide hemoglobin adduct levels and ovarian cancer risk: a nested case-control study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2013; 22: 653-660

[57] Zahid M., Kohli E., Saeed M., Rogan E., Cavalieri E.: The greater reactivity of estradiol-3,4-quinone vs estradiol-2,3-quinone with DNA in the formation of depurinating adducts: implications for tumor-initiating activity. *Chem. Res. Toxicol.*, 2006; 19: 164-172

[58] Żyżelewicz D., Nebesny E., Oracz J.: Akrylamid – powstawanie, właściwości fizykochemiczne i biologiczne. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 2010; 43: 415-427

Autorka deklaruje brak potencjalnych konfliktów interesów.