ČESKOSLOVENSKÁ SOCIALISTICKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRO VYNÁLEZY A OBJEVY

POPIS OBJEVU K DIPLOMU ČÍS. 9

Prihlásené 05. 06. 72 (PO 26-72)

Zverejnené 28. 11. 75 (Vynálezy a zlepšovací návrhy, č. 11, str. 1, roč. 1975)

Udelené 24. 03. 77

Vydané 15. 10. 78

MDT
66.094.3
541.124

Autor objavu: GAŠPERÍK JURAJ, RNDr., prof., BRATISLAVA

Názov objavu: **Rozdielne vplyvy karcinogénov a nekarcinogénov na priebeh modelovej reakcie s radikálovým mechanizmom**

Predmet objavu: Jav spočívajúci v zistení, že typické karcinogenné látky, napríklad benzidin, dimetylaminoazobenzen, 3-metylcholantren, 1,2-benzpyren, 4,5,6,7--dibenzpyren, 6,12-diazaandantren a cyklohexylamin, na rozdiel od látok typicky nekarcinogenných, ako je napríklad 4,5-benzpyren, 4,5,9,10-dibenzpyren, andantren a cyklamát sodný, urychlujú v nízkej koncentračnej oblasti charakteristickej pre každú látku v rozmedzí 10^{-5} až 10^{-10} mólu skúmanej látky k jednomu mólu benzaldehydu, priebeh modelovej reakcie s radikálovým mechanizmom, pozostávajúcej v tom, že sa 5 ml benzaldehydu, ktorý je vždy v rovnakom stave excitácie, oxiduje v kyslíkovej atmosfére za prítomnosti rôznych množstiev karcinogénov alebo nekarcinogénov za prísne konštantných podmienok.

Objav sa zaoberá zisťovaním rozdielneho vplyvu typicky karcinogenných a typicky nekarcinogenných látok na priebeh modelovej reakcie s radikálovým mechanizmom, pričom karcinogény v nízkych koncentráciách na rozdiel od nekarcinogénov túto reakciu urychlujú.

V prírode majú chemické a biochemické reakcie s radikálovým mechanizmom dôležitú úlohu. Niektoré podmienky pre spontánne radikálovo-reťazové reakcie sú v živočíšnom a ľudskom organizme veľmi priaznivé. Sú to hlavne teplota, vodnekoloidné prostredie, prítomnosť biokatalyzátorov, kovov s premenlivým mocenstvom a iné.

Michaelis a spolupracovníci už r. 1936 [Michaelis, L. Schubert, M. T., Smythe, C. V., J. Biol. Chem. **116**, 587 (1936)]; [Michaelis, L., Schubert, M. T., Smythe, C. V. Science, **84** 139 (1936)] predpokladali účasť voľných radikálov v rôznych fermentačných oxido-redukčných reakciach.

Otázky radikálových procesov v organizmoch sa skúmali nepriamymi metódami z rôznych hľadísk. Z karcinogénov sa najčastejšie a nejdokladnejšie skúmali polycyklické aromatické uhlovodíky. Daudel, 1946 [Daudel, R., Rev. sci., **84** 37 (1946)] a Pullman, 1947 [Pullman, A. Ann. Chimie (Franc.), **2**, 5 (1947)] a rad ďalších autorov hľadali súvislosť medzi elektrónovou štruktúrou a onkogennou aktivitou tychto látok. Ich úspechy boli len čiastočné. Hľadala sa tiež súvislosť medzi karcinogennými vlastnosťami a inhibičnou účinnosťou látok. Magat a Bonom, 1951 [Magat, M., Bonome, C., Comt. Rend. **232**, 1657 (1951)] na modeli polymerizácie styrénu, ktorá probieha radikálovým mechanizmom zistili, že túto reakciu inhibujú tak karcinogenné ako aj nekarcinogenné uhlovodíky. Tiež Kooyman a Heringa, 1952 [Kooyman, E. C., Heringa, J. W., Nature **170**, 661 (1952)] konštatujú, že nieto priamej závislosti medzi tymito dvoma účinkami. Dunn, Warers a Roitt, 1953 [Dunn, J. R., Waters, W. A., Roitt, I. M., J. Chem. Soc., 2933 (1953)] zistili, že niektoré polycyklické aromatické uhlovodíky a od nich odvodené chinóny spomalujú autooxidáciu benzaldehydu. Commoner, Townsend a Pake, 1954 [Commoner, B., Townsend, J. Pake, G. E., Nature **174**, 689 (1954)] dokázali použitím metódy elektrónovej paramagnetickej rezonancie existenciu voľných radikálov v biosubstrátoch.

Dunn, Waters a Roitt, 1954 [Dunn, J. R., Waters, W. A., Roitt, I. M., J. Chem. Soc. 580 (1954)] hľadali súvislosť medzi inhibičnou účinnosťou a karcinogennými vlastnosťami niektorých polycyklických aromatických uhlovodíkov, ktoré sú známe ako inhibítory aj ako karcinogény. Skúmali vplyvy 18 látok na priebeh oxidácie benzaldehydu. Podľa tvaru kriviek spotreby O_2 pri oxidácii za časovú jednotku, snažili sa skúmané látky zaradiť do skupín, ale výsledky meraní neboli jednoznačné. V tom čase prebiehala modelová reakcia — oxidácia benzaldehydu — s veľkú relatívnou chybou. Pracovalo sa s dvoma, troma veľkými navážkami skúmanej látky za prítomnosti niekoľkonásobného množstva iniciátora, často aj za zvýšených teplôt. Uvedené skutočnosti a enormná citlivosť benzaldehydu už na stopy nečistôt a na vonkajšie vplyvy znemožňovali presnú prácu s touto modelovou reakciou.

Pri zisťovaní vplyvov minimálnych množstiev organických zlúčenín na priebeh reakcie s radikálovým mechanizmom, je nutné si zvoliť taký modelový systém, ktorý vyhovuje dvom hlavným podmienkam.

1. Modelová reakcia musí byť tak citlivá, aby mohla reagovať na sebemenšie vplyvy, aké ešte pôsobia na biochemické reakcie.
2. Relatívna chyba modelovej reakcie musí byť čo najmenšia, aby charakteristické rysy reakcie nezanikali v medziach pozorovacích chýb.

Po odstranení zdrojov chýb benzaldehydový oxidačný test vyhovuje obidvom týmto podmienkam.

Kvalitatívnym premeraním vyše 700 látok sa zistilo, že každá v benzaldehyde aj keď málo rozpustná látka ovplyvňuje vo väčšej alebo menšej miere rychlosť oxidácie benzaldehydu. Skutočnosť, že benzaldehyd je dobrým rozpúšťadlom mnohých nepolárnych ba aj polárnych organických látok, umožňuje tejto metóde, po zvýšení jej citlivosti odstránením zdrojov chýb široké uplatnenie.

Podstatou objavu je zistenie, že karcinogenné látky napríklad benzidin, dimetylaminoazobenzen, 3-metylcholantren, 1,2-benzpyran, 4,5,6,7-dibenzpyren, 6,12-diazaandantren a cyklohexylamin na rozdiel od látok nekarcinogenných ako napr. 4,5-benzpyran, 4,5,9,10-dibenzpyren, andantren a Na-cyklamát urychlujú v nízkej koncentračnej oblasti charakteristickej pre každú látku v rozmedzí 10^{-5} až 10^{-10} mólu skúmanej látky k jednomu mólu benzaldehydu, priebeh modelovej reakcie s radikálovým mechanizmom, pozostávajúcej v tom, že sa 5 ml benzaldehydu, ktorý je vždy v rovnakom stave excitácie, oxiduje, v kyslíkovej atmosfére za prítomnosti rôznych množstiev karcinogénov alebo nekarcinogénov za prísne konštantných podmienok.

Priebeh reakcie sa zaznamenáva na základe spotreby kyslíka v závislosti od času, najčastejšie za 60' registračným integračným mW. metrom, ktorý je ciachovaný na ml O_2 a je zapojený na automatický elektrolyser na vývoj kyslíka.

Relatívna chyba meraní v oblasti úplnej inhibície je pod 2 %. V oblasti spomaleného priebehu je do 4 % a v oblasti katalyticky urychlenej oxidácie je presnosť meraní limitovaná presnosťou navážky. Relatívna chyba rychlosti oxidácie benzaldehydu bez skúmanej látky je pre enormnú citlivosť benzaldehydu do 6 %.

Priebehy oxidácie 40 až 60 navážok skú-

manej látky v benzaldehyde sa znázorňujú v trojrozmernom blokovom diagrame. V ňom sa prejavia kvalitatívne aj kvantitatívne charakteristické znaky vyvolané zvláštnymi vlastnosťami skúmanej látky a jej oxidačných produktov v rôznych koncentračných oblastiach.

V diagramoch na ose X sú množstvá skúmanej látky v mol. 10^{-5}, na ose Y spotreby O_2 v ml a na ose Z je vyznačený čas v min. Časti kriviek nad plochou orámovanou hrubou (prerušovanou) čiarou vyznačujú koncentračnú oblasť, v ktorej sa prejavuje iniciačná, alebo katalytická účinnosť skúmanej látky.

V tejto práci uvedené polycyklické aromatické uhlovodíky sú číslované podľa nomenklatúrnych smerníc IUPAC.

Na pripojených obrázkoch je znázornené toto:

Obr. 1 Benzidín — karcinogén. V nízkej koncentračnej oblasti výrazne urychluje reakciu, vo vyšších koncentráciach je priebeh autokatalytický.

Obr. 2 Dimetylaminoazobenzen (maslová žlť) — karcinogén. Katalytický priebeh pri nízkych koncentráciách prechádza cez úzku oblasť autokatalytickú v lineárny priebeh.

Obr. 3 3-Metylcholantrén — účinný karcinogén. Oblasť katalytická aj autokatalytická sú veľmi výrazné.

Na ďalších obrázkoch sú znázornené rozdielne vplyvy dvojíc karcinogénnych a nekarcinogénnych izomérov v rovnakom merítku. V nízkej koncentračnej oblasti v ktorej dochádza k urychlenej reakcii sa vyskytuje viacero maxím. K vôli prehľadnosti sú diagramy uvedené v zjednodušenej forme a v nízkej koncentračnej oblasti sú zakreslené len píky s najvyššou hodnotou.

Obr. 4 1,2 — Benzpyrén — jeden z nejúčinnejších karcinogénov. V nízkej koncentračnej oblasti markantne urychluje reakciu. Jeho onkogenne neúčinný izomér, 4,5-Benzpyrén ovplyvňuje priebeh reakcie celkom odlišne. Pri všetkých koncentráciach je spotreba kyslíka menšia ako pri oxidácii samotného benzaldehydu.

Obr. 5 4,5,6,7-Dibenzpyrén-karcinogén. 4,5,9,10-Dibenzpyrén nekarcinogén.

Obr. 6 6,12-Diazaandantrén-karcinogén. Andatrén — nekarcinogén.

Obr. 7 Cyklamát sodný (umelé sladidlo) — nekarcinogén.

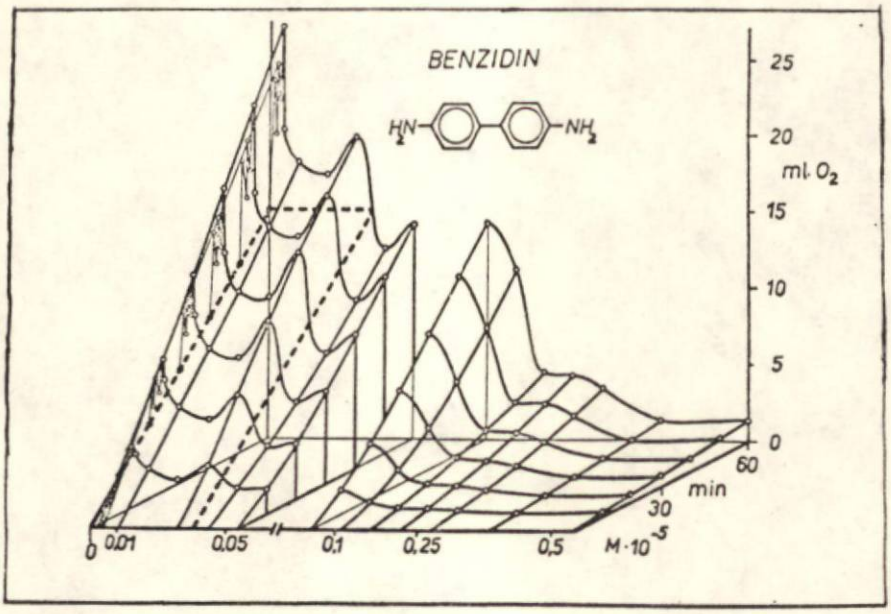
Obr. 8 Cyklohexylamín — je metabolitom cyklamátu sodného — karcinogén.

Benzaldehydový oxidačný test je fyzikálno-chemický model mikroreakcie s radikálovým mechanizmom. Pomocou neho možno chemických jedincov rozdeliť do skupín látok aktívnych a neaktívnych. V živom organizme sú však reakčné podmienky celkom odlišné. Cudzorodé látky sa môžu vplyvom detoxikačných reakcií chemicky pozmeniť. Môže dôjsť k hydrolytickému štiepeniu a tak napríklad nekarcionogenný cyklamát sodný sa mení na karcinogenný metabolit cyklohexylamín. A iste je ešte celý rad ďalších vplyvov, ktoré môžu pôsobiť na vlastnosti látok v živom organizme.

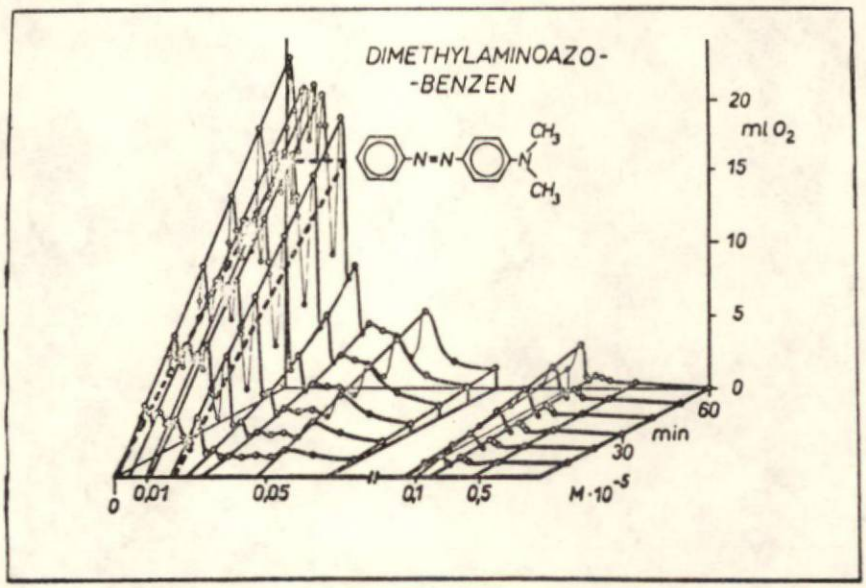
Význam objavu spočíva v tom, že dnes, keď životné prostredie je deň za dňom viac ohrozované škodlivinami, predmetný objav v úzkej súvislosti s ďalšími biologickými testami umožní rychlejšie odhaliť látky a ich koncentračné oblasti, v ktorých môžu byť pre živý organizmus nebezpečné.

Nový poznatok umožňuje tiež štúdium vplyvu substituentov na fyzikálno-chemickom modeli radikálovej reakcie.

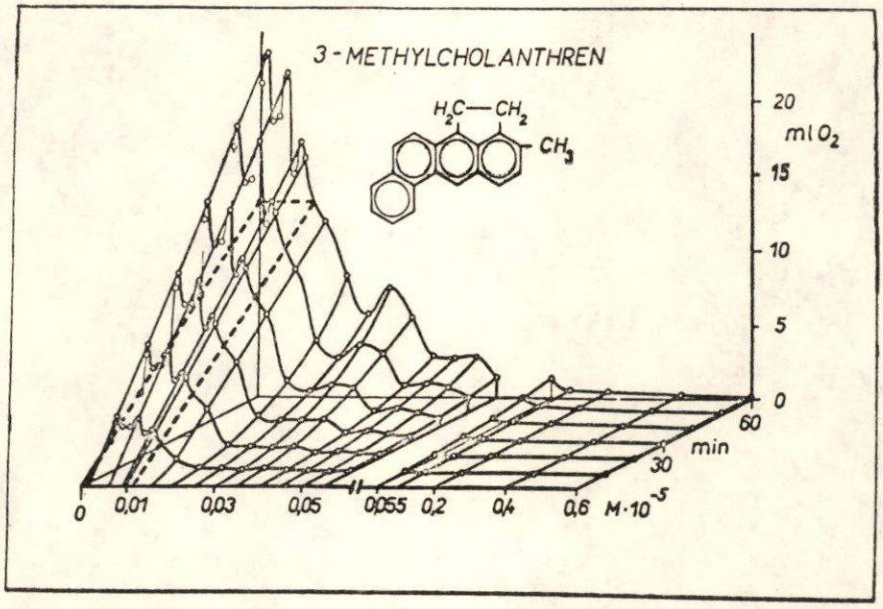
Severografia, n. p., provozovna 32, Most


BENZIDIN
25
20
ml O2
15
10
5
0
60
min
30
0
0,01
0,05
0,1
0,25
0,5
M·10-5

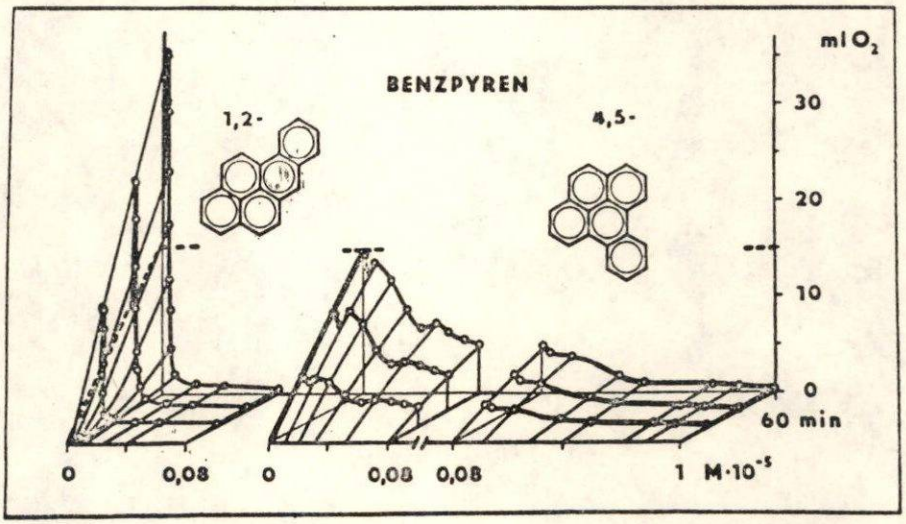
Obr. 1


DIMETHYLAMINOAZO-
-BENZEN
20
ml O2
15
10
5
0
60
min
30
0
0,01
0,05
0,1
0,5
M·10-5

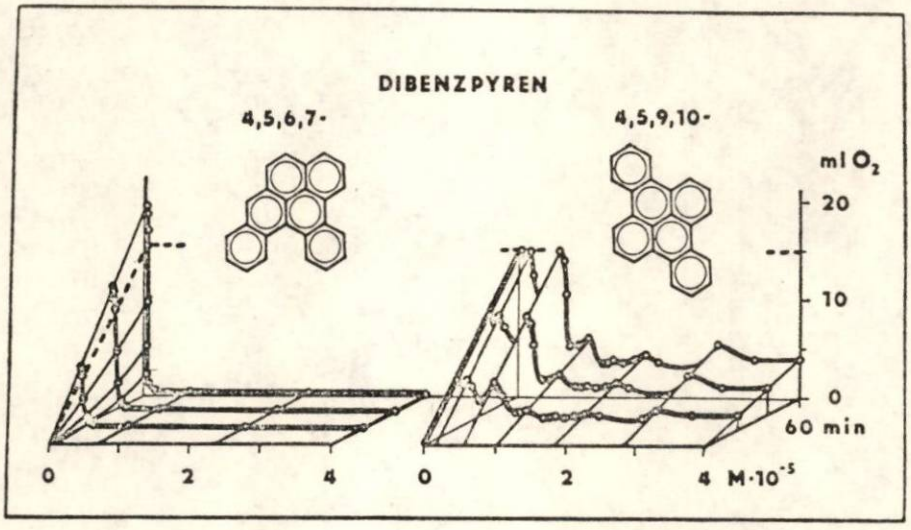
Obr. 2


3-METHYLCHOLANTHREN
$H_2C—CH_2$
CH_3
20
$ml\,O_2$
15
10
5
0
60
min
30
0
0,01
0,03
0,05
0,055
0,2
0,4
0,6
$M\cdot10^{-5}$

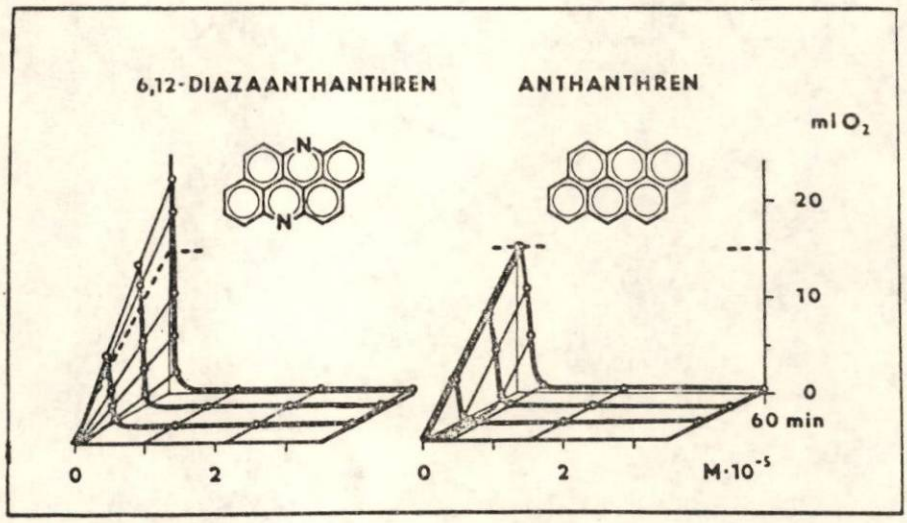
Obr. 3


BENZPYREN
1,2-
4,5-
$ml\,O_2$
30
20
10
0
60 min
0
0,08
0
0,08
0,08
1
$M\cdot10^{-5}$

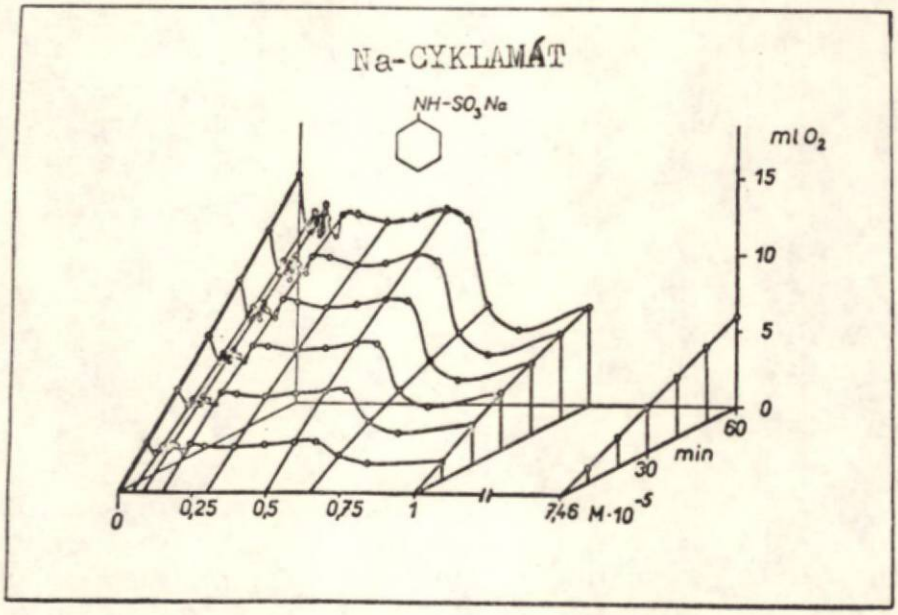
Obr. 4


DIBENZPYREN
4,5,6,7-
4,5,9,10-
ml O2
20
10
0
60 min
0
2
4
0
2
4 M·10-5

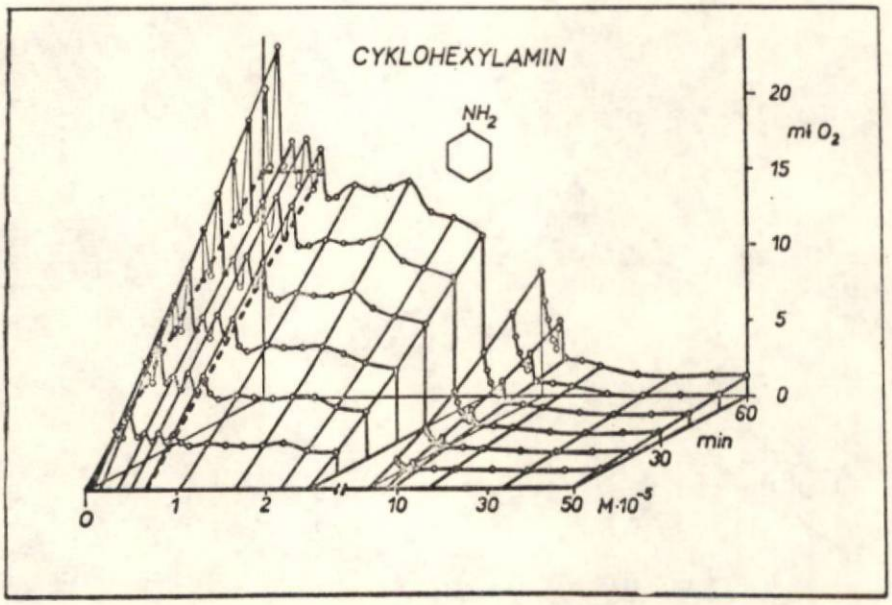
Obr. 5


6,12-DIAZAANTHANTHREN
ANTHANTHREN
N
N
ml O2
20
10
0
60 min
0
2
0
2
M·10-5

Obr. 6


Na-CYKLAMÁT
NH-SO3Na
ml O2
15
10
5
0
60
30
min
0
0,25
0,5
0,75
1
7,46 M·10-5

Obr. 7


CYKLOHEXYLAMIN
NH2
20
ml O2
15
10
5
0
60
min
30
0
1
2
10
30
50 M·10-5

Obr. 8