

# **Cysteinové adukty globinu jako potenciální biomarkery expozice styrenu**



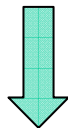
**J. Mráz, I. Hanzlíková, Š. Dušková,  
E. Frantík, V. Stránský**



**Státní zdravotní ústav  
Praha**

## Biomarkery expozice cizorodým látkám

- **výchozí látka v moči**
- **polární metabolity v moči**  
(biomarkery expozice styrenu: kys. mandlová a kys. fenylglyoxylová)
- **výchozí látka v krvi**
- **těkavá výchozí látka ve vydechovaném vzduchu**
- **kovalentní adukty s biologickými makromolekulami (DNA, proteiny)**  
(reaktivní metabolit styrenu: styrenoxid SO)

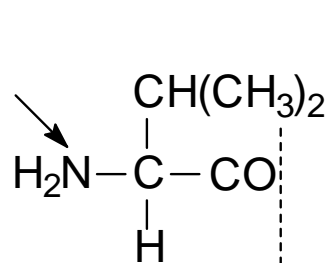


**adukty s globinem**

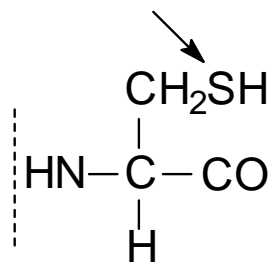
## **Globinové adukty cizorodých látek**

- **dlouhá doba života v organismu odpovídající době života erythrocytů (u člověka 120 dnů)**
- **snadná dostupnost globinu v dostatečném množství (~140 mg/ml krve)**
- **vhodné analytické postupy pro stanovení**

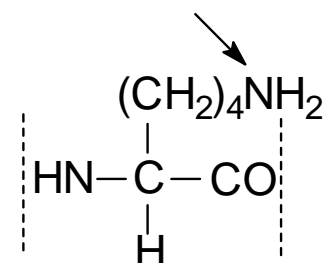
## Reaktivní skupiny aminokyselin



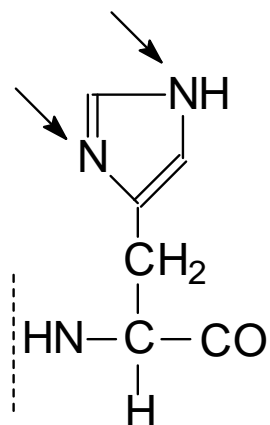
*Val*



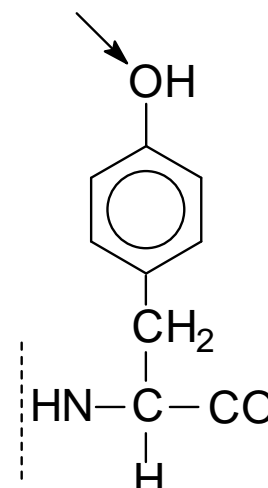
*Cys*



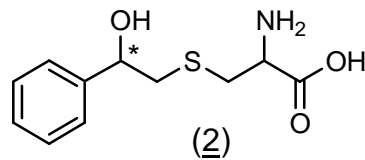
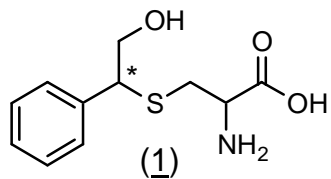
*Lys*



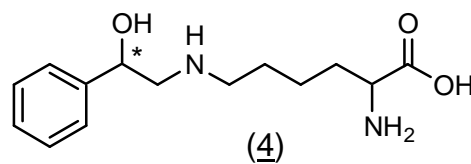
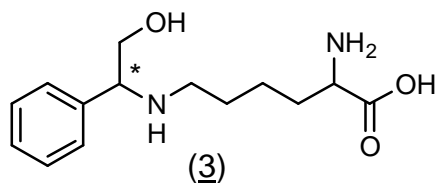
*His*



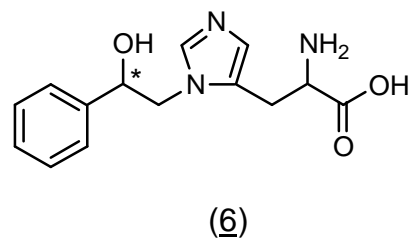
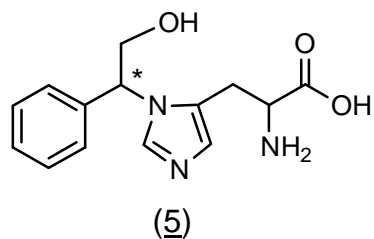
*Tyr*



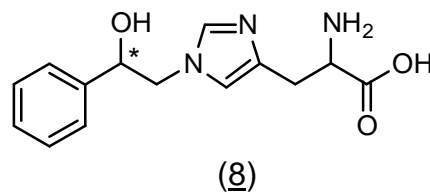
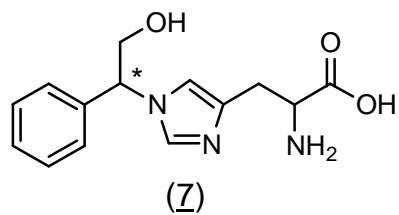
**SO-Cys**



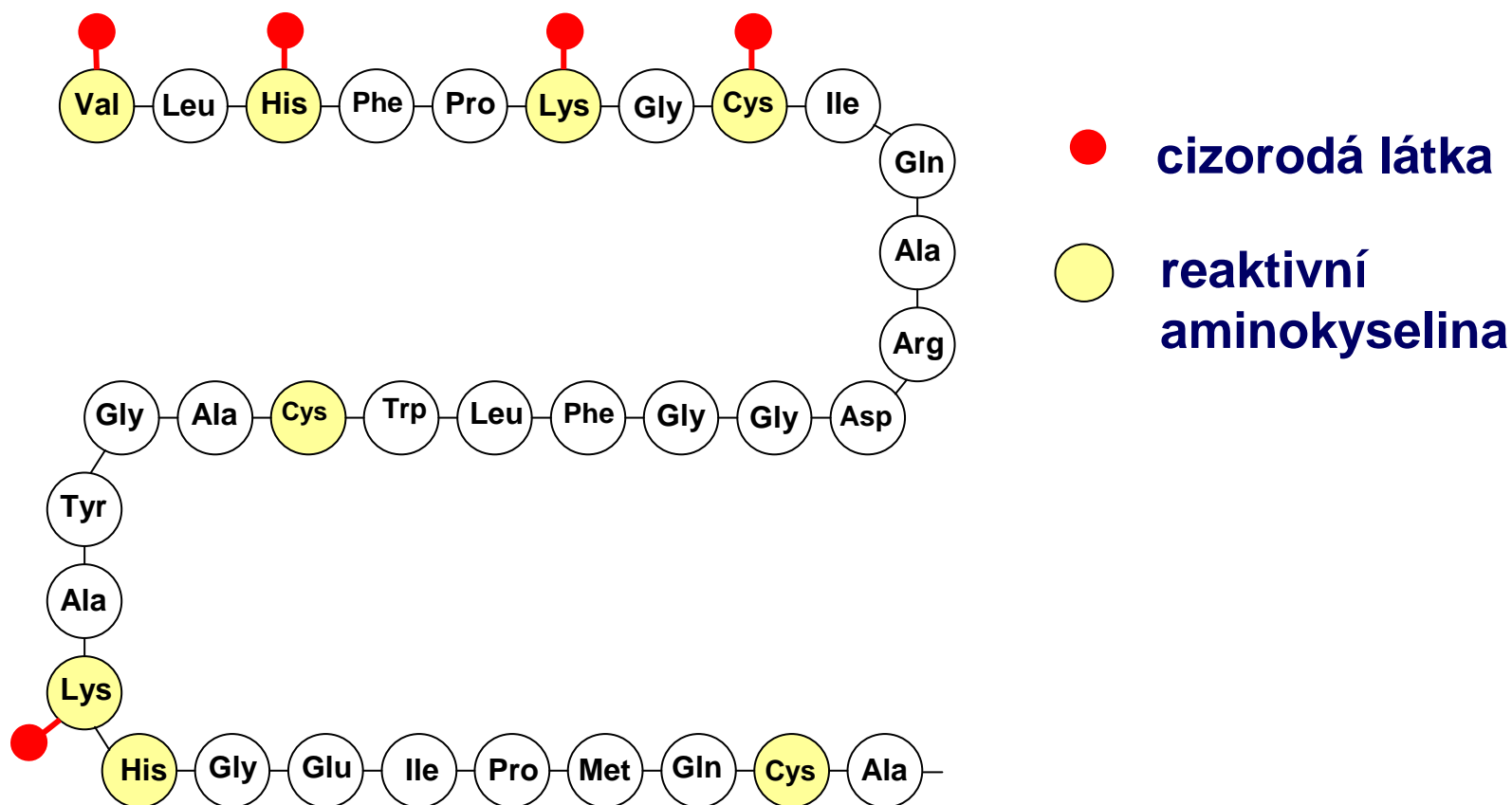
**SO-Lys**



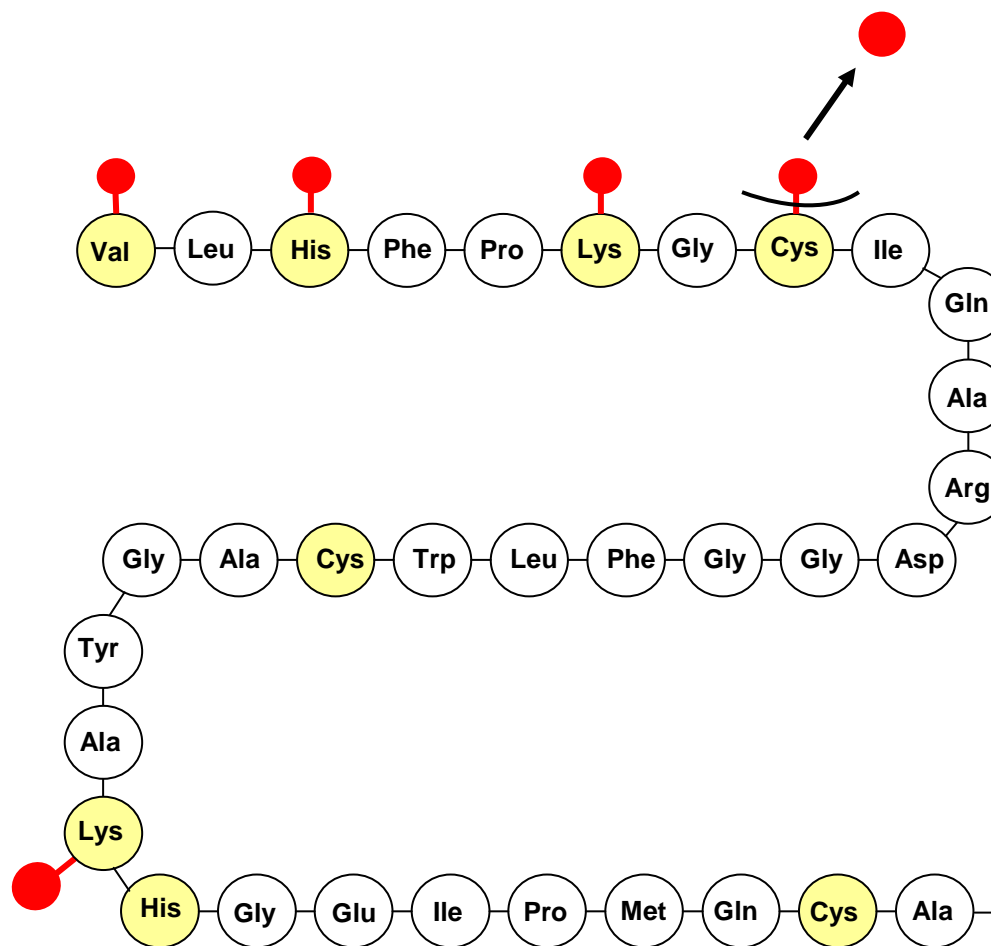
**SO-His**



## Adukty cizorodých látek s globinem: Struktura

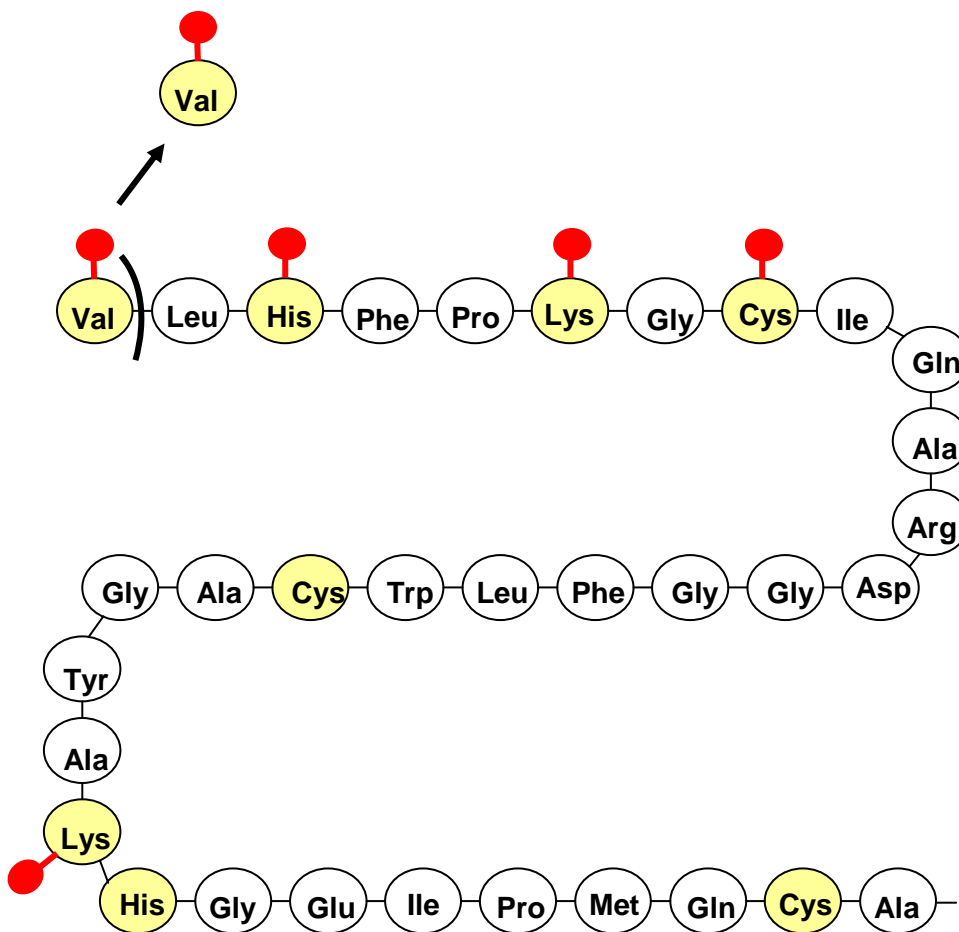


# Adukty cizorodých látek s globinem: Metody analýzy (1)



kyselá nebo alkalická  
hydrolýza

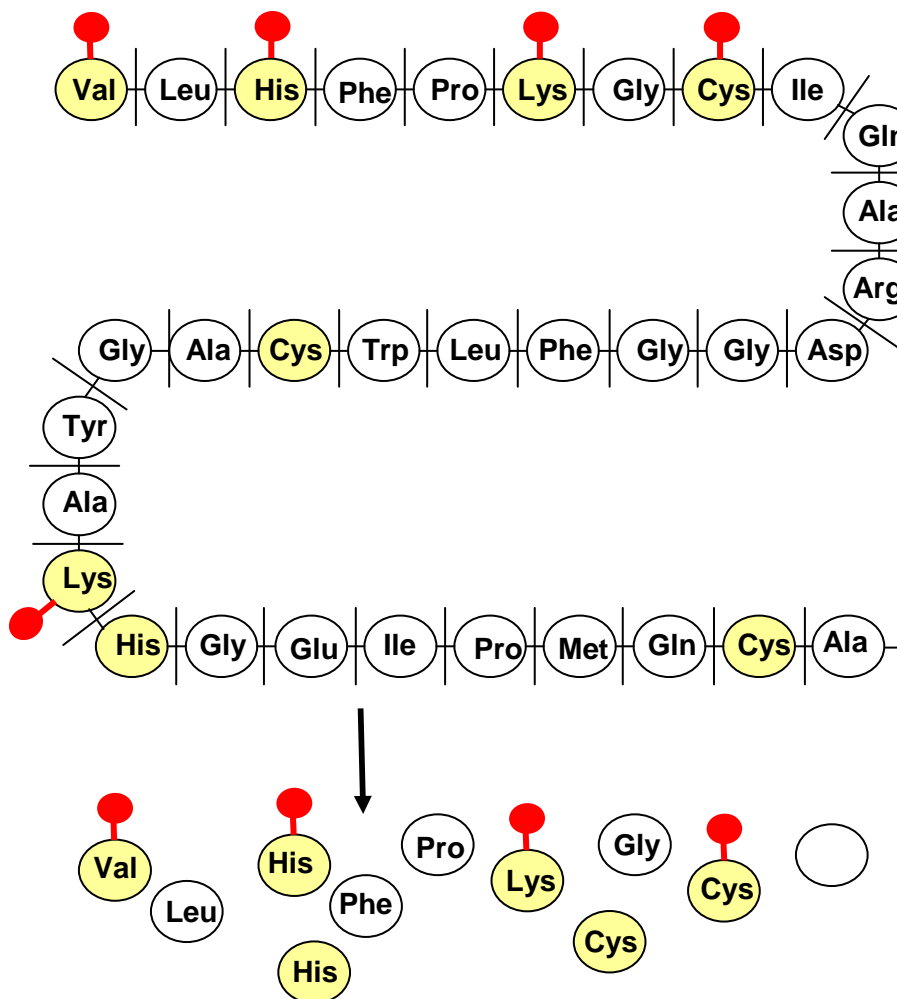
## Adukty cizorodých látek s globinem: Metody analýzy (2)



Edmanova degradace  
nebo  
modifikovaná  
Edmanova degradace



## Adukty cizorodých látek s globinem: Metody analýzy (3)



**totální hydrolyzá  
(kyselá nebo  
enzymatická)**

## Materiál

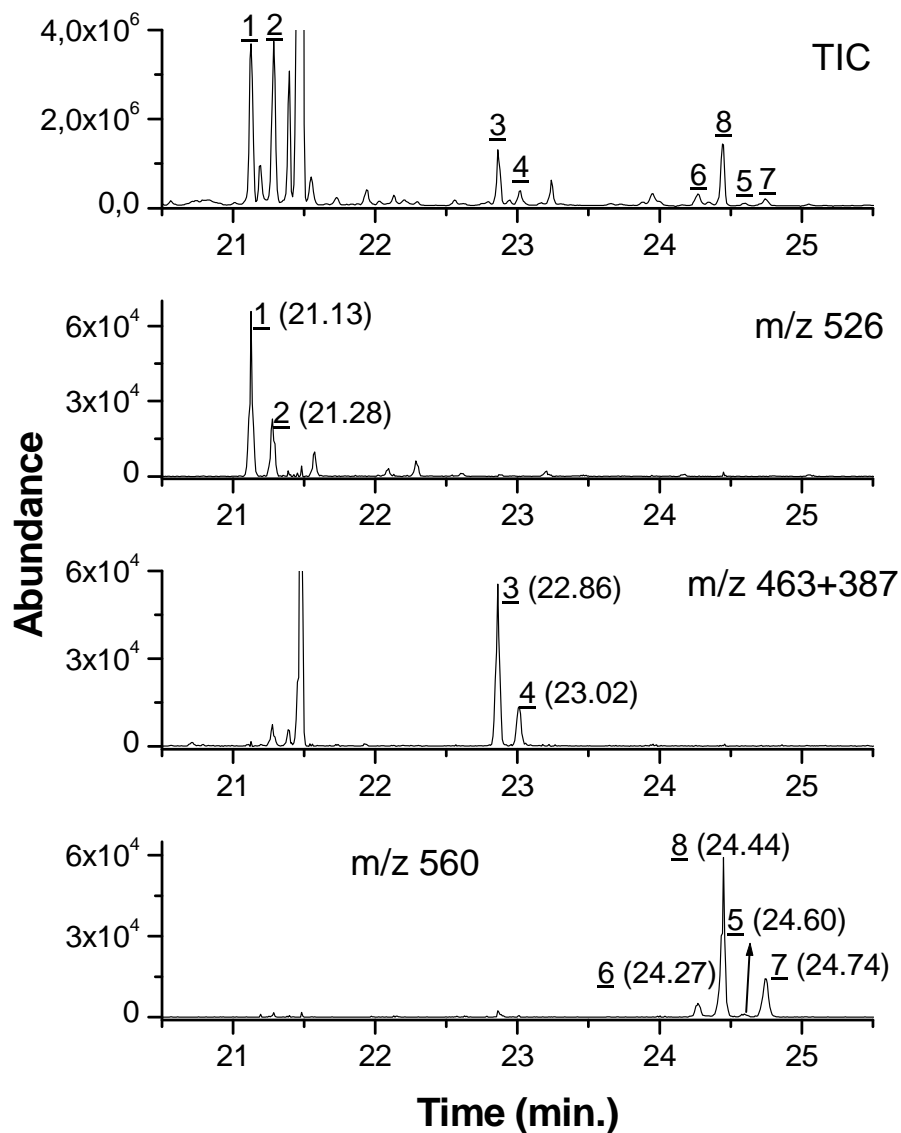
Lidský globin inkubovaný *in vitro* s SO (vysoká hladina aduktů)

## Analytický postup (základní)

- Enzymatická hydrolýza pronasou
- Odpaření dosucha
- Derivatizace MTBSTFA
- Extrakce do heptanu
- GC/MS

## Výsledky

Všechny očekávané adukty SO s Cys, Lys a His nalezeny  
(Jágr et al. Chem. Res. Toxicol. 20, 1442-1452 (2007))



**SO-Cys (TBDMS)<sub>3</sub>**

**SO-Lys (TBDMS)<sub>3</sub>**

**SO-His (TBDMS)<sub>3</sub>**

## 2009-2010

- **Zvýšení citlivosti stanovení SO-Cys**
  
- **Stanovení SO-Cys v globinech**
  - **in vitro krev + SO (0,01, 0,1 a 1 mM)**
  
  - **myši exp. styrenu (600 nebo 1200 mg/m<sup>3</sup>, 6 h/den × 10 dní)**
  
  - **dělníci exp. styrenu na pracovišti**

## Analytický postup (základní)

- Enzymatická hydrolýza globinu
- Odpaření dosucha
- Derivatizace MTBSTFA
- Extrakce do heptanu
- GC/MS

## Analytický postup (modifikovaný)

- Enzymatická hydrolýza globinu
- Prekoncentrace SPE
- Odpaření dosucha
- Derivatizace PFBB + MTBSTFA
- Extrakce do heptanu
- GC/MS

## **Extrakce na pevné fázi (solid phase extraction, SPE)**

### **Cíl:**

zakoncentrovat SO-Cys z globinového hydrolyzátu,  
odstranit nadbytek volných aminokyselin a solí

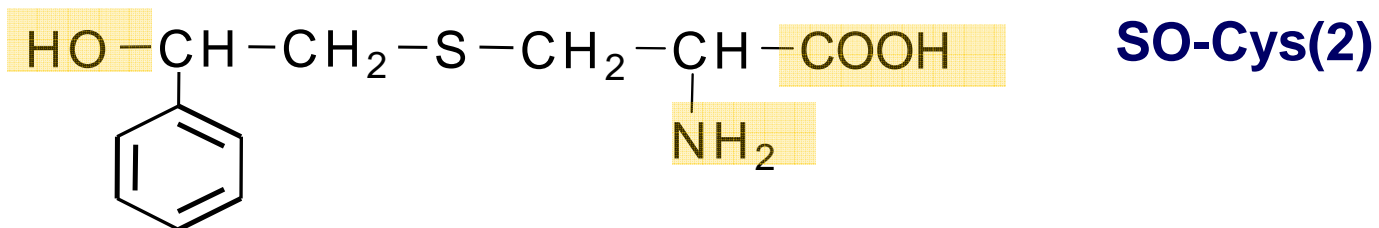
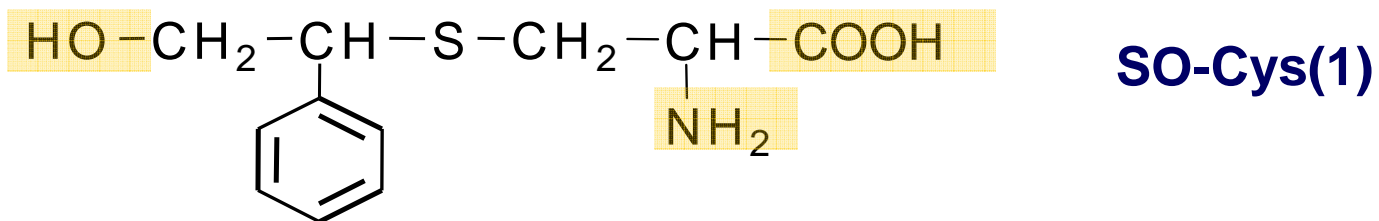
### **Nalezené řešení:**

SPE kolonky Strata X, 500 mg (Phenomenex)

### **Výsledek:**

SO-Cys oddělen od všech složek kromě Trp  
(hmotnostní bilance SPE kroku: 46 mg → 1 mg)

## Derivatizace SO-Cys pro GC-MS







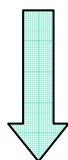
## Derivatizace: výsledky

### A) MTBSTFA:

- očekávané produkty: SO-Cys(TBDMS)<sub>3</sub>, Trp(TBDMS)<sub>3</sub>

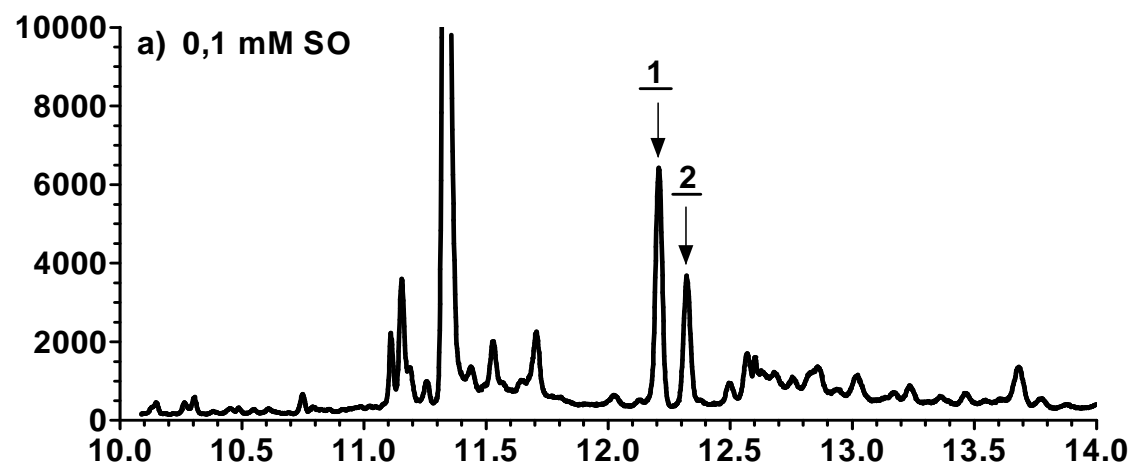
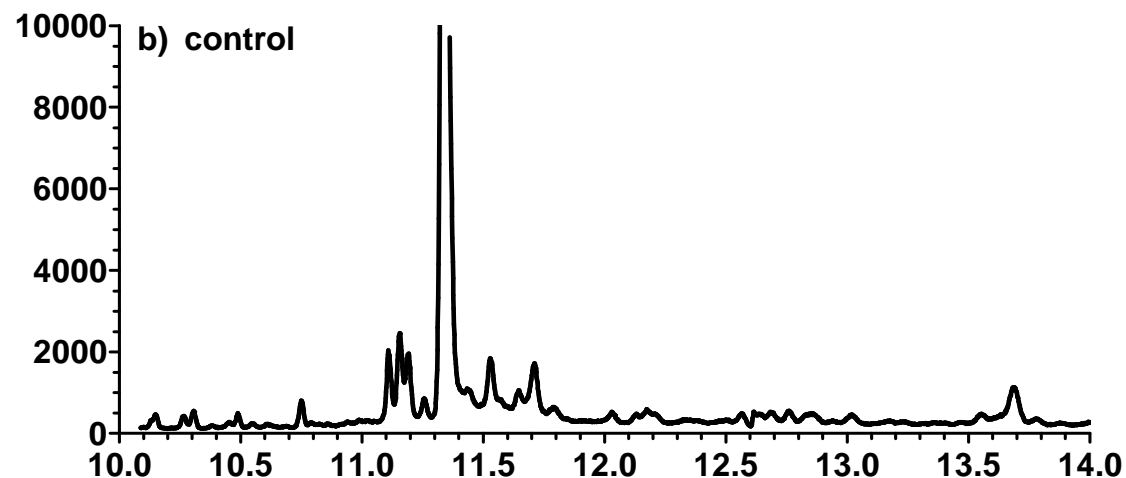
### B) PFBB + MTBSTFA:

- neočekávané produkty, špatná reprodukovatelnost
- GC-MS/NCI pouze srovnatelně citlivá s GC-MS/EI

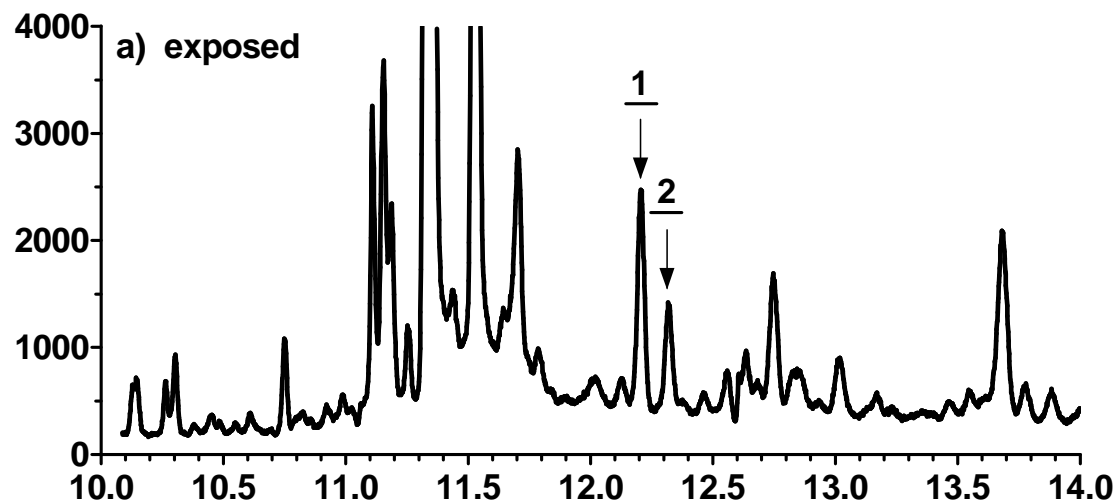
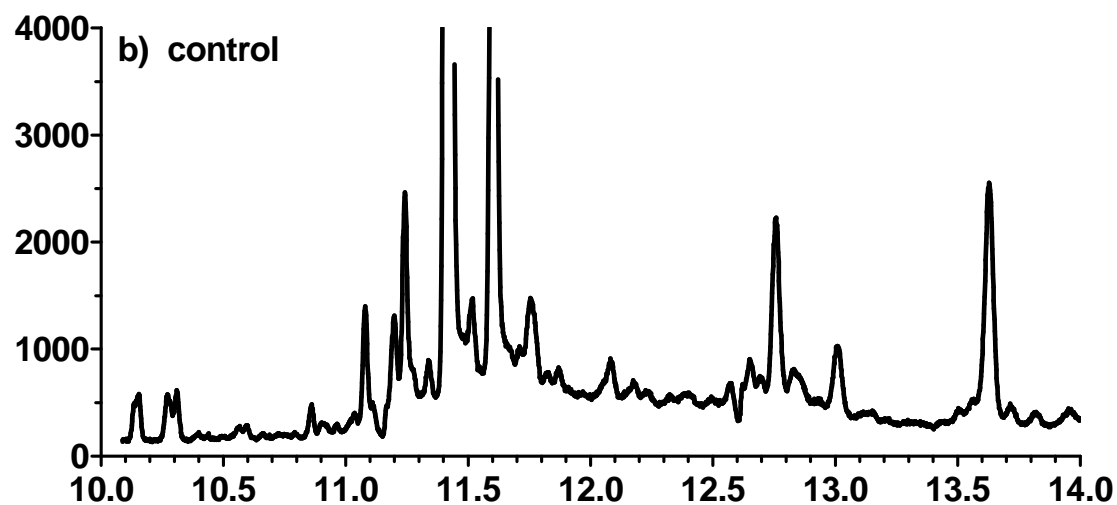


**nadále používán jen MTBSTFA**

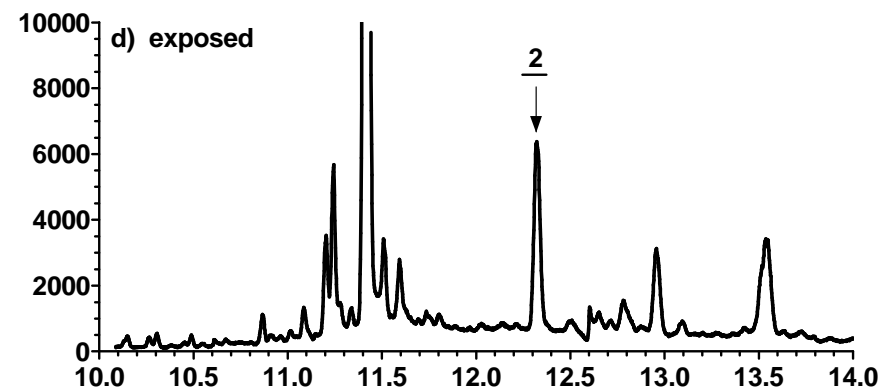
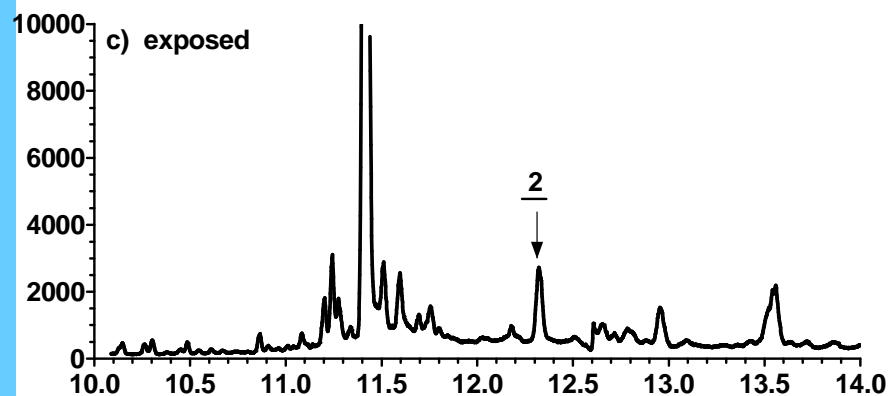
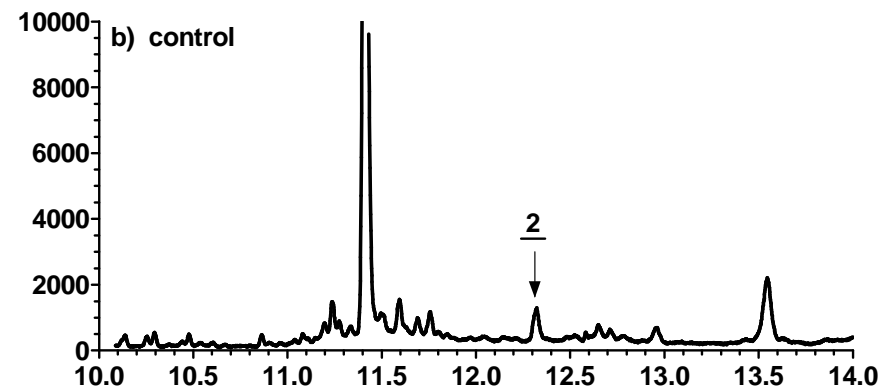
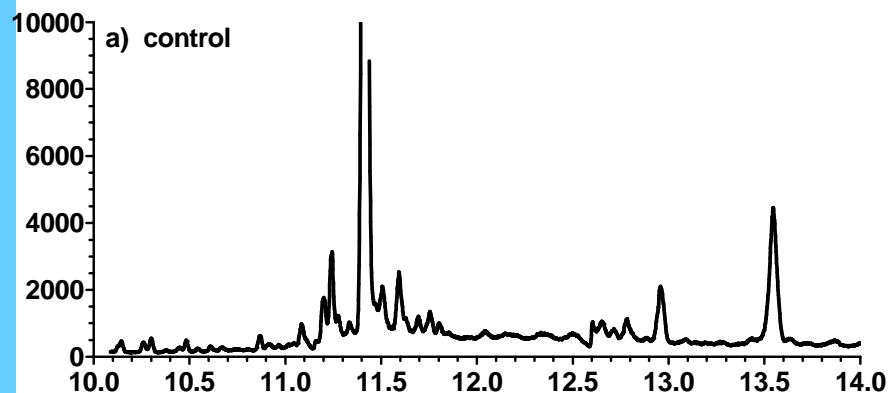
## SO-Cys: lidský globin, inkubace *in vitro* s 0,1mM SO



## SO-Cys: myší globin, exp. styrenu $600 \text{ mg/m}^3 \times 6 \text{ h/d}$ , 10 d



## SO-Cys: lidský globin, profesionální expozice styrenu



## SO-Cys(2) v lidském globinu

Skupina	n	n (> LOD)	SO-Cys(2) (nmol/g glob)	
			Range	Mean $\pm$ S.D. <sup>a</sup>
kontroly	9	2	< LOD - 0.5	0.3 $\pm$ 0.1
exponovaní, závod A	10	2	< LOD - 0.7	0.3 $\pm$ 0.2
exponovaní, závod B	12	12	0.9 - 7.3	3.3 $\pm$ 2.1

mez detekce LOD = 0,4 nmol/g globinu

<sup>a</sup> u vzorků s hladinou SO-Cys(2) < LOD přiřazena hodnota 1/2 LOD

## SHRNUTÍ

- u osob exponovaných styrenu prokázán SO-Cys
- proč jen SO-Cys(2) ?
- validace SO-Cys(2) jako biomarkeru expozice
- korelace hladiny SO-Cys(2) a expozice styrenu