

**Tři isomerní vinylfenylmerkapturové kyseliny
jako nové metabolity styrenu a indikátory
jeho metabolické aktivace
na styren-3,4- a styren-2,3-oxid**

**Igor Linhart, Jaroslav Mráz, Jan Krouželka, Jan Scharff a Šárka Dušková
VŠCHT Praha a SZÚ Praha**

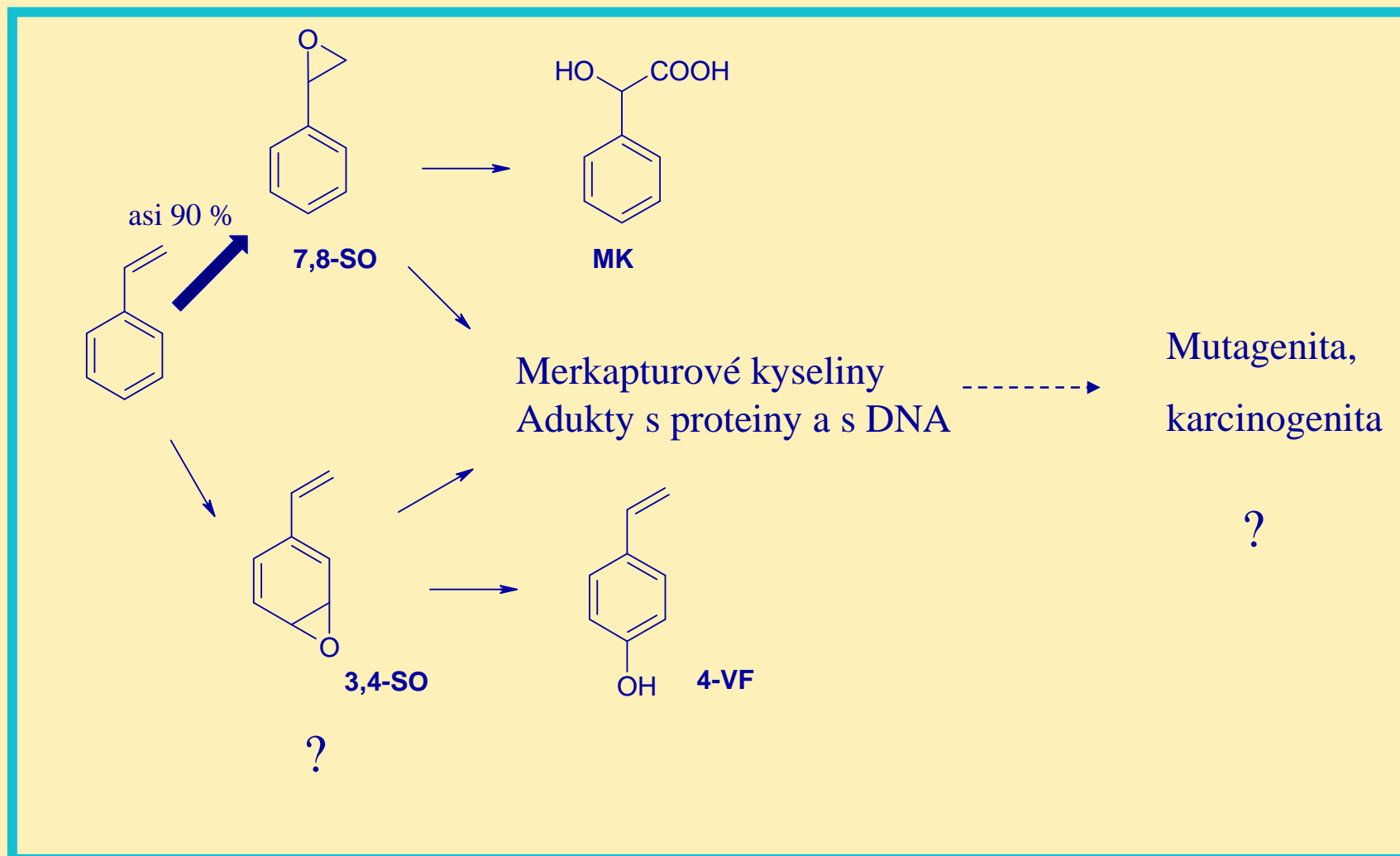
27. Teisingerův den průmyslové toxikologie

Praha, 7. června 2012

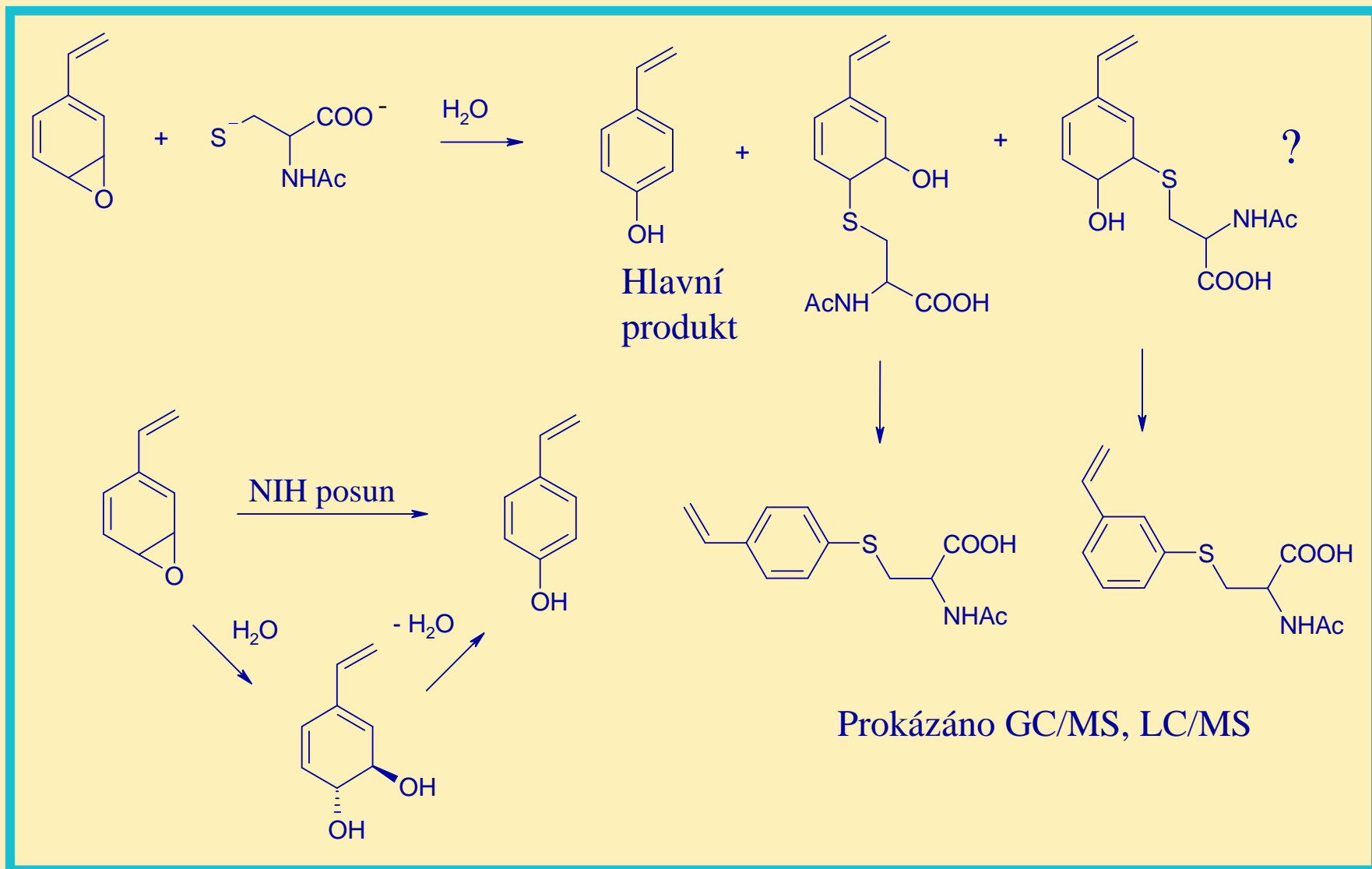
Styren

- Klasifikace IARC: karcinogen IIB – možný lidský karcinogen
- Klasifikace EU: z hlediska karcinogenity neklasifikován
z hlediska toxicity X_n – látka zdraví škodlivá
- Metabolismus studován již 70 let (Spencer et al., 1942 – hippurová kyselina v moči zvířat exponovaných styrenu)
- Hlavní aktivní metabolit, styren-7,8-oxid klasifikován jako karcinogen IIA (IARC), v EU karcinogen kategorie 2.

Metabolismus styrenu



Reakce 3,4-STO



Experiment *in vivo*

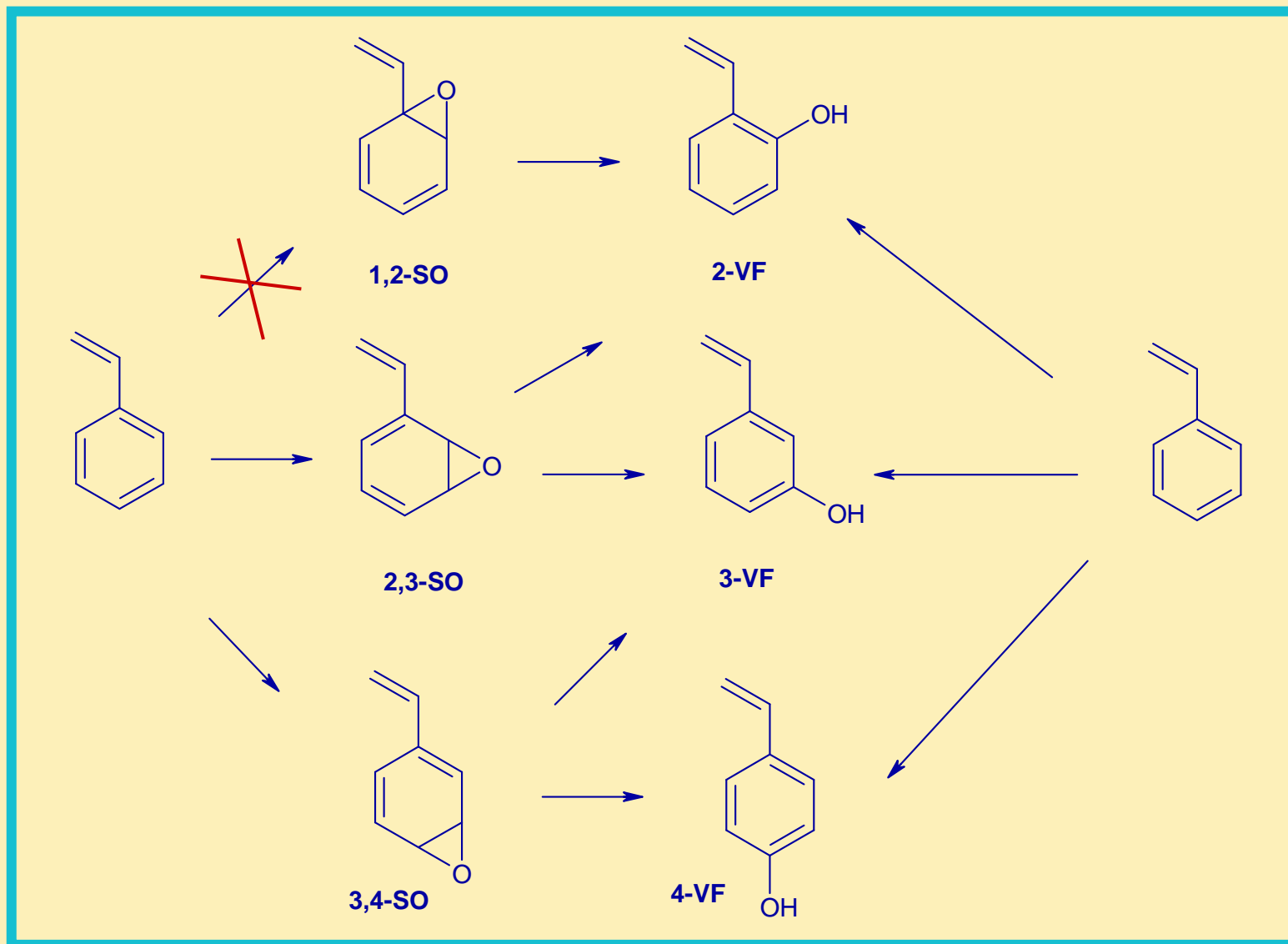
Exposice myší styrenu: 600 a 1200 mg/m³, 6 h

12 zvířat pro každou dávku, rozdělených do 2 klecí po 6

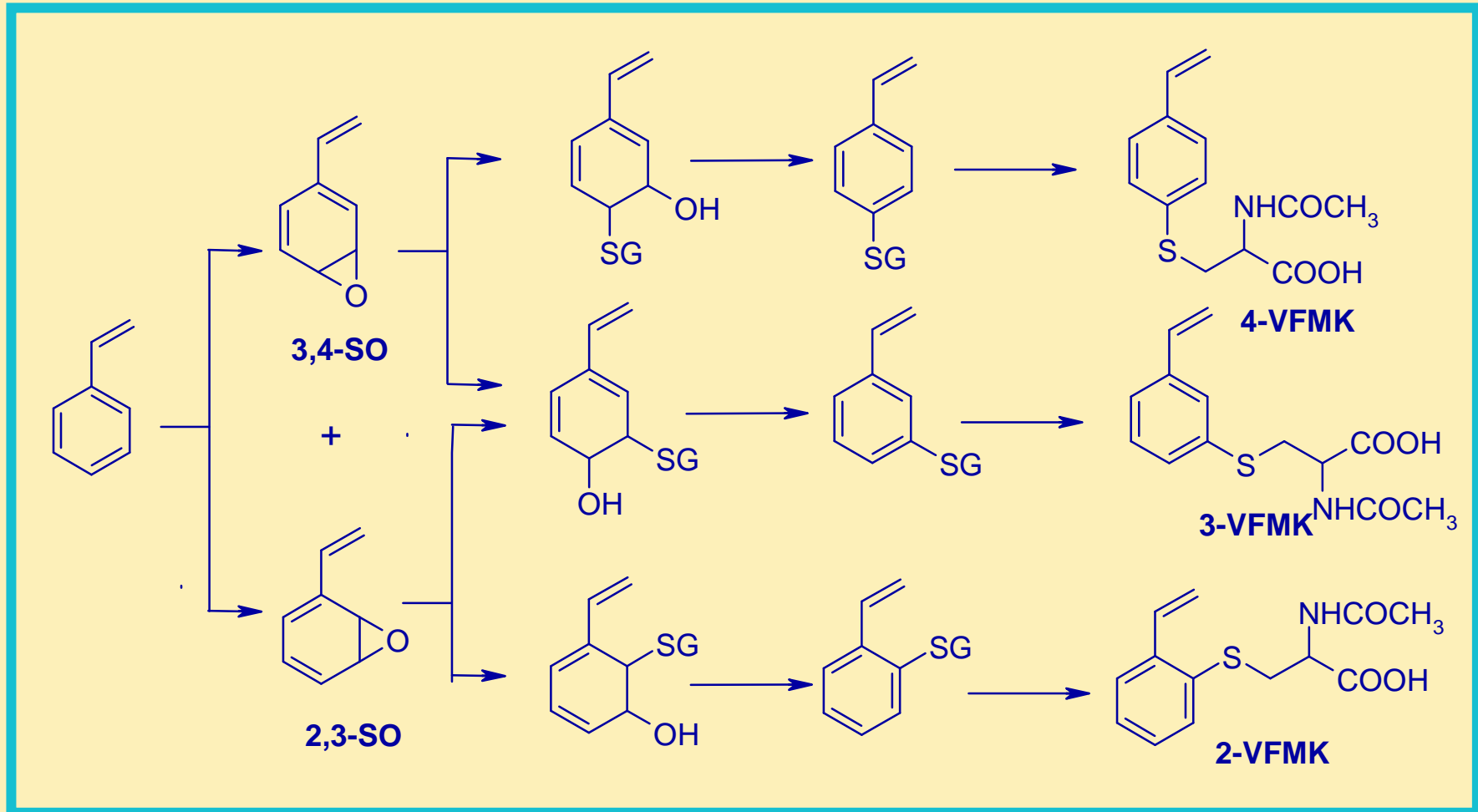
Moč sbírána po dobu 24 h od začátku expozice

Analýza: GC/MS pro vinylfenoly, HPLC-ESI-MS pro merkapturové kyseliny

Možné cesty biotransformace aromatického jádra styrenu, fenolické metabolity

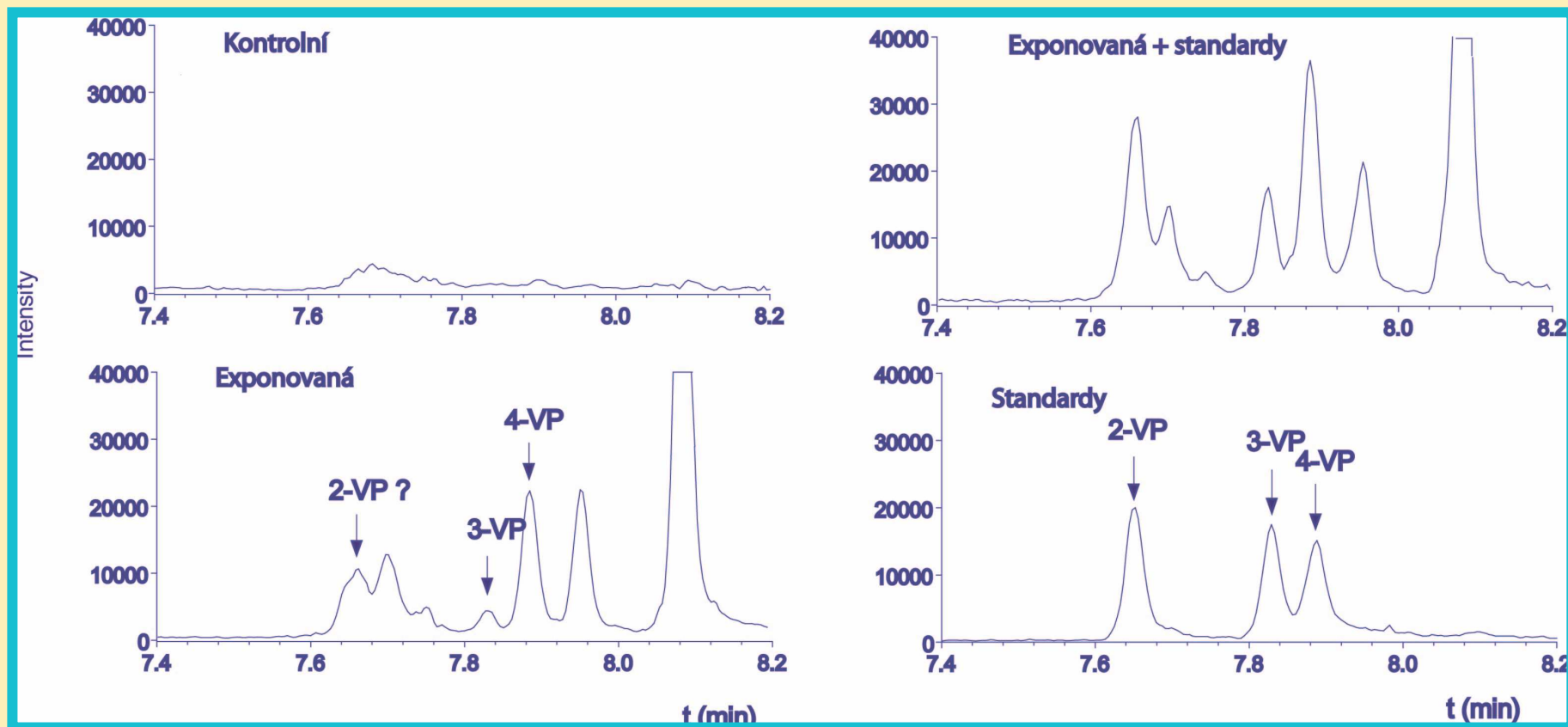


Možné cesty biotransformace aromatického jádra styrenu, merkapturové kyseliny



Analýza moči myší – vinylfenoly

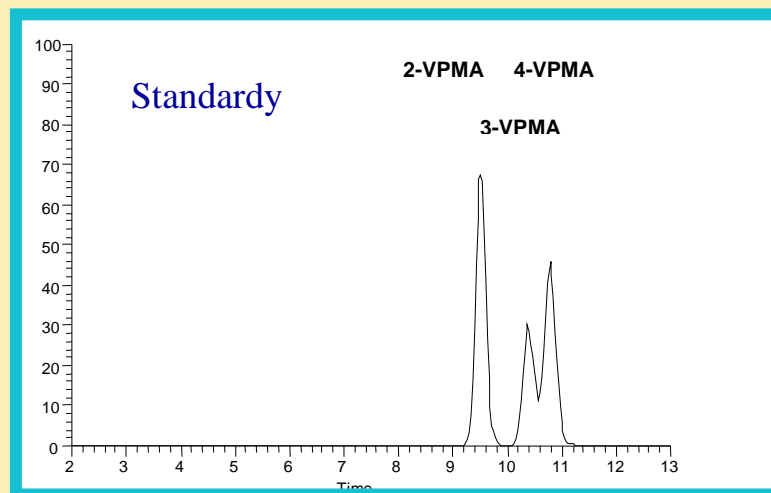
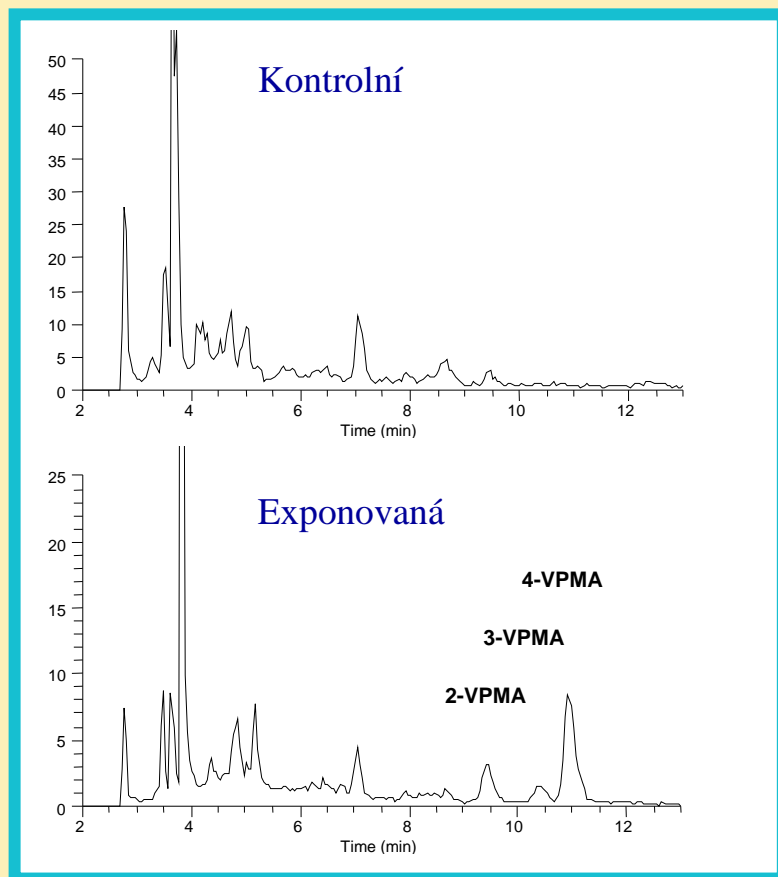
Zpracování: štěpení β -glukuronidasou/arylsulfatasou, poté acetylace



GC/MS, přechod m/z 220 \rightarrow 178

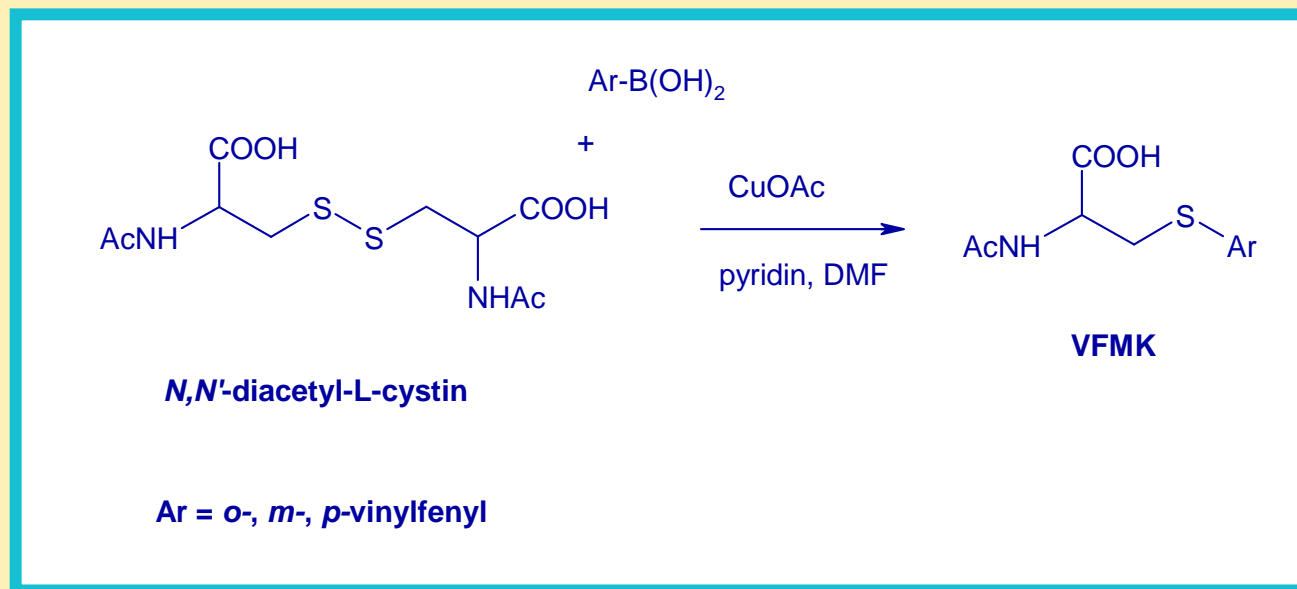
Analýza moči myší – merkapturové kyseliny

Zpracování: SPE na kolonkách Oasis HLB, pH 1 - 2



LC/MS, MS², m/z 264 (M - H)⁻ pro VFMK.

Syntéza merkapturových kyselin



Krouželka, J., Linhart, I. *Eur.J. Org. Chem.* **2009**, 6336-6340

Vylučování vinylfenylmerkapturových kyselin v moči myši exponovaných styrenu

Styren [mg/m ³]	4-VFMK [nmol/kg]	% dávky
600	535 ± 47	0,047
1200	984 ± 78	0,043

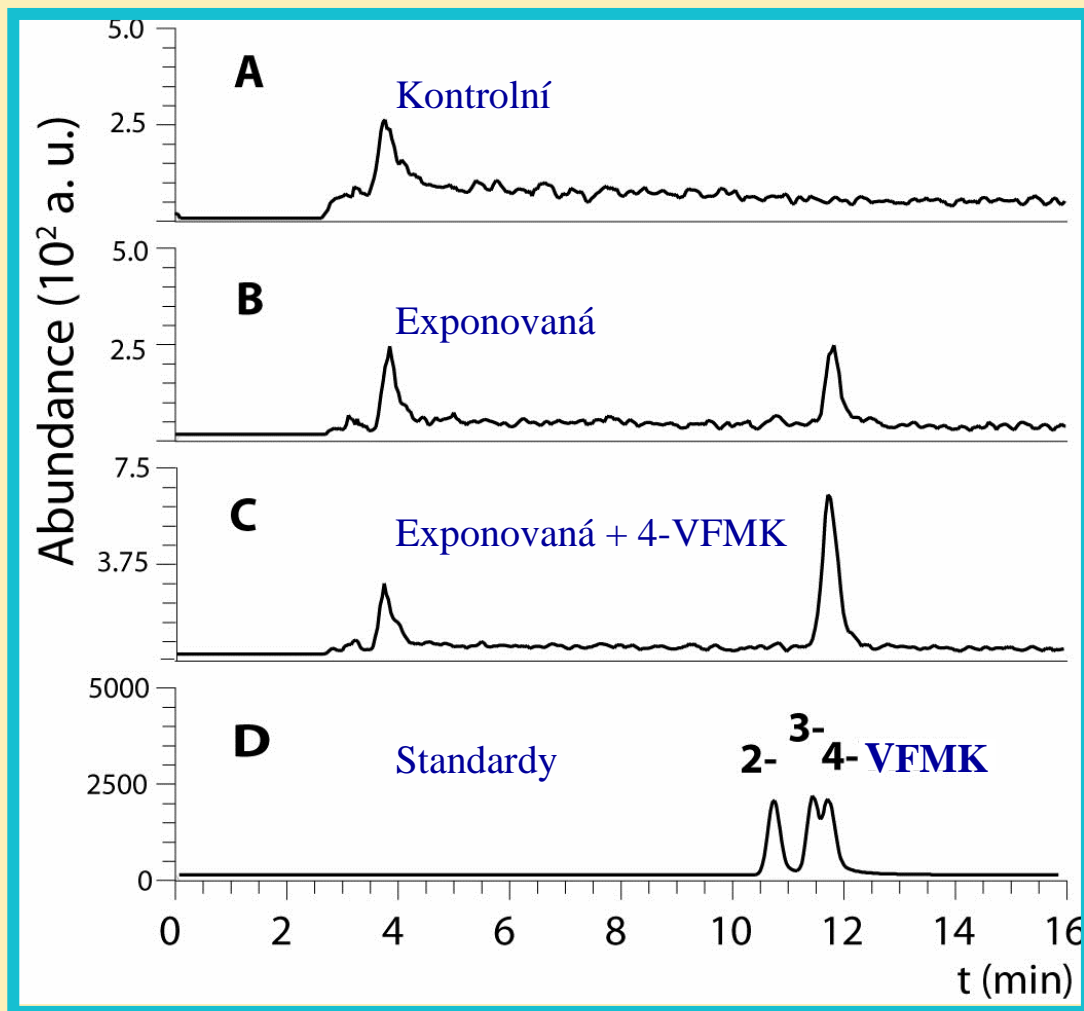
Poměr isomerů

2-VFMK : 3-VFMK : 4-VFMK = 2 : 1 : 6

Vylučování VFMK u lidí

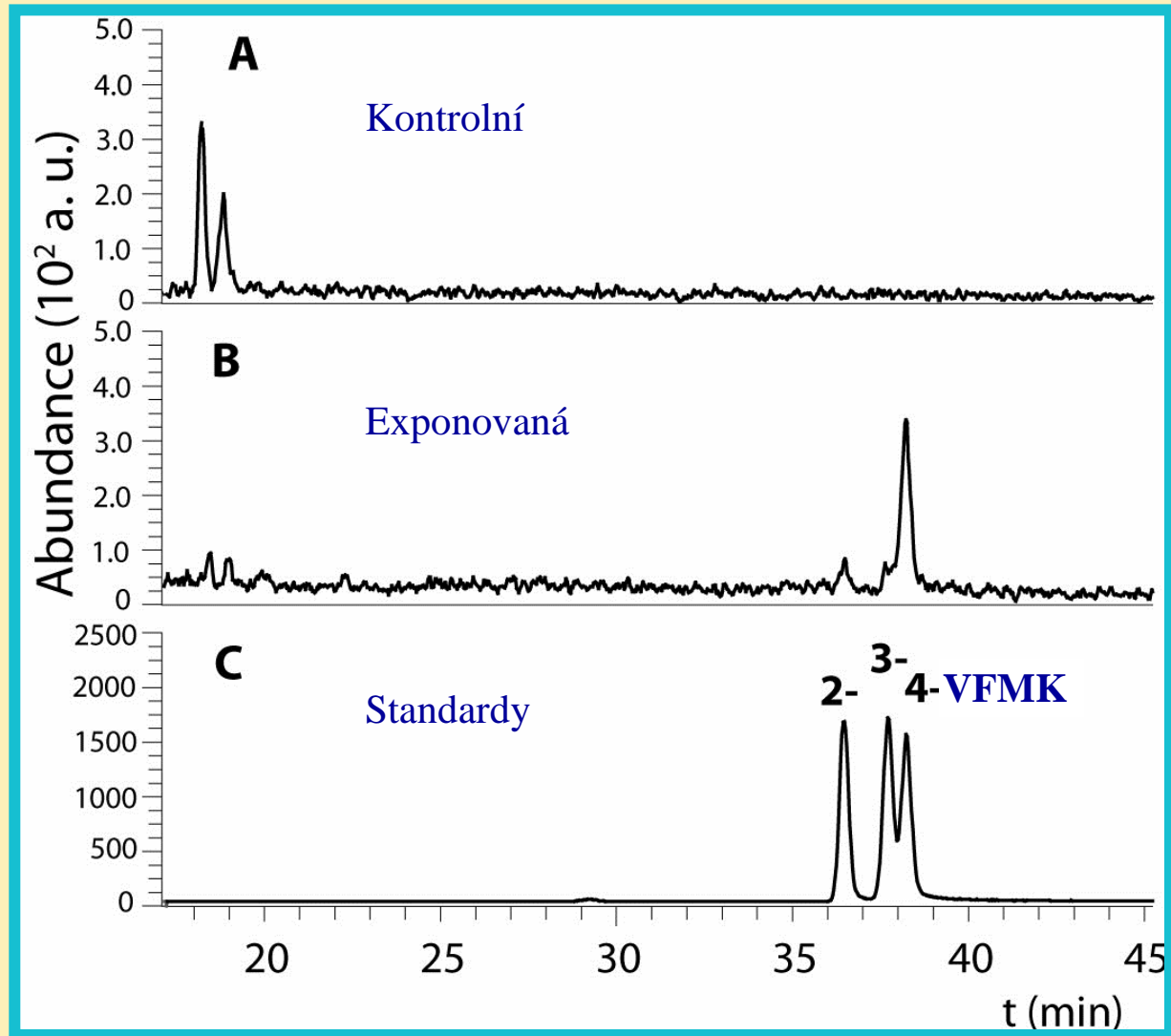
- Exponovaná skupina: Pracovníci laminovny (10 mužů)
- Kontrolní skupina: 6 nekuřáků neexponovaných styrenu
- Expozice: v rozmezí přibližně 23 až 244 mg/m³ (8 h)
- Odebírání vzorků moči: na konci ranní směny a ráno po směně
- Indikátory expozice: mandlová a fenylglyoxylová kyselina v moči, koncentrace vztažené ke kreatininu
- 4-VFMK kvantitativně stanovena pomocí HPLC-ESI-MS (negativní ionty)
- 2-VFMK a 3-VFMK prokázány kvalitativně, ve vybraných vzorcích stanoven poměr

HPLC-ESI-MS stanovení 4-VFMK v lidské moči

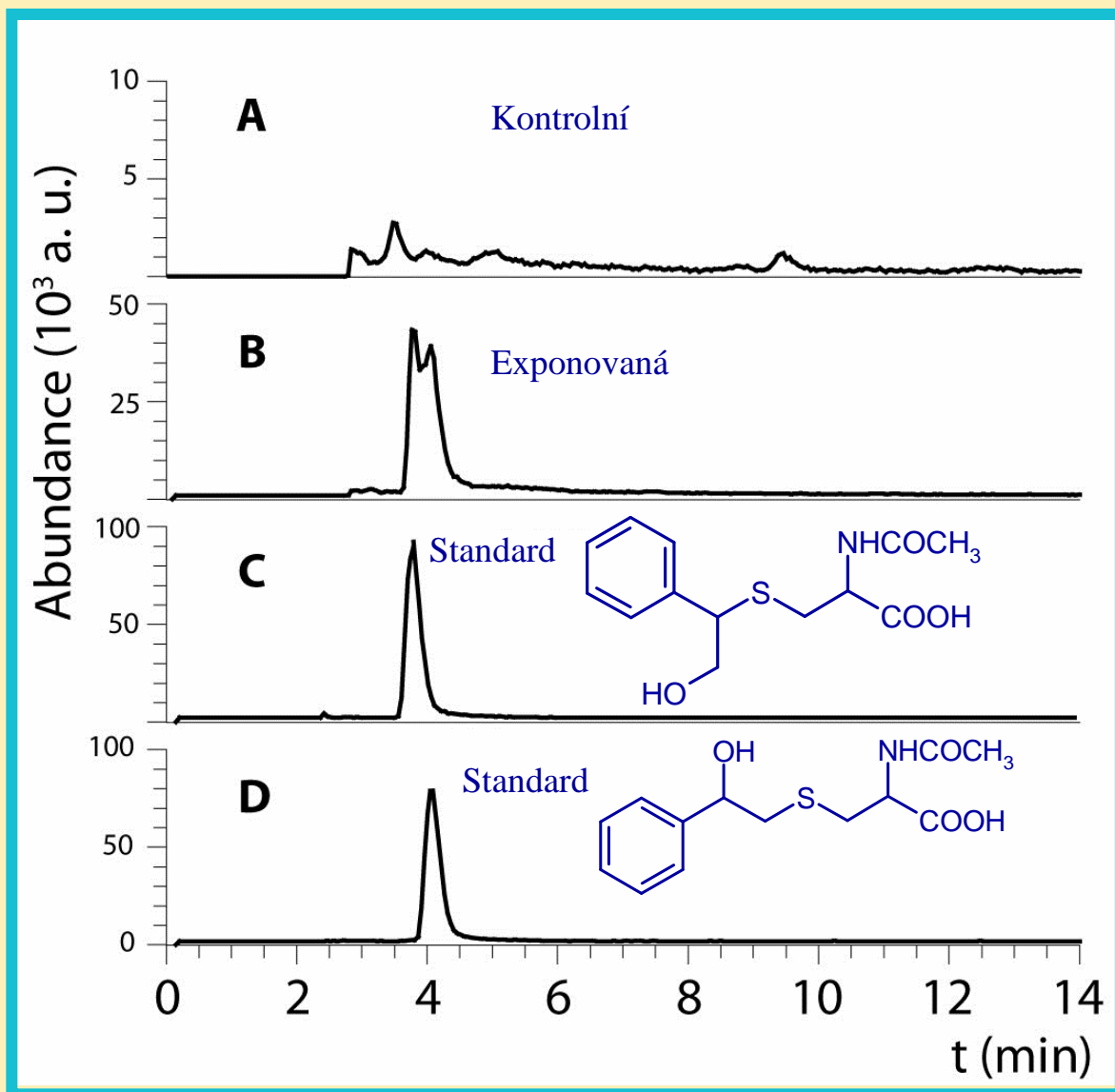


Sledován přechod
 m/z 264 \rightarrow 135 pro
selektivní detekci VFMK

Dělení isomerů VFMK



Merkapturové kyseliny odvozené od styren-7,8-oxidu

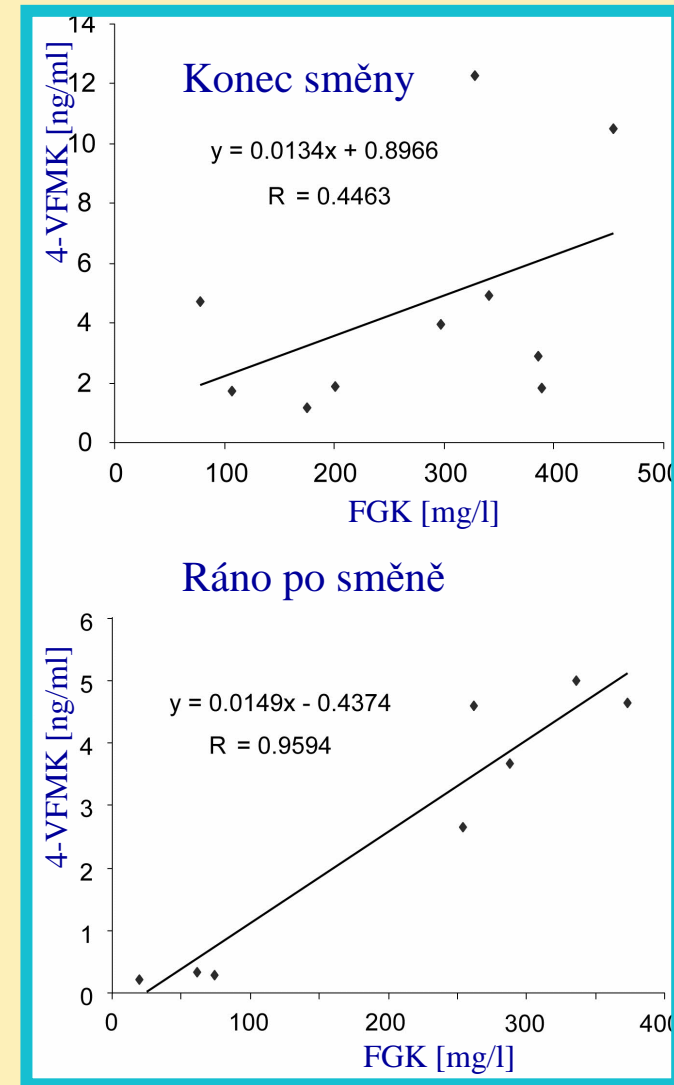
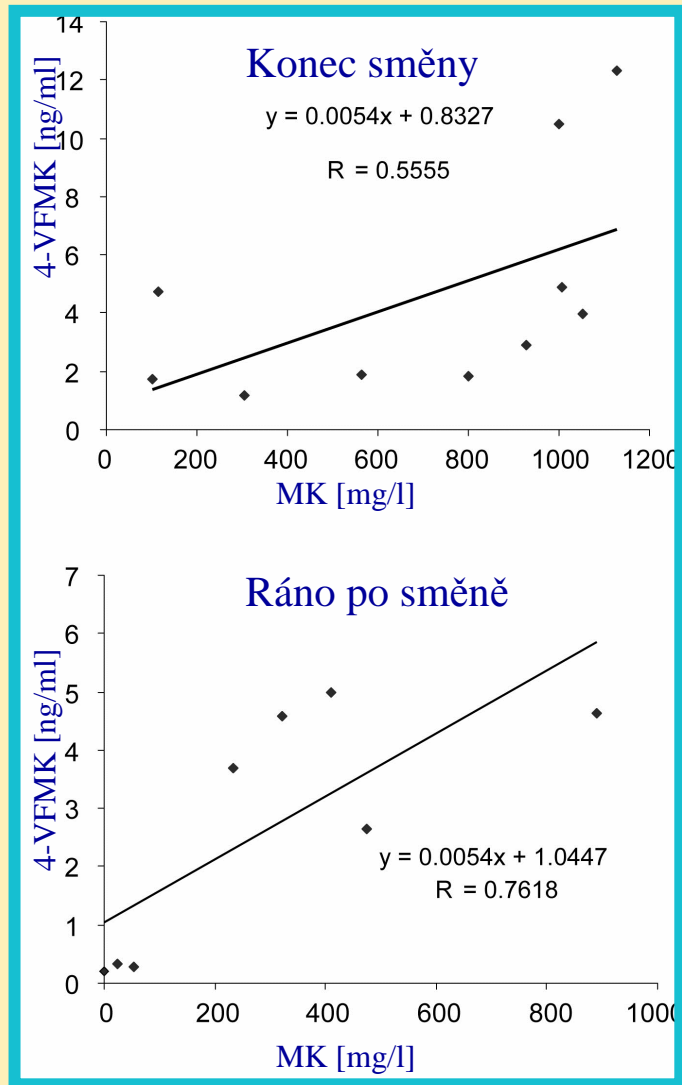


Vinylfenylmerkapturové kyseliny v moči lidí profesionálně exponovaných styrenu

MK + FGK [mg/g kreatininu]	Styren, dávka [mmol]	4-VFMK * [nmol]	ppm dávky
772 ± 456	8,43 ± 4,99	25,4 ± 18,6	3,8 ± 2,4

* Pouze stopy isomerů 2- a 3-VFMK (méně než 10 %)

Korelace 4-VFMK s mandlovou a fenylglyoxylovou kyselinou



Závěr

- V moči myši exponovaných styrenu byly identifikovány nové minoritní arylmerkapturové kyseliny a vinylfenoly, které ukazují na 3,4- a 2,3-styrenoxid (SO) jako reaktivní metabolické intermediáty.
- Nalezené arylmerkapturové kyseliny byly identifikovány jako *N*-acetyl-*S*-(2-, 3- a 4-vinylfenyl)cystein (2-, 3- a 4-VFMK), jejich poměr v moči myši byl 2:1:6.
- Stejně arylmerkapturové kyseliny byly nalezeny i v moči lidí pracovníků laminovny, exponovaných vysokým hladinám styrenu. Odhadnutá metabolická konverse styrenu na 4-VFMK činila asi 4 ppm. Tento majoritní isomer VFMK byl doprovázen stopami 2- a 3-VFMK.
- Reaktivní arenoxidy, 3,4- a 2,3-SO, jsou nově nepřímo identifikovanými elektrofilními intermediáty.
- Koncentrace 4-VFMK v močích odebraných další ráno po směně silně koreluje s koncentrací fenyglyoxylové kyseliny.
- 4-VFMK je biologickým indikátorem tvorby mutagenního 3,4-SO *in vivo*.

Poděkování

VŠCHT: Jan Krouželka, Jan Scharff, Milan Mališ

**SZÚ: Jaroslav Mráz, Vladimír Stránský (*in memoriam*), Šárka Dušková,
Ludmila Dabrowská, Hana Nohová, Ludmila Vodičková**

Granty:

**2B08051 NPVII, MŠMT ČR
MSM 604 613 73 01**