

STYREN A STYREN-7,8-OXID: METABOLISMUS A ANALYTICKÉ METODY STANOVENÍ ADUKTŮ S PROTEINY

MICHAL JÁGR^a, VĚRA PACÁKOVÁ^b
a MIROSLAV PETŘÍČEK^a

^a Mikrobiologický ústav, AV ČR, v.v.i., Vítězská 1083,
142 20 Praha 4, ^b Katedra analytické chemie, Přírodově-
decká fakulta, Univerzita Karlova v Praze, Hlavova 8,
128 43 Praha 2
michal.jagr@centrum.cz

Došlo 9.9.08, přepracováno 28.1.09, přijato 12.3.09.

Klíčová slova: styren, styren-7,8-oxid, adukty, metabolis-
mus, biologické monitorování

Obsah

1. Úvod
2. Styren a styren-7,8-oxid
 - 2.1. Vlastnosti a použití
 - 2.2. Metabolismus styrenu a styren-7,8-oxidu
3. Adukty styren-7,8-oxidu s proteiny
4. Metody stanovení aduktů styren-7,8-oxidu s proteiny
 - 4.1. Metoda modifikované Edmanovy degradace
 - 4.2. Metoda s použitím Raneyova niklu
 - 4.3. Metoda alkalické hydrolýzy
 - 4.4. Ostatní metody
5. Závěr

1. Úvod

Styren je jednou z nejdůležitějších průmyslových surovin¹. Po vstupu do organismu se v játrech metabolizuje převážně na styren-7,8-oxid (SO). Naprostá většina takto vzniklého SO podléhá dalším detoxifikačním procesům, jejichž hlavním produktem je kyselina mandlová a kyselina fenyglyoxylová^{2–4}. Menší část SO se uvolňuje do krve, kde se může navazovat na zde přítomné organické biomakromolekuly, zejména na proteiny či DNA⁵. Takto vznikají stabilní kovalentní sloučeniny, tzv. adukty. Z hlediska biologického monitorování mají největší význam adukty s krevními proteiny. Zvláštní pozornost je věnována aduktům průmyslových škodlivin s globinem, které jsou používány jako biomarkery expozice. Zde se s výhodou využívá jejich dlouhodobé perzistence v organismu, díky tomu mohou adukty sloužit jako dozi-

metry expozice trvající až několik měsíců⁶. Hlavním mechanismem, kterým adukty vznikají, je reakce elektrofilních cizorodých látek s nukleofilními atomy či skupinami. V případě vzniku aduktů s proteiny se jedná o atak elektrofilu na reziduální skupiny aminokyselin⁷.

Klasické a dosud používané metody pro biologické monitorování expozice parám styrenu stanovují hlavní metabolity styrenu (kyselinu mandlovou a fenyglyoxylovou) vylučované v moči. Tyto metody se ale potýkají s nízkým biologickým poločasem vylučování, který činí řádově hodiny. Proto jsou zkoumány alternativní cesty založené na stanovení konkrétních proteinových aduktů SO. Publikované metody stanovení proteinových aduktů SO jsou založeny zejména na použití modifikované Edmanovy degradace (MED), která se využívá ke stanovení aduktů SO s *N*-koncovým valinem⁸. Další metody jsou založeny na selektivním štěpení vazby mezi SO a aminokyselinou cysteinem pomocí Raneyova niklu, extrakci uvolněného fenylethanolu a jeho stanovení⁹. Možné je i použití zásadité hydrolýzy proteinu. Analýzou uvolněného styrenglykolu lze pak nepřímo stanovit estery SO s kyselinou asparagovou a kyselinou glutamovou¹⁰. Další publikované postupy využívají totální kyselou nebo enzymovou hydrolýzu proteinu na volné aminokyseliny za současného uvolnění aduktů SO a stanovení těchto aduktů citlivými analytickými technikami^{11–14}.

2. Styren a styren-7,8-oxid

2.1. Vlastnosti a použití

Styren se používá jako monomer při výrobě plastických hmot, je základem při výrobě syntetického kaučuku, gum, nátěrových hmot a obalových materiálů^{1,2}. Tyto výroby probíhají převážně v uzavřených systémech, které zabraňují úniku styrenu do okolního prostředí. Velké množství vyrobeného styrenu je spotřebováno na výrobu laminovaných polystyrenových pryskyřic, kde se styren uplatňuje současně jako monomer i jako rozpouštědlo. Laminované pryskyřice se s výhodou používají např. v loďařském průmyslu při výrobě trupů lodí. V těchto výrobcích s vysokým podílem ruční práce dosahují koncentrace styrenu v ovzduší hodnot řádově až stovky mg m⁻³, přičemž pro Českou republiku činí příslušný hygienický limit PEL (přípustný expoziční limit) 200 mg m⁻³. Protože možnosti osobní ochrany na těchto pracovištích jsou omezené, expozice pracovníků parám styrenu zde bývají značně vysoké. Vzhledem k nepříznivým zdravotním účinkům styrenu a vysokému počtu osob vystavených jeho působení, se jedná o významný hygienický problém. Styren byl detegován i v některých potravinách, v tabákovém kouři

Tabulka I

Základní fyzikálně-chemické vlastnosti styrenu a styren-7,8-oxidu

Parametr	Styren	Styren-7,8-oxid
M_r	104,15	120,15
Fyzikální vzhled	bzb. kapalina	bzb. kapalina
Teplota tání, °C	–30,6	–36,7
Teplota varu, °C	145,2	194,1
Tenze par, kPa	867 při 25 °C	< 133 při 20 °C
Rozpustnost	málo rozpustný ve vodě (0,3 g l ^{–1} , 20 °C), rozpustný v benzenu a petrol-etheru	málo rozpustný ve vodě (3 g l ^{–1} , 25 °C), rozpustný v acetonu, benzenu, heptanu a methanolu

a ve výfukových plynech¹.

Důležitost SO jako průmyslové suroviny je ve srovnání se styrenem mnohem nižší, neboť se používá v průmyslu v mnohem menší míře, např. jako přísada do různých polymerů či kopolymerů. Hlavní význam SO spočívá v jeho roli hlavního meziprojektu metabolismu styrenu. Expozice styrenu u lidí se v průmyslových provozech děje převážně inhalační cestou. Cca 94 % vdechnutého styrenu je zadrženo v plicích a vstřebáno do krve¹⁵. Jiný autor uvádí pro množství zadržného styrenu nižší údaj: 66,5 % (cit.¹⁶). Vstřebaný styren je krví transportován do jater, kde dochází k jeho metabolické přeměně. V tabulce I jsou shrnuty hlavní fyzikálně-chemické vlastnosti styrenu a SO.

Styren je mírně až středně toxický pro člověka a laboratorní zvířata. U potkana byl pro orální expozici styrenu stanoven index akutní toxicity LD₅₀ = 5000 mg kg^{–1}, zatímco pro myš je styren o něco toxičtější LD₅₀ = 320 mg kg^{–1}. Pro intraperitoneální a intravenózní podání styrenu myším činí LD₅₀ = 660 mg kg^{–1} či 90 mg kg^{–1} (cit.¹⁷).

Nejzávažnějším biologickým efektem styrenu je jeho genotoxicita. U osob profesionálně exponovaných styrenu byl nalezen zvýšený počet různých typů chromosomových aberací, DNA zlomů, mutací na některých genech, apod. Proto byl styren Mezinárodní agenturou pro výzkum rakoviny (International Agency for Research on Cancer, IARC) zařazen do kategorie 2B jako možný genotoxický a karcinogenní rizikový faktor u člověka¹⁸.

SO je díky přítomnosti epoxidové skupiny mnohem reaktivnější látkou než styren, např. u lidí je jeho reaktivita cca o 2 řády vyšší než reaktivita styrenu¹⁹. Také přímé účinky SO na organismy jsou mnohem nepříznivější. Studie vlivu SO provedená na laboratorních zvířatech prokázala jeho karcinogenní a mutagenní schopnosti²⁰. Proto byl SO zařazen IARC do skupiny 2A jako pravděpodobný lidský karcinogen.

2.2. Metabolismus styrenu a styren-7,8-oxidu

Hlavní metabolickou cestou biotransformace styrenu je oxidace jeho dvojné vazby na epoxidovou skupinu. Tato přeměna je v játrech katalyzována cytochromy P450 (CYP), což jsou terminální oxidoreduktasy monooxygenase systému. Tímto způsobem je přes 95 % absorbované dávky styrenu přeměněno na SO (cit.¹⁷).

Enzymy se v organismu vyskytují ve více katalyticky a strukturně podobných formách, tzv. isoenzymech. Jednotlivé CYP isoenzymy vykazují vzájemně rozdíly ve schopnosti katalyzovat oxidaci styrenu na SO. U lidí patří mezi nejvýznamnější isoenzymy metabolizující styren a vyskytující se v mikrosomech jater zejména CYP2B6, CYP2C8 a CYP2E2. Zatímco v mikrosomech potkaních jater patří mezi nejvýznamnější CYP2C11/6 (cit.⁴).

Díky přítomnosti chirálního uhlíku existuje molekula SO ve dvou enantiomerních formách (*R*)-SO a (*S*)-SO. Oba dva enantiomery vznikají *in vivo* v organismech ze styrenu. Byly zjištěny rozdíly v toxicitě obou enantiomerů. (*R*)-SO je více mutagenní v Amesově testu vůči mikroorganismům *Salmonella typhimurium* než (*S*)-SO (cit.²¹).

Naprostá většina SO vzniklého v játrech podléhá dalšímu metabolismu, zejména hydrolyze za účasti enzymů epoxidhydrólasy na styren glykol, který je následně oxidován na kyselinu mandlovou a kyselinu fenylglyoxylovou. Menší část SO se uvolňuje přímo do krve, kde může podléhat dalším reakcím. Obsah SO v krvi lze stanovit metodou GC (cit.²²). Christakopoulos a spol.²³ sledovali koncentraci SO v krvi pracovníků profesionálně vystavených parám styrenu o průměrné koncentraci styrenu v ovzduší 75 ppm. Průměrná hladina SO v krvi byla 90 nmol l^{–1} (v rozmezí 40–130 nmol l^{–1}). Přímé stanovení SO v krvi se ale pro rutinní účely biologického monitorování do dnešní doby neujalo.

Ve schématu 1 je uveden stručný přehled hlavních drah metabolismu styrenu a SO s vyznačením nejvýznamnějších metabolitů. U člověka se v konečném důsledku na kyselinu mandlovou a fenylglyoxylovou přemění až kolem 90 % z absorbované dávky styrenu. Obě dvě kyseliny jsou posléze z organismu vyloučeny močí, kde jsou nejčastěji stanovovány metodami HPLC^{24–26}. Alternativa k těmto metodám byla popsána ve studii Halliera a spol.²⁷, kteří stanovili oba optické isomery kyseliny mandlové metodou TLC na chirálních deskách. Minoritními produkty této větve metabolismu SO, které jsou také vylučovány v moči, jsou kyselina hippurová a kyselina fenylaceturová.

Stanovení kyseliny mandlové a kyseliny fenylglyoxylové v moči dnes představuje běžný a klasický nástroj biologického monitorování krátkodobé expozice člověka styrenu³. Hlavní nevýhodou tohoto způsobu stanovení je krátký biologický poločas vylučování těchto metabolitů (řádově hodiny). To znemožňuje stanovit dlouhodobé kumulativní vystavení organismu styrenu nebo jednorázovou expozici po uplynutí doby delší než 1 den.

Kromě výše zmíněné hlavní metabolické dráhy podléhá menší část SO v játrech účinkem enzymů glutathion-

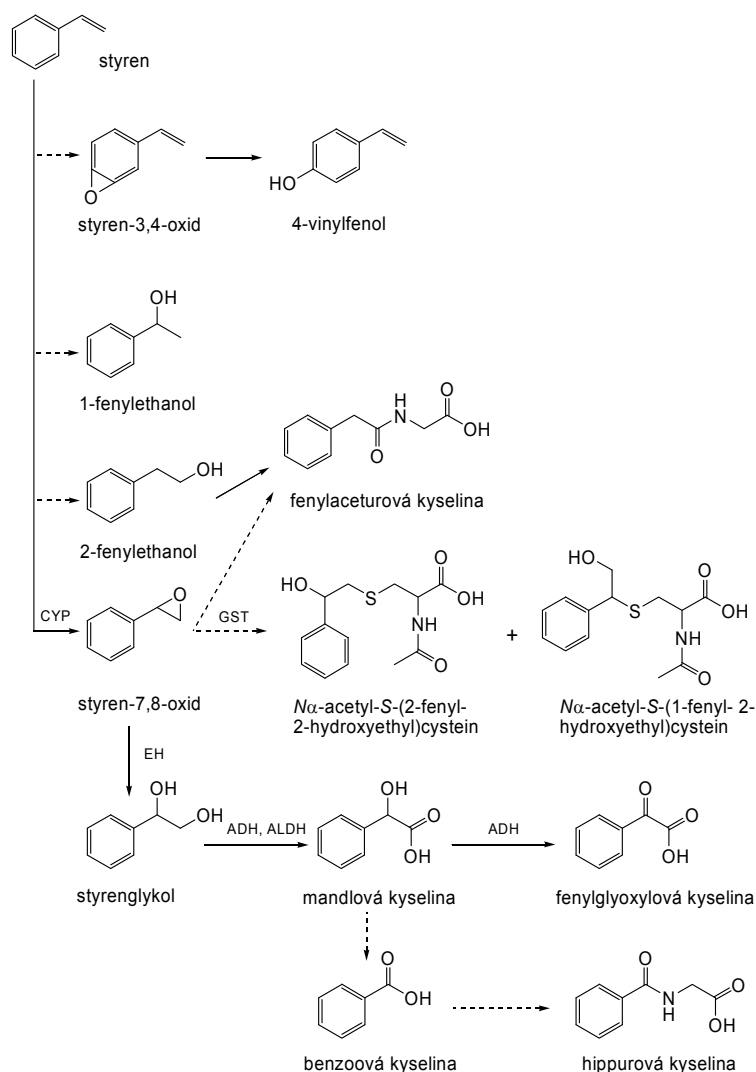


Schéma 1. Přehled hlavních metabolických drah styrenu a styren-7,8-oxidu. ADH – alkohol dehydrogenasa; ALDH – aldehyd dehydrogenasa; CYP – cytochrom P450 monooxygenasa; EH – epoxid hydrolasa; GST – glutathion *S*-transferasa

transferas reakci s tripeptidem glutathionem za vzniku *S*-konjugátů glutathionu, které jsou dále transformovány na tzv. *N*α-acetyl-*S*-fenylhydroxyethylcysteiny (merkapturové kyseliny). Při tom dochází ke vzniku dvou regioisomerů, *N*α-acetyl-*S*-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinu (PHEMA1) a *N*α-acetyl-*S*-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinu (PHEMA2). Každý regioisomer merkapturové kyseliny se díky přítomnosti dvou chirálních uhlíků může *in vivo* vyskytovat ve formě dvou diastereomerů, celkem tedy merkapturové kyseliny mohou poskytovat čtyři možné diastereomery. Delbressine a spol.²⁸ popsali výskyt těchto čtyř diastereomerů merkapturových kyselin v moči potkanů exponovaných styrenu *in vivo*.

Yagen a spol.²⁹ podávali mořským organismům *Pseudopleuronectes americanus* konjugát SO s glutathionem

značený uhlíkem ¹⁴C. Poté v jejich moči detegovali nejen merkapturové kyseliny, ale překvapivě i adukty SO s cysteinem. Stanovení merkapturových kyselin v moči pracovníků exponovaných styrenu metodou HPLC s UV detektorem bylo popsáno ve studii Maestri a spol.²⁶. Limit detekce merkapturových kyselin v této studii činil cca 7 μg ml⁻¹ moči. V poslední době byly popsány i jiné citlivé metody stanovení merkapturových kyselin v moči, využívající LC-MSⁿ či HPLC s fluorescenčním detektorem²⁵.

Vedlejší alternativní metabolickou drahou detoxifikace styrenu je oxidace probíhající přímo na aromatickém jádře za vzniku styren-3,4-oxidu, který je následně transformován na 4-vinylfenol^{30,31}. 4-Vinylfenol byl zjištěn v hydrolyzátu moče pracovníků vystavených parám styre-

nu, jeho obsah ale odpovídal jen cca 0,3 % obsahu kyseliny mandlové³². Toxikologický význam této oxidace, od níž se odvozuje několik dalších minoritních metabolitů nalezených v moči laboratorních myší, byl též předmětem dalšího výzkumu³³.

Metabolismus styrenu se u lidí a u laboratorních zvířat (potkanů a myší) kvantitativně liší. Byly pozorovány významné mezidruhové rozdíly ve vzájemném poměru hlavních metabolitů styrenu. Zatímco u člověka tvoří kyselina mandlová a fenylglyoxylová až 95 % absorbované dávky styrenu, u potkana je to jen 80 %. Na druhou stranu metabolická dráha biotransformace SO na merkapturové kyseliny je u potkanů mnohem významnější než u člověka. Vylučování merkapturových kyselin u potkana představuje cca 10 % z absorbované dávky styrenu^{24,34,35}, zatímco u člověka činí podíl merkapturových kyselin mezi všemi metabolity vylučovanými v moči méně než 1 % (cit.^{36,37}).

Na metabolismus styrenu má vliv i současná konzumace jiných látek, které mají vliv na hladinu mikrosomálních enzymů³⁸. Takovouto běžně užívanou látkou je např. ethanol v alkoholických nápojích. Ve studii Coccini a spol.³⁹ bylo studováno vylučování merkapturových kyselin u laboratorních potkanů, kterým byla podávána tekutá potrava obsahující 5 % ethanolu za současného vystavení potkanů parám styrenu. Podávaný ethanol způsobil zvýšené vylučování kyseliny mandlové a merkapturových kyselin ve srovnání s kontrolní skupinou potkanů.

Jak již bylo řečeno, jednotlivé metabolické přeměny styrenu, resp. SO, jsou katalyzovány biotransformačními enzymy ze skupiny cytochromů P450, epoxidhydrolas a glutathiontransferas, přičemž u řady jednotlivých isoenzymů byl popsán genetický polymorfismus. Výskyt různých forem těchto isoenzymů a jejich kombinace mají vliv na rychlost dílčích metabolických reakcí, a tím i na koncentraci SO v cílových tkáních. S tím souvisí riziko vzniku genetického poškození. Genotypizace biotransformačních enzymů je proto významným prostředkem k posouzení individuální vnímavosti k nepříznivým účinkům expozice styrenu⁴⁰.

Stereoselektivita metabolismu SO s lidskými jaterními enzymy *in vitro* byla studována Wenkerem a spol.⁴¹. Hydrolýza racemické směsi SO mikrosomálními epoxidhydrolasami na styrenglykol probíhala stereospecificky mechanismem bimolekulární nukleofilní substituce. Toxický enantiomer (*R*)-SO byl rychleji hydrolyzován než jeho méně toxický protějšek (*S*)-SO. V následné studii autoři studovali stereoselektivitu metabolismu u lidí *in vivo*⁴². Byly zjištěny významné interindividuální rozdíly ve složení metabolitů SO vylučovaných močí (kyselina mandlová, kyselina fenylglyoxylová aj.) i ve vzájemném poměru jejich enantiomerů. Průměrný poměr (*S*)-kyseliny mandlové ku (*R*)-kyselině mandlové v moči činil cca 1,6:1.

Stereoselektivita metabolismu styrenu u lidí profesionálně exponovaných styrenu byla studována v pracích Korna a spol.^{43–45}. Tito autoři vypracovali GC metodu pro dělení optických enantiomerů kyseliny mandlové na koloně Chirasil-L-Val. Podobně byly studovány také další chirální metabolity styrenu, konkrétně (*R*)/(*S*)-1-fenylethanol

a (*R*)/(*S*)-fenylethylenglykol.

Foureman a spol.³⁸ prostudovali metabolismus oxidace styrenu mikrosomálními enzymy izolovanými z jater laboratorních potkanů. U kontrolních potkanů převažovala oxidace styrenu na (*S*)-SO vs. (*R*)-SO v poměru 1,54:1. Vzhledem k tomu, že různé cytochrom P450 isoenzymy vykazují různou stereoselektivitu oxidace styrenu na SO, tak u potkanů, kterým byl předem podán fenobarbital nebo β -naftoflavon, se tento poměr změnil na 1,09:1 či 0,8:1.

Metabolismus styrenu a SO *in vivo* u laboratorních potkanů byl též obšírně prostudován Linhartem a spol.⁴⁶. I v této studii byla u potkanů pozorována vyšší metabolická produkce (*S*)-SO než (*R*)-SO. Po podání styrenu nebo racemické směsi SO byla u nich pozorována produkce všech čtyř možných diastereomerů merkapturových kyselin [(*R,R*)-PHEMA1, (*S,R*)-PHEMA1, (*R,R*)-PHEMA2 a (*S,R*)-PHEMA2]. Pokud ale byl potkanům podáván pouze (*S*)-SO, pak došlo k produkci jen dvou diastereomerů merkapturových kyselin [(*R,R*)-PHEMA1 a (*S,R*)-PHEMA2], zatímco po podání (*R*)-SO byly vylučovány v moči ostatní dva diastereomery [(*S,R*)-PHEMA1 a (*R,R*)-PHEMA2]. Tak bylo prokázáno, že tvorba konjugátů SO s glutathiontransferasou, která předchází tvorbě merkapturových kyselin, probíhá stereospecificky mechanismem bimolekulární nukleofilní substituce. Na druhou stranu, biotransformace (*R*)-SO na kyselinu mandlovou zcela stereospecifická nebyla, vznikala nejen (*R*)-kyselina mandlová, ale i (*S*)-kyselina mandlová a to v poměru 2,57:1. Podobnou studii provedli Linhart a spol.³³ i na laboratorních myších. Na rozdíl od potkanů byla u myší po podání styrenu pozorována vyšší produkce toxického (*R*)-SO, která je tak možná zodpovědná za relativně vyšší citlivost myší k nepříznivým účinkům styrenu a SO ve srovnání s potkanem a člověkem. Pomocí NMR analýzy diastereomerů merkapturových kyselin vylučovaných v moči byla u myší pozorována vyšší produkce PHEMA2 než PHEMA1 (v poměru 5,6:1), na rozdíl od předchozí studie, kde u potkanů činil tento poměr cca 2:1 ve prospěch PHEMA1. Metabolismus styrenu byl do dnešní doby též přehledně zpracován do několika obsáhlých přehledných článků^{2,4,47}.

3. Aduktý styren-7,8-oxidu s proteiny

První obecné využití proteinových aduktů jako možných biomarkerů vnitřní expozice cizorodým látkám navrhli Osterman-Golkar a spol.⁴⁸. Původním cílem jejich studie bylo stanovení efektivní dávky mutagenních látek v DNA v kritickém místě. Protože však cílová tkáň nebyla při běžných studiích vždy dostupná, jako náhražka byl použit hemoglobin. Později byla prokázána tvorba hemoglobinových aduktů téměř pro všechny látky poskytující adukty s DNA. Korelace mezi oběma typy aduktů bývá velmi dobrá, přičemž hladina hemoglobinových aduktů je často mnohem vyšší. Tak byly vytvořeny předpoklady pro využití hemoglobinových aduktů a přeneseně i aduktů s jinými krevními proteiny jako biomarkerů expozice.

Proteinové adukty, které se dají využít k biologickému monitorování, vznikají prakticky výhradně s krevními proteiny, a sice s těmi, jejichž obsah v krvi je nejvyšší. Týká se to hemoglobinu obsaženého v erythrocytech, který má relativní molekulovou hmotnost $M_r \sim 64\,500$ a v krvi člověka je obsažen v koncentraci cca 150 mg ml^{-1} a sérového albuminu o $M_r \sim 68\,500$, který se vyskytuje v krevní plazmě člověka v koncentraci $30\text{--}45\text{ mg ml}^{-1}$. Průměrná doba života hemoglobinu je přímo spjata s dobou života červených krvinek a u člověka činí 126 dní, zatímco u potkanů 60 dní a u myši 40 dní⁴⁹. Doba života lidského sérového albuminu činí cca 20 dní, zatímco u potkanů je to jen 2,5 dne a u myši 1,9 dne^{50,51}.

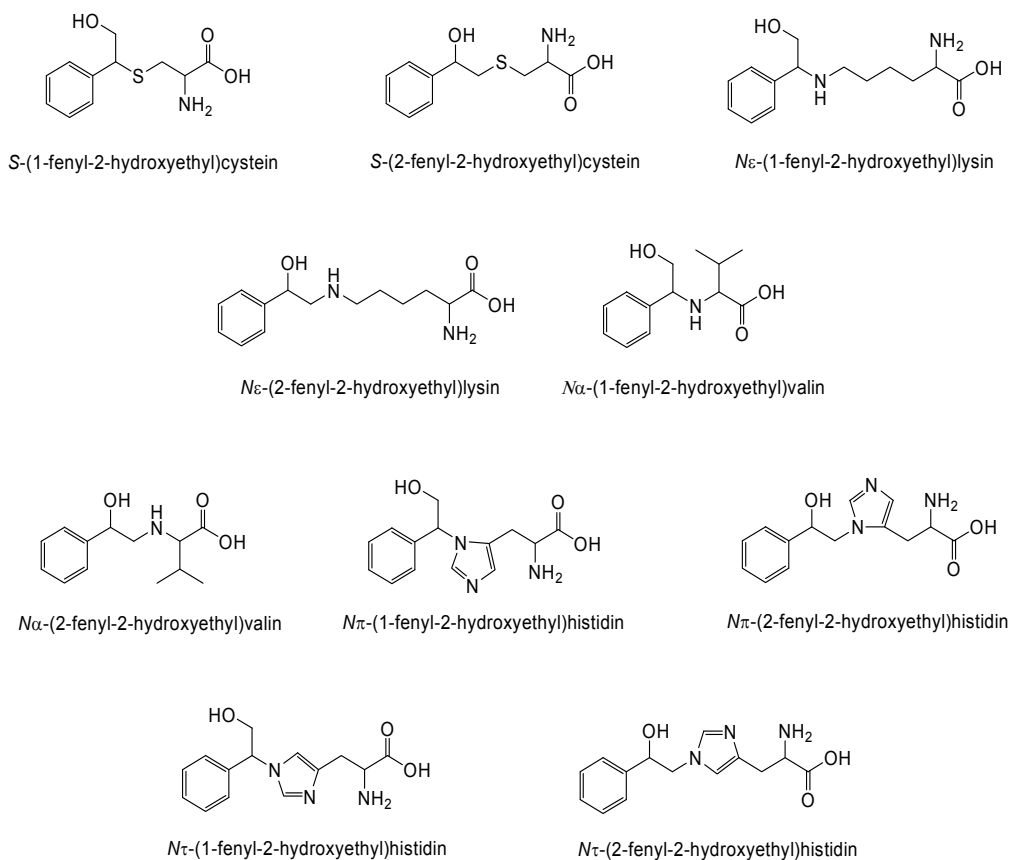
SO se s různou mírou intenzity váže na nukleofilní vazebná místa přítomná v globinu či v sérovém albuminu. Nejčastěji se váže na α -aminoskupinu *N*-koncové aminokyseliny (např. valinu u globinu), thiolovou skupinu v cysteinu a oba imidazolové dusíky v histidinu (obr. 1)^{14,52,53}. Dále se může vázat i na ε -aminoskupinu lysinu, hydroxylovou skupinu serinu a karboxylovou skupinu kyseliny asparagové a glutamové. Vzhledem k tomu, že reaktivita těchto nukleofilních skupin vůči SO je různá, jsou i vzniklé SO adukty obsaženy v proteinu v různé míře.

Jak již bylo řečeno, SO je chirální molekula s jedním

stereogenním centrem na epoxidickém uhlíku, takže se může vyskytovat ve dvou enantiomerních formách: (*R*)-SO a (*S*)-SO. Díky tomu, že reakce SO s nukleofilní skupinou může probíhat na obou elektrofilních epoxidových uhlících (C_α nebo C_β), vznikají dva možné typy regioisomerů: 1-fenyl-2-hydroxyethyl (21HPE) a 2-fenyl-2-hydroxyethyl (22HPE). Vzhledem k tomu, že aminokyselina též obsahuje jedno stereogenní centrum, dochází při její reakci s racemickou směsí SO obvykle ke vzniku dvou párů diastereomerů. Pokud reakce SO s nukleofilní skupinou aminokyseliny probíhá stereoselektivně S_N2 mechanismem, pak při vzniku 21HPE regioisomerů dochází k inverzi absolutní konfigurace na uhlíku C_α , zatímco tvorba 22HPE regioisomerů probíhá za zachování původní konfigurace na uhlíku C_β .

Dlouhá doba života hemoglobinu a jeho aduktů v krvi, dovolující monitorování dlouhodobé expozice spolu s jeho snadnou izolací z krve, stála za velkým počtem studií zabývajících se zkoumáním aduktů různých látek s krevními proteiny, zejména s globinem. V tomto případě izolační postup přípravy globinu z hemoglobinu zahrnuje odstranění hemu z hemoglobinu, čímž se připraví čistý globin.

Charakteristickou vlastností proteinových aduktů je



Obr. 1. Struktura aduktů styren-7,8-oxidu s cysteinem, histidinem, lysinem a valinem přítomných v hemoglobinu

jejich dlouhodobá perzistence v organismu. Až na výjimky se v organismu vyskytují po celou dobu životnosti biomakromolekuly. Vzhledem k tomu, že se u hemoglobinových aduktů neuplatňuje selektivní enzymové odbourávání aduktů, jako v případě DNA, zjištěná hladina odráží kumulativní expozici po celé období životnosti. Díky tomu se biologické monitorování těchto aduktů výborně hodí ke sledování dlouhodobé kumulativní expozice organismu. Kromě toho lze vznik těchto aduktů využít i ke stanovení jednorázové expozice, zejména pokud je dostatečně vysoká. Kinetiku tvorby a odstraňování hemoglobinových aduktů při různém časovém průběhu expozice lze popsat modelem, kde vstupními údaji jsou kinetické parametry po jednorázové expozici. Mezi modelem a experimentálními výsledky existuje dobrá shoda⁵⁴.

4. Metody stanovení aduktů styren-7,8-oxidu s proteiny

Do dnešní doby bylo vyvinuto mnoho analytických technik a postupů, jejichž účelem je studium a využití aduktů SO s krevními proteiny, zejména s globinem. V závislosti na typu zkoumaných aduktů jsou některé z nich velmi specifické, citlivé a zaměřené jen na jeden druh aduktu, jiné jsou univerzálnější, schopné současně analyzovat více druhů aduktů. Každá technika má svoje výhody i nevýhody, které vymezují možnosti jejího použití.

4.1. Metoda modifikované Edmanovy degradace

Modifikovaná Edmanova degradace (MED) se využívá ke stanovení aduktů s *N*-koncovou aminokyselinou. V případě lidského globinu je touto aminokyselinou výhradně valin. Pomocí činidla pentafluorfenylisothiokyanátu dochází za mírně alkalických podmínek k selektivnímu odštěpení *N*-koncového valinu s navázanou molekulou (např. SO) z globinového řetězce. Odštěpená molekula je převedena na svou cyklickou formu, 1-fenylhydroxyethyl-2-thio-3-pentafluorfenyl-5-isopropylhydantoin, který je z reakční směsi selektivně extrahován a stanoven metodou GC-MS s negativní chemickou ionizací⁵⁵. Tato velmi selektivní a citlivá metoda byla aplikována ke studiu aduktů SO s *N*-koncovým valinem (SO-Val)⁵⁶.

První použití MED ke studiu aduktů SO bylo publikováno ve článku Nordqvist a spol.⁵⁷, kteří intraperitoneálně podávali myším styren radioaktivně značený ¹⁴C. Po izolaci hemoglobinu a aplikaci MED zjistili, že adukty SO-Val tvoří jen 3 % z celkového SO navázaného na hemoglobin. Další autoři aplikovali metodu MED ke studiu aduktů SO-Val nejen u laboratorních zvířat, ale i u lidí exponovaných styrenu a SO *in vivo*. Tak Christakopoulos a spol. studovali stabilitu a kinetiku vzniku aduktů SO-Val a jejich korelaci s DNA adukty a s vylučováním metabolitů styrenu (kyselina mandlová a styren glykol) v moči²³. Autoři této studie se u osob profesionálně vystavených parám styrenu (expozice kolem 300 mg m⁻³) potýkali s velmi nízkou hladinou aduktů SO-Val, která se pohybovala na hranici

meze stanovitelnosti. U 7 exponovaných osob našli průměrnou hladinu aduktů SO-Val 28 pmol g⁻¹ globinu, avšak pozitivní nálezy byly zaznamenány i u osob neexponovaných. Následně Severi a spol.⁵⁸ nenašli po aplikaci MED adukty SO-Val u žádného pracovníka, který byl součástí pracovní skupiny exponované průměrně 8 ppm styrenu v ovzduší. Na druhou stranu byla ve studii pocházející ze současné doby nalezena významně vyšší hladina aduktů SO-Val (5,98 pmol g⁻¹ globinu) u skupiny čítající 75 profesionálně exponovaných pracovníků ve srovnání s kontrolní skupinou 77 osob (2,59 pmol g⁻¹ globinu)⁵⁹.

Osterman-Golkar a spol.⁶⁰ studovali metodou MED vznik aduktů SO-Val u laboratorních potkanů a myši exponovaných styrenu a SO *in vivo*. Při zkoumání vztahu mezi hladinou aduktů SO-Val a mírou expozice zjistili, že tato závislost je pro nižší dávky (cca do 0,4 mmol SO/kg živé hmotnosti) lineární, ale pro vyšší dávky strmost křivky stoupá, zřejmě díky nasycení mechanismů odbourávání SO. Na tuto studii navázal Pauwels⁶¹, který podával intraperitoneálně styren laboratorním myším v rozmezí 0 až 4,35 mmol kg⁻¹ živé váhy. Výsledná hladina aduktů SO-Val byla zjištěna v rozmezí < 10 až 305 pmol g⁻¹ hemoglobinu.

Johansson a spol.¹⁶ exponovali čtyři dobrovolníky parám styrenu značeného ¹³C o koncentraci 50 ppm po dobu 2 h. Poté v jejich krvi našli jen stopy aduktů SO-Val značených ¹³C, jejichž průměrná odhadnutá hladina byla 0,3 pmol g⁻¹ globinu. Takto nízká hladina narážela na teoretické limity analytické metody. Vodička a spol.⁶² vylepšili používaný postup MED zavedením dodatečného extrakčního kroku, čímž dosáhli snížení detekčního limitu metody. Byli schopni stanovit hladinu aduktů SO-Val na úrovni desetin pmol g⁻¹ globinu u pracovníků profesionálně exponovaných styrenu.

Ačkoliv je užití MED do dnešní doby obecně nejrozšířenějším způsobem biologického monitorování proteinových aduktů, v případě monitorování expozice styrenu a SO je velkou nevýhodou velmi nízká reaktivita SO vůči *N*-koncovému valinu ústící v relativně velmi nízký obsah aduktů SO-Val v globinu u lidí, a to i u pracovníků profesionálně vystavených *in vivo* poměrně vysokým dávkám styrenu. Proto byly zkoumány další cesty umožňující stanovení aduktů SO s jinými aminokyselinami.

4.2. Metoda s použitím Raneyova niklu

Aplikací Raneyova niklu jako katalyzátoru selektivně štěpícího sulfidické vazby přítomné v proteinu lze stanovit cysteinové adukty. Pokud je Raneyův nikl použit v případě proteinu nesoucího adukty SO s cysteinem (SO-Cys), dojde k uvolnění navázané molekuly SO v podobě 1-fenylethanolu a 2-fenylethanolu, které lze ze směsi extrahovat a snadno stanovit metodou GC. Tuto metodu poprvé zavedli Ting a spol.⁶³ pro měření 2-fenylethanolu, který je uvolňován z molekuly *S*-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinu. U potkanů byla pozorována dobrá korelace mezi velikostí expozice SO *in vivo* a množstvím uvolněného 2-fenylethanolu z aduktů SO-Cys.

Na tuto práci navázali Rappaport a spol.^{9,64}, kteří testovali použitelnost metody na vzorcích hemoglobinu a sérového albuminu získaných z lidské a potkaní krve exponované SO *in vitro*. Yeowell-O'Connell a spol.¹⁹ rozšířili měření i na 1-fenylethanol, který se uvolnil štěpením sulfidické vazby S-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinu. V této *in vivo* studii provedené mezi hladinou aduktů SO-Cys přítomných v sérovém albuminu u lidí a velikostí expozice styrenu a SO v pracovním ovzduší. Podobná korelace v případě aduktů SO-Cys v hemoglobinu nebyla nalezena. Hlavním nedostatkem této a dalších podobných studií využívajících Raneyův nikl byla potíž s relativně vysokými hladinami obou fenylethanolů, které byly překvapivě poměrně vysoké (na úrovni cca jednotek nmol g⁻¹ globinu) a které byly pozorovány i u neexponovaných kontrolních osob^{65,66}. Přitom profesionální expozice nevedly k významnému zvýšení hladin těchto biomarkerů.

4.3. Metoda alkalické hydrolyzy

Kyselina asparagová a kyselina glutamová navázané do proteinového řetězce mohou díky svým volným karboxylovým skupinám vytvářet s molekulou SO estery. Esterovou vazbu těchto aduktů lze snadno štěpit alkalickým činidlem (např. 0,1 M-NaOH), přičemž dochází k uvolnění styrenglykolu z globinu. Sepai a spol.¹⁰ použili SO značený radioaktivním uhlíkem ¹⁴C v koncentraci 8,7 mM k *in vitro* inkubaci lidské krve po dobu 24 h. Analýzou styrenglykolu dospěli ke zjištění, že cca 15 % aduktů SO přítomných v globinu bylo ve formě esterů. Byl proveden pokus i o stanovení aduktů SO s kyselinou asparagovou a glutamovou u lidí exponovaných styrenu *in vivo*, ale nalezené hladiny styrenglykolu byly pod limitem detekce metody (< 15 pmol g⁻¹ globinu). Osterman-Golkar a spol.⁶⁰ navíc ve své studii zjistil, že estery SO jsou po svém vzniku v organismu nestabilní, čímž se liší od aduktů SO-Val. Zatímco pokles obsahu aduktů SO-Val po jednorázové expozici styrenu u laboratorních zvířat byl přibližně lineární, pokles obsahu aduktů SO s kyselinou asparagovou či glutamovou byl mnohem rychlejší, což se nedalo vysvětlit jen pouhým odbouráváním hemoglobinu obsahujícího adukty SO.

Rozsáhlou srovnávací studii provedli Yeowell-O'Connell a spol.⁶⁷, kteří inkubovali vzorky lidské, potkaní a myši krve *in vitro* různými koncentracím SO v rozmezí 0 až 1000 μM. Po izolaci příslušných SO-modifikovaných globinů v nich stanovili obsah aduktů SO-Val metodou MED, dále obsah aduktů SO-Cys metodou s použitím Raneyova niklu a obsah esterů SO metodou využívající alkalickou hydrolyzu. Autoři pozorovali velké mezidruhové rozdíly v obsahu zkoumaných aduktů, zejména aduktů SO-Cys. Nejpočetnějšími nalezenými adukty v lidské krvi byly estery SO, následované S-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinem, Nα-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)valinem a nejméně byl přítomen S-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)cystein. U myši a potkanů bylo toto pořadí jiné. Nejvíce bylo

nalezeno S-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinu následovaného S-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinem a estery SO. Adukty SO s jinými aminokyselinami (např. s histidinem nebo lysinem) nebyly v této studii stanoveny.

4.4. Ostatní metody

Hemminki⁶⁸ se jako jeden z prvních zabýval obecně vznikem aduktů SO s aminokyselinami. Studoval reakci racemického SO s různými modelovými polypeptidy, skládajícími se vždy jen z jednoho druhu aminokyseliny. Polycystein se ukázal jako nejreaktivnější polypeptid, následovaný polyhistidinem, polylysinem a polyserinem. V další studii tentýž autor zkoumal *in vitro* reakci radioaktivně značeného SO s jednotlivými aminokyselinami a s hemoglobinem. Pořadí reaktivity jednotlivých aminokyselin bylo opět cystein >> histidin > lysin > serin. Ve shodě s tím byly adukty SO s cysteinem nejvíce zastoupeny v hydrolyzátu hemoglobinu. Autor se ale nepokusil izolovat jednotlivé adukty a řádně charakterizovat jejich strukturu.

Lidský globin inkubovaný *in vitro* s různými koncentracemi SO byl studován též metodami současné proteomiky. Takto modifikovaný globin byl pak podroben enzymové hydrolyze trypsinem. Vzniklé tryptické štěpy byly následně analyzovány velmi citlivými LC-MSⁿ technikami. Tímto způsobem bylo možno identifikovat přesné místo navázání molekuly na jednotlivé aminokyseliny v globinovém řetězci. Tak Kaur a spol.¹¹ inkubovali hemoglobin *in vitro* s 25 mM roztokem racemického SO. Následnou HPLC-MS analýzou tryptických štěpů zjistili, že v globinu převažovaly histidinové adukty na β-His 143 a α-His 20. V hydrolyzátu byly také nalezeny cysteinové adukty na β-Cys 93.

Na tuto práci navázali další autoři¹², kteří inkubovali lidský hemoglobin se širším rozsahem koncentrací SO, a při tom zjistili výskyt aduktů SO i na dalších vazebných místech v hemoglobinu. Badghisi a spol. analyzovali metodou LC-MSⁿ s ionizací elektrosprejem hemoglobin inkubovaný s 40 mM koncentrací SO. Při tom zjistili výskyt aduktů SO na α-His 20, β-His 77, β-His 97, β-His 143, β-Cys 93, α-Val 1 a β-Val 1. Kromě toho Basile a spol.¹³ zjistili použitím kombinace LC-MS s elektrosprejovou ionizací a techniky MALDI-TOF u hemoglobinu inkubovaného s SO v molárním poměru 1:10⁻⁴ (hemoglobin : SO) výskyt aduktů na α-His 20, α-His 72, β-His 97, α-Cys 104, β-Cys 93, β-Cys 112 a α-Val 1, kdežto u hemoglobinu inkubovaného s SO v molárním poměru 1:5 (hemoglobin : SO) se navíc vyskytovaly i adukty na α-His 45, α-His 50, β-His 77, β-His 143 a β-Val 1. Významným poznatkem těchto studií bylo zjištění, že hlavním primárním cílem alkylace hemoglobinu při relativně nízkých koncentracích SO *in vitro* je aminokyselina histidin, následovaná cysteinem a teprve až pak N-koncovým valinem.

V nedávné studii¹⁴ byly připraveny vzorky hemoglobinu inkubovaného s nadbytkem racemického SO (zvolený molární poměr hemoglobin : SO činil 1:100 a 1:10) Tyto

vzorky byly podrobeny enzymové hydrolyze pronázou. Tím došlo k uvolnění jednotlivých aduktů SO z modifikovaného hemoglobinu, které byly následně analyzovány metodou LC-MS, či po jejich derivatizaci silylačním činidlem metodou GC-MS. Bylo zjištěno, že nejvíce zastoupené adukty SO ve zkoumaných vzorcích jsou: *S*-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)cystein, *N* ϵ -(2-fenyl-2-hydroxyethyl)histidin a *N* ϵ -(1-fenyl-2-hydroxyethyl)lysin. V menší míře byly detegovány i všechny ostatní regioisomery aduktů SO s cysteinem, histidinem a lysinem (obr. 1). Hlavní výhodou použitého postupu je možnost současného stanovení všech isomerů aduktů SO, které se ve vzorku vyskytnou. Navíc po zařazení dalšího prekoncentračního kroku při přípravě vzorku (zakoncentrování aduktů z hydrolyzátu na SPE kolonkách) by bylo možno tímto způsobem potenciálně stanovit i mnohem nižší hladiny aduktů SO, které by byly na úrovni pmol g⁻¹ globinu.

5. Závěr

Výše uvedený výčet zdaleka neshrnuje všechny metody stanovení metabolitů styrenu v moči či stanovení aduktů SO, které byly dosud použity pro biologické monitorování expozice laboratorních zvířat a lidí styrenu a SO. Zde bychom mohli navíc zmínit zejména metody stanovení aduktů SO s DNA pocházejícím z leukocytů nebo stanovení degračních produktů těchto DNA bázi v moči⁶⁹. Nelze opomenout ani na možnost stanovení aduktů SO ve spermatu, který je dalším poměrně dostupným biologickým materiálem⁷⁰. Do budoucna lze s rozvojem a zvyšováním citlivosti analytické instrumentace očekávat značný pokrok při využití aduktů SO s proteiny v rutinní laboratorní praxi.

LITERATURA

1. Miller R. R., Newbook R., Poole A.: *Crit. Rev. Toxicol.* **24**, 1 (1994).
2. Sumner S. C. J., Fennell T. R.: *Crit. Rev. Toxicol.* **25**, 11 (1994).
3. Manini P., De Palma G., Andreoli R., Goldoni M., Mutti A.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **77**, 433 (2004).
4. Vodička P., Koskinen M., Naccarati A., Oesch-Bartlomowicz B., Vodičková L., Hemminki K., Oesch F.: *Drug Metab. Rev.* **38**, 805 (2006).
5. Phillips D. H., Farmer P. B.: *Crit. Rev. Toxicol.* **24**, 35 (1994).
6. Farmer P. B.: *Toxicol. Lett.* **149**, 3 (2004).
7. Törnqvist M., Fred C., Haglund J., Helleberg H., Paulsson B., Rydberg P.: *J. Chromatogr.* **778**, 279 (2002).
8. Mowrer J., Törnqvist M., Jensen S., Ehrenberg L.: *Toxicol. Environ. Chem.* **11**, 215 (1986).
9. Rappaport S. M., Yeowell-O'Connell K., Bodell W., Yager J. W., Symanski E.: *Cancer Res.* **56**, 5410 (1996).
10. Sepai O., Anderson D., Street B., Bird J., Farmer P. B., Bailey E.: *Arch. Toxicol.* **67**, 28 (1993).
11. Kaur S., Hollander D., Haas R., and Burlingame A. L.: *J. Biol. Chem.* **264**, 16981 (1989).
12. Badghisi H., Liebler D. C.: *Chem. Res. Toxicol.* **15**, 799 (2002).
13. Basile A., Ferranti P., Mamone G., Manco I., Pocsfalvi G., Malorni A., Acampora A., Sannolo N.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 871 (2002).
14. Jágr M., Mráz J., Linhart I., Stránský V., Pospíšil M.: *Chem. Res. Toxicol.* **20**, 1442 (2007).
15. Petreas M. X., Woodlee J., Becker C. E., Rappaport S. M.: *Int. Arch. Environ. Health* **67**, 27 (1995).
16. Johansson G., Ernstgård L., Gullstrand E., Löf A., Osterman-Golkar S., Williams C. C., Sumner S. C. J.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **168**, 36 (2000).
17. Bond J. A.: *Crit. Rev. Toxicol.* **19**, 227 (1989).
18. International Agency for Research on Cancer: *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*. **60**, 233, IARC, Lyon 1997.
19. Yeowell-O'Connell K., Jing Z., Rappaport S. M.: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **5**, 205 (1996).
20. Watabe T., Isobe M., Sawakata T., Yoshikawa K., Yamada S., Takabatake E.: *Scand. J. Work Environ. Health* **4**, 142 (1978).
21. Pagano D. A., Yagen B., Hernandez O., Bend J. R., Zeiger E.: *Environ. Mutagen.* **4**, 575 (1982).
22. Kessler W., Jiang X., Filser J. G.: *J. Chromatogr.* **534**, 67 (1993).
23. Christakopoulos A., Bergmark E., Zorzec V., Norppa H., Mäki Paakkanen J., Osterman-Golkar S.: *Scand. J. Work. Environ. Health* **19**, 255 (1993).
24. Manini P., Andreoli R., Poli D., De Palma G., Mutti A., Niessen W. M. A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **16**, 2239 (2002).
25. Negri S., Maestri L., Andreoli R., Manini P., Mutti A., Imbriani M.: *Toxicol. Lett.* **162**, 225 (2006).
26. Maestri L., Imbriani M., Ghittori S., Capodaglio E., Gobba F., Cavalleri A.: *Sci. Tot. Environ.* **199**, 13 (1997).
27. Hallier E., Goergens H. W., Karels H., Golka K.: *Arch. Toxicol.* **69**, 300 (1995).
28. Delbressine L. P. C., Van Bladeren P. J., Smeets F. L. M., Seutter-Berlage F.: *Xenobiotica* **11**, 589 (1981).
29. Yagen B., Foureman G. L., Ben-Zvi Z., Ryan A. J., Hernandez O., Cox R. H., Bend J. R.: *Drug Metab. Dispos.* **12**, 389 (1984).
30. Pantarotto C., Fanelli R., Bidoli F., Morazzoni P., Salmona M., Szczawinska K.: *Scand. J. Work Environ. Health* **4**, 67 (1978).
31. Manini P., Buzio L., Andreoli R., Goldoni M., Bergamaschi E., Jakubowski M., Vodička P., Hirvonen A., Mutti A.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **189**, 160 (2003).
32. Pfäffli P., Hesso A., Vainio H., Hyvönen M.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **60**, 85 (1981).
33. Linhart I., Gut I., Šmejkal J., Novák J.: *Chem. Res. Toxicol.* **13**, 36 (2000).
34. Seutter-Berlage F., Delbressine L. P. C., Smeets F. L. M., Ketelaars H. C. J.: *Xenobiotica* **8**, 413 (1978).

35. Nakatsu K., Hugenroth S., Sheng L.-S., Horning E. C., Horning M. G.: *Drug Metab. Dispos.* 11, 463 (1983).
36. Ghittori S., Maestri L., Imbriani M., Capodaglio E., Cavalleri A.: *Am. J. Ind. Med.* 31, 636 (1997).
37. De Palma G., Manini P., Mozzoni P., Andreoli R., Bergamaschi E., Cavazzini S., Franchini I., Mutti A.: *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1393 (2001).
38. Foureman G. L., Harris C., Guengerich P. F., Bend J. R.: *J. Pharm. Exp. Therapeutics* 248, 492 (1989).
39. Coccini T., Maestri L., Robustelli della Cuna F. S., Bin L., Costa L. G., Manzo L.: *Arch. Toxicol.* 70, 736 (1996).
40. Vodička P., Souček P., Tates A. D., Dušinská M., Šarmanová J., Zámečnicková M., Vodičková L., Koskinen M., de Zwart F. A., Natarajan A. T., Hemminki K.: *Mutat. Res.* 482, 91 (2001).
41. Wenker M. A. M., Kežić S., Monster A. C., de Wolff F. A.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 169, 52 (2000).
42. Wenker M. A. M., Kežić S., Monster A. C., de Wolff F. A.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 74, 359 (2001).
43. Korn M., Wodarz R., Schoknecht W., Weichardt H., Bayer H.: *Arch. Toxicol.* 55, 59 (1984).
44. Korn M., Wodarz R., Drysch K., Schoknecht W., Schmahl F. W.: *Arch. Toxicol.* 58, 110 (1985).
45. Korn M., Wodarz R., Drysch K., Schmahl F. W.: *Arch. Toxicol.* 60, 86 (1987).
46. Linhart I., Šmejkal J., Mládková I.: *Toxicol. Lett.* 94, 127 (1998).
47. Linhart I.: *Drug Metab. Rev.* 33, 353 (2001).
48. Osterman-Golkar S., Ehrenberg D., Segerbäck D., Hällström I.: *Mutat. Res.* 14, 1 (1976).
49. Bishop C., Surgenor D. M.: *The Red Blood Cell*. Academic Press, New York 1964.
50. Sabbioni G., Skipper P. L., Buchi G., Tannenbaum S. R.: *Carcinogenesis* 8, 819 (1987).
51. Jain N. C.: *Essentials of Veterinary Hematology*. Lea & Febiger, Philadelphia 1993.
52. Hemminki K.: *Arch. Toxicol. Suppl.* 9, 286 (1986).
53. Pauwels W., Veulemans H.: *Mutat. Res.* 418, 21 (1998).
54. Fennell T. R., Sumner S. C., Walker V. E.: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1, 213 (1992).
55. Törnqvist M., Mowrer J., Jensen S., Ehrenberg L.: *Anal. Biochem.* 154, 255 (1986).
56. Pauwels W., Farmer P. B., Osterman-Golkar S., Severi M., Cordero R., Bailey E., Veulemans H.: *J. Chromatogr. B* 702, 77 (1997).
57. Nordqvist M. B., Löf A., Osterman-Golkar S., Waller S. A. S.: *Chem.-Biol. Interact.* 55, 63 (1985).
58. Severi M., Pauwels W., Van Hummelen P., Roosels D., Kirsch-Volders M., Veulemans H.: *Scand. J. Work. Environ. Health* 20, 451 (1994).
59. Teixeira J. P., Silva S., Torres J., Gaspar J., Roach J., Farmer P. B., Rueff J., Mayan O.: *Int. J. Hyg. Environ. Health* 211, 59 (2008).
60. Osterman-Golkar S., Christakopoulos A., Zorzec V., Svensson K.: *Chem.-Biol. Interact.* 95, 79 (1995).
61. Pauwels W., Vodička P., Severi M., Plná K., Veulemans H., Hemminki K.: *Carcinogenesis* 17, 2673 (1996).
62. Vodička P., Tvrdík T., Osterman-Golkar S., Vodičková L., Peterková K., Souček P., Šarmanová J., Farmer P. B., Granath F., Lambert B., Hemminki K.: *Mutat. Res.* 445, 205 (1999).
63. Ting D., Smith M. T., Doane-Setzer P., Rappaport S. M.: *Carcinogenesis* 11, 755 (1990).
64. Rappaport S. M., Ting D., Jing Z., Yeowell-O'Connell K., Waidyanatha S., McDonald T.: *Chem. Res. Toxicol.* 6, 238 (1993).
65. Rappaport S. M., Yeowell-O'Connell K.: *Toxicol. Lett.* 108, 117 (1999).
66. Fustinoni S., Colosio C., Colombi A., Lastrucci L., Yeowell-O'Connell, Rappaport S. M.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 71, 35 (1998).
67. Yeowell-O'Connell K., Pauwels W., Severi M., Jiu Z., Walker M. R., Rappaport S. M., Veulemans H.: *Chem.-Biol. Interact.* 106, 67 (1997).
68. Hemminki K.: *Carcinogenesis* 4, 1 (1983).
69. Vodička P. E., Linhart I., Novák J., Koskinen M., Vodičková L., Hemminki K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 210, 1 (2006).
70. Xie Q., Sun H., Liu Y., Ding X., Fu D., Lu K.: *Toxicol. Lett.* 163, 101 (2006).

M. Jágr^a, V. Pacáková^b, and M. Petříček^a
^a*Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague,* ^b*Department of Analytical Chemistry, Charles University, Prague): Styrene and Styrene Oxide: Their Metabolism and Analytical Methods for Determination of Their Adducts with Proteins*

A review of the current knowledge of the styrene and styrene oxide metabolism in laboratory animals and humans. Styrene ranks among the most important monomers in the manufacture of plastics and styrene oxide is the main intermediate involved in its metabolism. Both chemicals exhibit adverse effects. Various analytical methods have been developed for assessing their concentrations in organisms. Determination of their protein adducts shows several advantages over their determination in urine or as DNA adducts due to their stability and easy availability. The protein adduct determination by a modified Edman degradation, Raney-nickel cleavage, alkaline hydrolysis and enzymatic hydrolysis is described. Styrene oxide adducts with various globin amino acids have been also studied by these methods. A modified Edman degradation has proved to be a most sensitive method, with a limit of detection of the order of pmol per g of globin.