

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra analytické chemie



**STUDIUM ADUKTŮ STYREN-7,8-OXIDU
S CYSTEINEM, HISTIDINEM A LYSINEM
V LIDSKÉM GLOBINU**

Praha 2007

Michal Jágr

Tato práce byla vypracována na katedře analytické chemie PŘF UK v Praze a ve Státním Zdravotním Ústavu v Praze v letech 2001-2007. Prohlašuji, že jsem dizertační práci zpracoval samostatně a veškerou použitou literaturu jsem citoval.

Praha, říjen 2007

Úvodem bych rád poděkoval své školitelce Prof. RNDr. Věře Pacákové, CSc. za všestrannou pomoc. Zvláštní poděkování patří Doc. Igoru Linhartovi, CSc., Doc. Ireně Němcové, CSc. a Haně Nohové, bez jejichž pomoci a rad by tato práce jistě nevznikla. Rovněž děkuji RNDr. Jaroslavu Mrázovi, CSc. za jeho rady. Závěrem bych chtěl poděkovat své matce za veškerou podporu a pochopení v průběhu mého studia na vysoké škole.

OBSAH

1. Úvod	6
2. Teoretická část	8
2.1. Vlastnosti a použití styrenu a styren-7,8-oxidu	8
2.2. Metabolismus styrenu a styren-7,8-oxidu	9
2.3. Adukty	14
2.3.1. Adukty s proteiny	15
2.3.1.1. Xenobiotika tvořící adukty s proteiny	16
2.3.1.1.1. Alkylační činidla	17
2.3.1.1.2. Ostatní látky tvořící adukty s proteiny	20
2.3.2. Adukty SO	20
2.3.2.1. Stanovení aduktů SO s proteiny	20
2.3.2.1.1. Využití modifikované Edmanovy degradace	21
2.3.2.1.2. Využití Raneyova niklu (Ra-Ni)	22
2.3.2.1.3. Využití mírně alkalické hydrolyzy	23
2.3.2.1.4. Ostatní nespecifické metody	24
2.3.3. Adukty s DNA	25
2.3.3.1. Stanovení aduktů SO s DNA	27
2.4. Metoda extrakce tuhou fází (SPE) a její využití ke studiu aduktů	27
2.4.1. Teoretický úvod k metodě SPE	27
2.4.2. Využití metody SPE ke stanovení aduktů	29
2.5. Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) a její využití ke studiu aduktů	29
2.5.1. Teoretický úvod k PAGE	29
2.5.2. Využití PAGE k separaci globulinu	31
3. Cíle práce	32
4. Experimentální část	33
4.1. Seznam chemikálií	33
4.2. Experimentální zařízení	34
4.3. Syntéza aduktů SO	35
4.3.1. Syntéza aduktů SO-Cys	35
4.3.2. Syntéza aduktů SO-Lys	37
4.3.3. Syntéza aduktů SO-His	40

4.3.4.	Syntéza SO- <i>d8</i> a aduktů SO-Cys- <i>d8</i>	43
4.3.5.	Syntéza aduktů SO-His- <i>d8</i>	44
4.4.	Postupy derivatizace aduktů SO	44
4.4.1.	Příprava TBDMS derivátů	44
4.4.2.	Ostatní postupy derivatizace	45
4.5.	Příprava šarží SO-modifikovaných lidských globinů (SO-Gb)	45
4.6.	Enzymatická hydrolyza proteinů	46
4.7.	Kvantitativní a kvalitativní analýza aduktů SO v SO-modifikovaném lidském globinu metodou GC/MS	47
4.8.	Vývoj metody SPE vhodné k obohacení hydrolyzátu lidského globinu o adukty SO	47
4.8.1.	Výběr nejvhodnějšího sorbentu	48
4.8.2.	Optimalizace metody SPE	49
4.8.2.1.	Studium průběhu extrakce a optimalizace objemu vzorku	49
4.8.2.2.	Optimalizace objemu vody vhodného k promytí kolonek	49
4.8.2.3.	Optimalizace koncentrace aminokyselin ve vzorku	49
4.8.3.	Aplikace metody SPE na vzorky hydrolyzátu lidského globinu ..	50
4.8.4.	Stanovení aduktů SO v SO-modifikovaném lidském globinu metodou SPE	50
4.9.	Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)	51
4.9.1.	Příprava polyakrylamidového gelu	51
4.9.2.	Elektroforéza SO-modifikovaného lidského globinu	52
5.	Výsledky a diskuse	53
5.1.	Příprava standardů jednotlivých aduktů SO s aminokyselinami	53
5.1.1.	Adukty SO-Cys	53
5.1.1.1.	Syntéza aduktů SO-Cys	53
5.1.1.2.	Charakterizace struktury aduktů SO-Cys	55
5.1.2.	Adukty SO-Lys	58
5.1.2.1.	Syntéza aduktů SO-Lys	58
5.1.2.2.	Charakterizace struktury aduktů SO-Lys	60
5.1.3.	Adukty SO-His	60
5.1.3.1.	Syntéza aduktů SO-His	60
5.1.3.2.	Charakterizace struktury aduktů SO-His	63
5.1.4.	Syntéza deuterovaných analog aduktů SO-Cys a SO-His	67

5.1.5. Alternativní přístupy vedoucí k regioselektivní syntéze aduktů SO	69
5.2. Derivatizace aduktů SO	70
5.2.1. Derivatizace silylačními činidly	71
5.2.2. Derivatizace chlormravenčany	73
5.3. Detekce a stanovení aduktů SO v SO-modifikovaném lidském globinu ..	74
5.3.1. Identifikace aduktů SO v SO-modifikovaném lidském globinu ...	74
5.3.2. Stanovení aduktů SO v SO-modifikovaném lidském globinu metodou GC/MS	80
5.4. Vývoj metody SPE vhodné k obohacení proteinového hydrolyzátu o adukty SO	81
5.4.1. Výběr nejvhodnějšího sorbentu	83
5.4.2. Optimalizace metody SPE	85
5.4.2.1. Studium průběhu extrakce a optimalizace objemu vzorku	85
5.4.2.2. Optimalizace objemu vody vhodného k promytí kolonek	89
5.4.2.3. Optimalizace koncentrace aminokyselin ve vzorku	90
5.4.3. Aplikace metody SPE na vzorky hydrolyzátu lidského globinu ..	93
5.4.4. Stanovení aduktů SO v SO-modifikovaném lidském globinu metodou SPE-GC-FID	96
5.5. Polyakrylamidová gelová elektroforéza	98
5.5.1. Využití SDS-PAGE k analýze SO-modifikovaného lidského globinu	98
5.5.2. Stanovení M_r SO-modifikovaného lidského globinu	100
6. Shrnutí	102
7. Seznam literatury	104
8. Seznam publikací	119
9. Seznam zkratk	120

1. ÚVOD

Po vstupu do organismu se některé cizorodé látky nebo jejich metabolity mohou navazovat na proteiny za vzniku stabilních kovalentních sloučenin, tzv. aduktů. Zvláštní pozornost je věnována aduktům průmyslových škodlivin s krevními proteiny, které jsou používány jako biomarkery expozice. Zde se s výhodou využívá jejich dlouhodobé perzistence v organismu, díky tomu mohou adukty sloužit jako dozimetry expozice trvající až několik měsíců. Z hlediska biologického monitorování mají největší význam adukty s krevním proteinem globinem.

Hlavním mechanismem, kterým adukty vznikají, je reakce elektrofilních cizorodých látek s nukleofilními skupinami aminokyselinových reziduí (zvláště s Cys, His a Lys) nebo s N-koncovou aminoskupinou. Tato dizertační práce je věnována studiu aduktů aminokyselin Cys, His a Lys se styren-7,8-oxidem (SO), který je hlavním metabolickým meziproduktem průmyslově významné chemikálie styrenu.

Klasické a dosud používané metody pro biologické monitorování expozice parám styrenu stanovují hlavní metabolity styrenu, které jsou vylučovány v moči (kyseliny mandlové a kyseliny fenylglyoxylové). Tyto metody se ale potýkají s nízkým poločasem vylučování těchto metabolitů, který je řádově v hodinách. Proto jsou zkoumány alternativní cesty založené na stanovení konkrétních proteinových aduktů SO. Publikované metody stanovení proteinových aduktů jsou založeny zejména na použití modifikované Edmanovy degradace (MED), která se používá ke stanovení aduktů SO s N-koncovým valinem. Další metody jsou založeny na selektivním štěpení vazby mezi SO a aminokyselinou cysteinem pomocí Raneyova-niklu (Ra-Ni), extrakci uvolněného fenylethanolu a jeho stanovení. Možné je i použití zásadité hydrolýzy proteinu. Analýzou uvolněného styrenglykolu lze pak nepřímo stanovit estery SO s kyselinou asparagovou a kyselinou glutamovou.

Výše uvedené metody se potýkají s některými vážnými nedostatky. Tak u nejrozšířenějšího postupu, který využívá MED, je velkou nevýhodou skutečnost, že se SO váže na N-koncový valin jen ve velmi nízkém stupni, a proto je vzniklý adukt metodou MED obtížně detekovatelný. Protože se SO mnohem více váže na aminokyseliny uvnitř proteinového řetězce, jako vhodnou alternativou k výše uvedeným metodám se jeví možnost využití totální kyselé nebo enzymatické

hydrolýzy proteinu na volné aminokyseliny za současného uvolnění aduktů SO a stanovení těchto aduktů citlivou analytickou metodou.

Hlavním cílem této práce bylo nalezení nejvíce zastoupených aduktů SO ve vzorcích lidského globinu modifikovaného *in vitro* s SO. Při tom bylo nutno následně vypracovat syntetické postupy pro přípravu standardů těchto aduktů SO v preparativním měřítku. Struktura připravených standardů byla charakterizována metodami nukleární magnetické rezonance a technikami hmotnostní spektroskopie. Dalším úkolem bylo vyvinutí dostatečně citlivé analytické metody zahrnující aplikaci extrakce aduktů SO na SPE kolonkách, za účelem obohacení hydrolyzátu lidského globinu o adukty SO. Vyvinutá metoda byla použita ke stanovení aduktů SO v různých vzorcích hydrolyzátů SO-modifikovaného lidského globinu. Vedlejším cílem byla i analýza vzorků hydrolyzátů globinu polyakrylamidovou gelovou elektroforézou jako alternativní metodou.

Výsledky dizertační práce byly dosud publikovány v devíti původních sděleních. Dvě publikace jsou plné verze článků.

2. TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Vlastnosti a použití styrenu a styren-7,8-oxidu

Styren je jednou z nejdůležitějších průmyslových surovin. Používá se jako monomer při výrobě plastických hmot, je základem při výrobě syntetického kaučuku, gum, nátěrových hmot a obalových materiálů. 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 výrobach s vysokým podílem ruční práce dosahují koncentrace styrenu v ovzduší hodnot řádově až stovky mg/m³. 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 exponovaných osob se jedná o významný hygienický problém. Styren byl detekován i v některých potravinách, v tabákovém kouři a ve výfukových plynech (Miller, 1994).

Důležitost styren-7,8-oxidu (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. Největší význam SO spočívá v jeho roli jako hlavního meziprojektu metabolismu styrenu. Největší díl expozice styrenu u lidí se v průmyslových provozech děje inhalační cestou. Cca 94 % vdechnutého styrenu je zadrženo v plicích a vstřebáno do krve (Petreas, 1995). Jiný autor uvádí pro množství zadržného styrenu nižší údaj: 66,5 % (Johansson, 2000). Vstřebaný styren je krví odtransportován do jater, kde dochází k jeho metabolismu. V tabulce 1 jsou shrnuty hlavní fyzikálně-chemické vlastnosti styrenu a SO.

Nejzávažnějším biologickým efektem styrenu je jeho genotoxicita. U osob profesionálně exponovaných styrenu byl nalezen zvýšený počet různých typů chromozómových 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 člověka (IARC, 1994).

SO je díky přítomnosti epoxidové skupiny mnohem reaktivnější látkou než styren, např. u lidí je jeho reaktivita cca o 2 řády vyšší než reaktivita styrenu (Yeowell-

O'Connell, 1996a). Také přímé účinky SO na živé organismy jsou mnohem nepříznivější. Studie vlivu SO provedená na laboratorních zvířatech prokázala jeho karcinogenní a mutagenní schopnosti (Watabe, 1978). Proto byl SO zařazen IARC do skupiny 2A jako pravděpodobný lidský karcinogen.

Tabulka 1. Základní fyzikálně-chemické vlastnosti styrenu a SO.

Parametr	Styren	Styren-7,8-oxid
M_r	104,15	120,15
fyzikální vzhled	bzb. kapalina	bzb. kapalina
teplota tání	-30,6 °C	-36,7 °C
teplota varu	145,2 °C	194,1 °C
tenze par	867 kPa při 25°C	<133 kPa při 20°C
rozpustnost	málo rozpustný ve vodě (0,3g/l, 20°C), rozpustný v benzenu a petroletheru	málo rozpustný ve vodě (3 g/l, 25°C), rozpustný v acetonu, benzenu, heptanu a methanolu

Výzkumu zdravotních důsledků expozice styrenu a metod monitorování expozice byla a stále je věnována značná pozornost. Řada významných prací byla v tomto směru provedena i v ČR (Vodička 2001, 2002a, 2002b a 2004). Monitorování expozice styrenu na pracovištích v ČR patří mezi běžné analýzy v hygieně práce.

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

Hlavní metabolickou cestou biotransformace styrenu je oxidace jeho dvojných vazeb na epoxidovou skupinu. Tato přeměna je v játrech katalyzována cytochromy P450, což jsou terminální oxidoreduktázy monoxygenázového systému. Tímto způsobem je přes 95 % absorbované dávky styrenu přeměněno na SO (Bond, 1989). Díky přítomnosti chirálního uhlíku existuje molekula SO ve dvou enantiomerních formách (*R*)-SO a (*S*)-SO. Oba dva enantiomery vznikají *in vivo* v živých organismech metabolismem ze styrenu. Byly zjištěny rozdíly v toxicitě obou enantiomerů. (*R*)-SO je více mutagenní v Amesově testu vůči mikroorganismům *Salmonella typhimurium* než (*S*)-SO (Pagano, 1982).

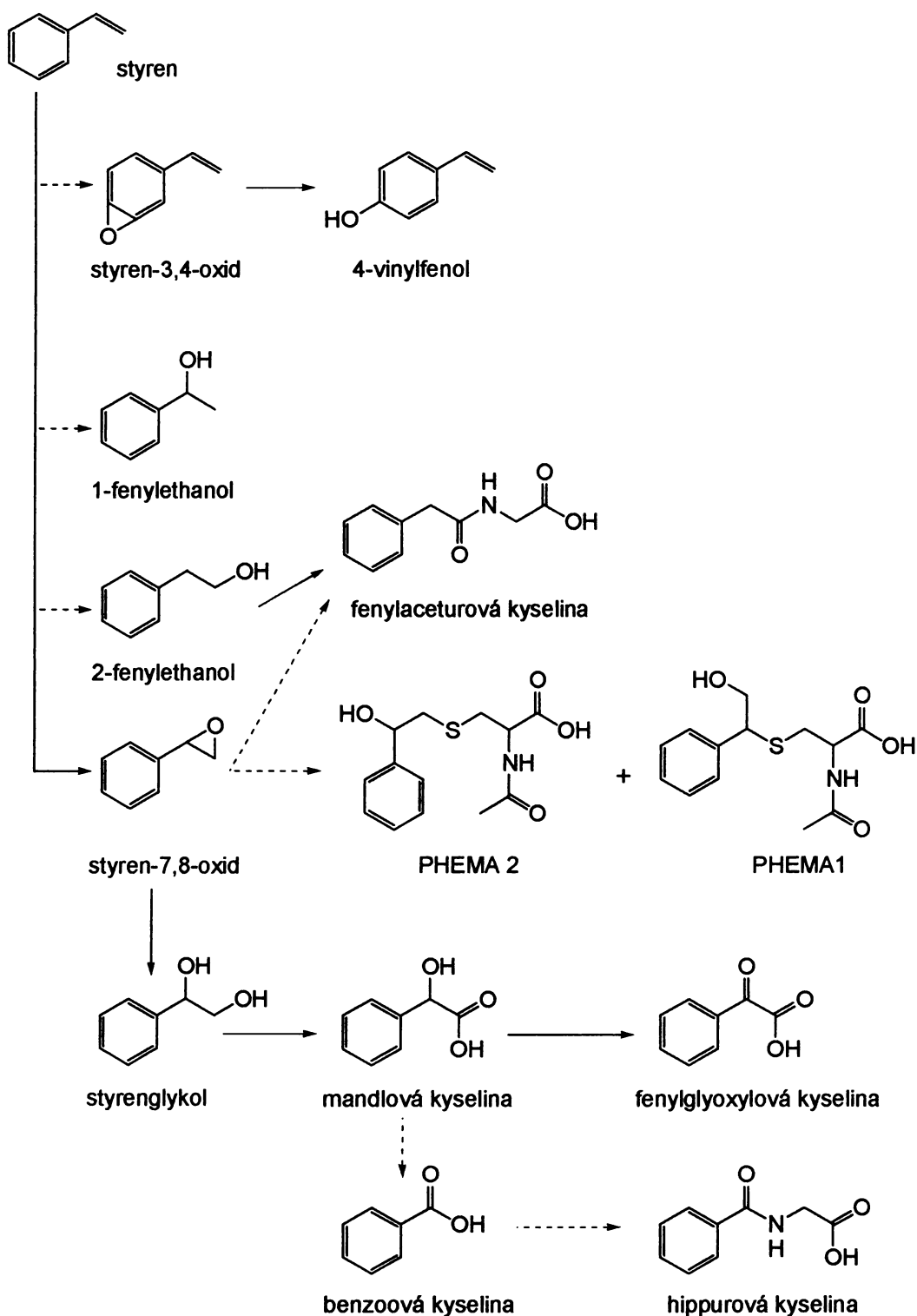
Naprostá většina SO vzniklého v játrech podléhá dalšímu metabolismu, zejména hydrolýze za účasti enzymů epoxidhydroláz na styrenglykol (SG), který je následně oxidován na kyselinu mandlovou (MA) a kyselinu fenylglyoxylovou (PGA). Menší část SO se uvolňuje přímo do krve, kde může podléhat dalším reakcím. Obsah SO v krvi lze stanovit metodou GC (Kessler, 1990). Christakopoulos a spol. 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 (v rozmezí 40-130 nmol/l) (Christakopoulos, 1993). Přímé stanovení SO v krvi se ale pro pravidelné 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 MA a PGA přemění až kolem 90 % z absorbované dávky styrenu. MA a PGA jsou posléze z organismu vyloučeny močí, kde jsou nejčastěji stanovovány metodami HPLC (Manini, 2002; Negri, 2006; Maestri, 1997). Zajímavá alternativa k těmto metodám byla popsána ve studii Halliera a spol. (1995), kteří stanovili oba optické izomery MA metodou TLC na chirálních deskách. Minoritními produkty této větve metabolismu SO, které jsou taktéž vylučovány v moči, jsou kyselina hippurová a kyselina fenylaceturová.

Stanovení kyseliny mandlové a kyseliny fenylglyoxylové v moči dodnes představuje běžný a dnes už klasický nástroj biologického monitorování krátkodobé expozice člověka styrenu (Manini, 2004). Hlavní nevýhodou tohoto způsobu stanovení je krátký 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 glutathiontransferáz 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 regioizomerů, N α -acetyl-S-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinu (PHEMA1) a N α -acetyl-S-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinu (PHEMA2). Každý regioizomer se díky přítomnosti dvou chirálních uhlíků může vyskytovat ve formě dvou diastereomerů, celkem tedy merkapturové kyseliny mohou poskytovat čtyři možné diastereomery. Delbressine a spol. popsali výskyt těchto čtyř diastereomerů merkapturových kyselin v moči potkanů exponovaných styrenu *in vivo* (Delbressine, 1981).

Schéma 1. Přehled hlavních metabolických drah styrenu a styren-7,8-oxidu.



Yagen a spol. podávali mořským organismům *Pseudopleuronectes americanus* konjugát SO s glutathionem značený uhlíkem ^{14}C . Poté v jejich moči detekovali nejen merkapturové kyseliny, ale překvapivě i adukty SO-Cys (Yagen, 1984). Stanovení

merkapturových kyselin v moči pracovníků exponovaných styrenu metodou HPLC-UV bylo popsáno ve studii Maestri a spol. (Maestri, 1997). Limit detekce merkapturových kyselin v této studii činil cca 7 $\mu\text{g/ml}$. V poslední době byly popsány i jiné citlivé metody stanovení merkapturových kyselin v moči, využívající LC/MS/MS či HPLC s fluorescenčním detektorem (Negri, 2006).

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 (4-VP) (Pantarotto, 1978; Manini, 2003). 4-VP byl zjištěn v hydrolyzátu moče pracovníků vystavených parám styrenu, jeho obsah ale odpovídal jen cca 0,3 % obsahu MA (Pfäffli, 1981). Toxikologický význam této oxidace, od níž se odvozuje několik dalších minoritních metabolitů nalezených v moči laboratorních myší, byl předmětem dalšího výzkumu (Linhart, 2000).

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 MA a PGA 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 (Seutter-Berlage, 1978; Nakatsu, 1983; Manini, 2002), zatímco u člověka činí podíl merkapturových kyselin mezi všemi metabolity vylučovanými v moči méně než 1 % (Ghittori, 1997; De Palma, 2001).

Na metabolismus styrenu má vliv i současná konzumace jiných látek, které mají vliv na hladinu mikrozomálních enzymů (Fouremant, 1989). Takovouto běžně užívanou látkou je např. ethanol v alkoholických nápojích. Ve studii Coccini a spol. 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 MA a merkapturových kyselin ve srovnání s kontrolní skupinou potkanů (Coccini, 1996).

Jak již bylo řečeno, jednotlivé metabolické přeměny styrenu, resp. SO jsou katalyzovány biotransformačními enzymy ze skupin P450, epoxidhydroláz a glutathiontransferáz, přičemž u řady jednotlivých izoenzymů byl popsán genetický polymorfismus. Výskyt různých forem těchto izoenzymů a jejich kombinace mají vliv na rychlost dílčích metabolických reakcí a tím i na koncentraci SO v cílových tkáních

a s tím související riziko vzniku genetického poškození. Genotypizace biotransformačních enzymů je proto významným prostředkem k posouzení individuální vnímavosti k nepříznivým účinkům expozice styrenu (Vodička, 2001).

Stereoselektivita metabolismu SO lidskými jaterními enzymy *in vitro* byla studována Wenkerem a spol. (2000). Hydrolyza racemické směsi SO mikrozomálními epoxidhydrolázami na SG probíhala stereospecificky S_N2 mechanismem. Toxičtější enantiomer (*R*)-SO byl rychleji hydrolyzován než jeho méně toxický protějšek (*S*)-SO. V následné studii autoři studovali stereoselektivitu metabolismu u lidí *in vivo* (Wenker, 2001). Byly zjištěny významné interindividuální rozdíly ve složení metabolitů SO vylučovaných močí (MA, PGA, aj.) i ve vzájemném poměru jejich enantiomerů. Průměrný poměr (*S*)-MA ku (*R*)-MA v moči činil cca 1,6:1.

Stereoselektivita metabolismu styrenu u lidí profesionálně exponovaných styrenu byla studována v pracích Korna a spol. Tito autoři vypracovali GC metodu pro dělení optických enantiomerů kyseliny mandlové, (*R*)-MA a (*S*)-MA, na koloně Chirasil-L-Val (Korn, 1984). Podobně byly studovány také další chirální metabolity styrenu, konkrétně (*R*)/(*S*)-1-fenylethanol a (*R*)/(*S*)-fenylethylenglykol (Korn, 1985 a 1987).

Foureman a spol. prostudovali metabolismus oxidace styrenu mikrozomálními enzymy izolovanými z jater laboratorních potkanů. U kontrolních potkanů převažovala tvorba (*S*)-SO nad (*R*)-SO v poměru 1,54:1, zatímco u potkanů, kterým byl předem podán fenobarbital nebo β -naftoflavon, se tento poměr změnil na 1,09:1 či 0,8:1 (Foureman, 1989).

Metabolismus styrenu a SO *in vivo* u laboratorních potkanů byl též obšírně prostudován Linhartem a spol. (1998). 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 glutathiontransferázou, která předchází tvorbě merkapturových kyselin, probíhá stereospecificky mechanismem bimolekulární nukleofilní substituce (S_N2). Na druhou stranu, biotransformace (*R*)-SO na kyselinu mandlovou zcela stereospecifická nebyla, vznikala nejen (*R*)-MA, ale i (*S*)-MA a to v poměru 2,57:1. Podobnou studii provedli

Linhart a spol. i na laboratorních myších. Na rozdíl od potkanů byla u myši po podání styrenu pozorována vyšší produkce toxičtějšího (*R*)-SO, která je tak možná zodpovědná za relativně vyšší citlivost myši k nepříznivým účinkům styrenu a SO ve srovnání s potkanem i s člověkem. Pomocí NMR analýzy diastereomerů merkapturových kyselin vylučovaných v moči byla u myši 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 (Linhart, 2000).

Metabolismus styrenu byl do dnešní doby přehledně zpracován do několika obsáhlých přehledných článků (Sumner a Fennell, 1994; Linhart, 2001; Vodička 2006a).

2.3. Aduktů

Četné organické látky, kterým mohou být lidé na pracovištích nebo při různých dalších příležitostech exponováni, jsou často samy o sobě chemicky vysoce reaktivní, nebo se přeměňují na reaktivní sloučeniny po vstupu do organismu účinkem metabolismu. Společným rysem všech těchto reaktivních sloučenin je jejich elektrofilní charakter. Naproti tomu jsou biologické makromolekuly v těle nositeli četných nukleofilních skupin (např. NH₂-, -NH-, SH- a OH- skupin). Reakcí těchto skupin s elektrofilními xenobiotiky dochází ke vzniku stabilních kovalentních sloučenin, tzv. aduktů (obrázek 1). Při tvorbě aduktů se tedy jedná o nukleofilní substituci, která může probíhat dvěma odlišnými mechanismy: S_N1 a S_N2. Mechanismus příslušné substituce závisí obecně nejen na typu reagujících látek, ale i na prostředí reakce, např. na jeho pH či druhu rozpouštědla. Při kyselém pH je preferován S_N1 mechanismus, zatímco v neutrálním a bazickém prostředí je preferován S_N2 mechanismus. Řada nukleofilních substitucí má průběh kombinující oba dva možné mechanismy, s možnou preferencí jednoho typu. Týká se to i reakcí oxiranů (např. SO) s nukleofily.

Vzniklé pevné, kovalentně vázané makromolekulární adukty mohou mít pro organismus nepříznivé důsledky. Stanovení těchto aduktů v biologickém materiálu dále poskytuje informace o typu a míře rizika vyplývajícího z expozice, nebo alespoň o míře této expozice. Nejčastěji bývají studovány adukty cizorodých látek s krevními proteiny nebo s DNA.

Obrázek 1. Ukázka tvorby aduktů s proteinem (globin).

Nativní globinový řetězec:



Globinový řetězec s navázanými molekulami xenobiotika tvořícími adukty:



Jak již bylo řečeno, cizorodých reaktivních látek, které mohou tvořit adukty, je celá řada. Tyto látky se mohou navazovat na biomakromolekuly v místě vstupu do organismu (v dýchacích cestách) nebo v místě svého vzniku (např. v hepatocytech). Pokud jsou dostatečně stálé, mohou se dostat do krevního oběhu a zde se navazovat na složky krve nebo mohou být dokonce přeneseny do tkání a navazovat se až v nich. Protože však od vyšetřovaných osob lze poměrně nejsnáze získat vzorek krve, využití aduktů se složkami krve je zdaleka nejrozšířenější. Nejčastěji analyzovanými materiály jsou: DNA izolovaná z lymfocytů, globin izolovaný z erythrocytů a sérový albumin izolovaný z krevní plazmy.

Adukty zkoumané v klinické praxi jsou různého druhu a původu. Nejčastěji sledovanými adukty bývají ty s průmyslově významnými rozpouštědly či s jinými průmyslovými surovinami, dále s látkami vyskytujícími se v životním prostředí, jako jsou pesticidy v potravinách nebo chemikálie přítomné v cigaretovém kouři. Sem lze zařadit i látky dříve používané v chemických zbraních, které jsou dnes zakázané.

2.3.1. Adukty s proteiny

Obecné využití proteinových aduktů jako možných biomarkerů vnitřní expozice cizorodým látkám poprvé navrhli Osterman-Golkar a spol. (1976). 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 a sérového albuminu o $M_r \sim 68\,500$, který se vyskytuje v krevní plazmě člověka v koncentraci 30-45 mg/ml. Průměrná doba života hemoglobinu u člověka je přímo spjata s dobou života červených krvinek a u člověka činí 126 dní, zatímco u potkanů 60 dní a u myši 40 dní (Bishop, 1964). Doba života lidského sérového albuminu činí cca 20 dní, zatímco u potkanů je to jen 2,5 dne a u myši 1,9 dne (Sabbioni, 1987; Jain, 1993).

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 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 enzymatické 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 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 shoda (Fennell, 1992).

2.3.1.1. Xenobiotika tvořící adukty s proteiny

Látek, které mají schopnost tvořit adukty s proteiny je celá řada. Od počátku byla pozornost zaměřena zejména na ty látky, které mají nepříznivé zdravotní účinky na

živý organismus. Lze je s výhodou rozdělit na několik typů podle elektrofilní funkční skupiny, kterou obsahují ve své molekule. V toxikologické praxi jsou významnými elektrofilními činidly: alkylační a arylační činidla (zejména methylhalogenidy, oxirany a nenasycené sloučeniny tvořící oxirany po předchozí metabolické aktivaci); aromatické aminy; aldehydy; izokyanáty; organofosfáty a další. Elektrofilní funkční skupina má velký vliv na reaktivitu příslušné cizorodé látky a tím i na mechanismus reakce tvorby aduktů (většinou se jedná o nukleofilní substituci, vzácněji o adici) a její schopnost tvořit adukty s příslušnými aminokyselinami. Podle toho se pak také řídí výběr metod vhodných pro stanovení příslušných aduktů.

2.3.1.1.1. Alkylační činidla

Jedná se o nejrozsáhlejší studovanou skupinu látek tvořících adukty s proteiny. Patří sem zejména ethylenoxid (EO), propylenoxid (PO), 1,3-butadien, benzen, hořčičný plyn [1,1'-thiobis(2-chlorethan)], akrylamid, akrylonitril a epichlorohydrin. Patří sem i styren a styren-7,8-oxid (SO), jehož adukty a metody jejich stanovení jsou podrobněji popsány v kapitole 2.3.2.

Adukty těchto látek byly studovány už od počátku využívání proteinových aduktů na konci sedmdesátých let dvacátého století jako biomarkerů expozice. Velká pozornost byla věnována zejména EO, který se užívá ve velkém jako sterilizační činidlo a je obsažen i v tabákovém kouři. U EO i PO byly prokázány karcinogenní účinky na laboratorních zvířatech. V práci Callemana a spol. (1978) byly detekovány adukty EO s aminokyselinou histidinem u lidí profesionálně exponovaných EO. Na tuto práci navázali Osterman-Golkar a spol. (1983), který podrobně prozkoumal tvorbu aduktů EO-His u potkanů, kterým podával radioaktivně značený EO. Izolovaný globin modifikovaný EO byl podroben totální kyselé hydrolyze s 6 M HCl. Adukty byly z hydrolyzátu izolovány vícestupňovou separací na ionexových sloupcích a po dvoukrokové derivatizaci methanolem a anhydridem kyseliny heptafluorbutanové byly následně analyzovány metodou GC/MS. Nalezené hladiny aduktů EO-His byly na úrovni desítek nmol/g hemoglobinu.

Podobným způsobem byly studovány i adukty PO, dalšího průmyslově významného epoxidu. Stanovení aduktů PO s aminokyselinou histidinem se věnovali zejména Farmer a spol. (1982 a 1986) a Osterman-Golkar a spol. (1984). U pracovníků exponovaných PO byla nalezena hladina aduktů PO-His na úrovni 4,5-13

nmol/g hemoglobinu, zatímco u pracovníků bez profesionální expozice byly nalezené hladiny na úrovni desetin nmol/g hemoglobinu.

Expozice methylačním činidlům (např. methylmethansulfonátům či methylbromidům) vede ke vzniku methylovaných aminokyselin, např. S-methylcystein byl studován v práci Farmer a spol. (1980).

Výše zmíněné publikace, pocházející vesměs z období konce sedmdesátých a první poloviny osmdesátých let, mají společné to, že v nich byla používána nespecifická analytická metoda. Tato „tradiční“ metoda zahrnovala totální hydrolyzu proteinu pomocí 6 M HCl, zakoncentrování aminokyselinových aduktů z hydrolyzátu obsahujícího nadbytek volných aminokyselin pomocí iontově výměnné chromatografie, vícestupňovou derivatizaci a stanovení metodou GC/MS (Farmer, 1986). Pro velkou pracnost byla tato metoda později prakticky opuštěna a nahrazena specifickými metodami vhodnými vždy pouze pro jednotlivé typy aduktů. Takovou metodou, která byla pro účely stanovení aduktů poprvé použita v polovině osmdesátých let, je modifikovaná Edmanova degradace (MED), kterou se stanovují adukty alkylačních činidel s N-koncovým valinem s velmi vysokou citlivostí na úrovni jednotek pmol/g globinu (Törnqvist, 1986; Mowrer, 1986; Rydberg, 2002).

Poslední dobou dochází ale k jakési renesanci původně používané tradiční metody. Při tom se používají určité zjednodušující úpravy postupu zahrnující např. nahrazení iontově výměnné chromatografie metodou SPE (extrakce aduktů pevnou fází) nebo obohacení vzorku o alkylované globinové řetězce (Bergmark, 1990). Tradiční metoda také doznala zvýšení citlivosti díky použití moderních analytických přístrojů, zejména GC/MS a LC/MS (Black, 1997; Noort, 1997; Mc Donald, 1994; Yeowell-O'Connell, 1996b; Mráz, 2004; Jágr, 2005b a 2007b). Jiný analytický přístup, odlišný od všech výše zmíněných, používá hydrolyzu inkubovaného globinu enzymem trypsinem s následnou analýzou tryptických štěpů pokročilými analytickými technikami užívajícími hmotnostní spektrometry, např. LC/MS/MS (Nakanishi, 1995). Tyto techniky umožňují určit nejen typ aduktu, ale i přesné místo alkylované aminokyseliny v řetězci globinu (Mamone, 1998; Miraglia, 2001; Birt, 1998).

Používání modifikované Edmanovy degradace k selektivnímu odštěpení N-koncových valinových aduktů různých elektrofilních činidel odstartovalo v polovině osmdesátých let 20. století jakýsi boom v počtu studií zabývajících se biologickým monitorováním expozice alkylačním činidlům. Bylo pokračováno ve stanovování expozice EO a PO pomocí jejich aduktů s N-koncovým valinem: EO-Val a PO-Val

(Farmer, 1996; Walker, 1993; Törnqvist, 1988; Kautiainen, 1991; Schettgen, 2002). Byl studován i vliv kouření na hladinu aduktů EO-Val (Bailey, 1988; Wu, 2004).

Metodou MED byly stanoveny i adukty jiných alkylačních činidel, např. neurotoxického akrylamidu a jeho metabolitu glycidamidu (Bergmark, 1991; Calleman, 1990; Sumner, 2003; Fennell, 2005). Při tom bylo zjištěno, že velká část expozice akrylamidu pochází z potravinových zdrojů, např. ze smažených jídel, hranolků a bramborových lupínků. Stanovením aduktů akrylamidu s cysteinem a N-koncovým valinem se zabývalo velké množství studií (Bergmark, 1993 a 1997; Hagmar, 2001; Calleman, 1994; Pérez, 1999; Paulsson, 2003).

Dalším často studovaným alkylačním činidlem je 1,3-butadien, důležitá surovina v gumárenském průmyslu. 1,3-Butadien podléhá v játrech oxidaci na 1,2:3,4-diepoxybutan. Toto činidlo je karcinogenní a jeho adukty s N-koncovým valinem byly stanoveny v mnoha studiích (Moll, 1999; Fred, 2004; Osterman-Golkar, 1996; Rydberg, 1996; Kautiainen, 2000; Begemann, 2001).

Benzen též může po své metabolické aktivaci vytvářet elektrofilní činidla. Vzniká z něho benzenoxid, který se může dále oxidovat až na 1,2- či 1,4-benzochinon. Stanovení jejich aduktů s aminokyselinou cysteinem po totální kyselé či enzymatické hydrolyze bylo popsáno ve studiích McDonald a spol. (1994) a Yeowell-O'Connell a spol. (1996b).

Hemminki zjistil při studiu tvorby aduktů epichlorhydrinu s různými polyaminokyselinami, že epichlorhydrin nejspíše reaguje s polycysteinem a polyhistidinem (Hemminki, 1983). Podobně Miraglia a spol. zjistili, že epichlorhydrin se v hemoglobinu nejčastěji váže na aminokyselinu histidin (Miraglia, 2001). Na tyto studie navázaly další práce studující tvorbu aduktů epichlorhydrinu s proteiny i s DNA (Landin, 1996 a 1999).

Mezi alkylační činidla patří i hořčičný plyn, bojová chemická látka, která je známější pod názvem yperit. Jeho adukty s aminokyselinami histidinem, valinem, kyselinou asparagovou a kyselinou glutamovou byly stanoveny po enzymatické hydrolyze inkubovaného globinu pronázou (Noort, 1997 a 2004; Black, 1997; Fidder 1996). Jiný postup využíval zásaditou hydrolyzu proteinu spojenou s následným stanovením uvolněného thiodiglykolu (Capacio, 2004). Posledně jmenovaný postup je vhodný ke stanovení celkového obsahu proteinových aduktů hořčičného plynu.

2.3.1.1.2. Ostatní látky tvořící adukty s proteiny

Do této kapitoly lze zařadit všechna ostatní elektrofilní činidla schopná tvořit adukty, která nebyla zařazena do předchozí kategorie alkylačních činidel. Z toxikologicky nejvýznamnějších studovaných látek je možno jmenovat: aromatické aminy (Sabbioni, 1998), anhydridy (Kristiansson, 2002), izokyanáty (Sabbioni, 2001; Mráz 2004) či polychlorované bifenyly (Tampal, 2003).

Studie, zabývající se adukty alkylačních činidel či dalších jiných látek s proteiny, byly do dnešní doby shrnuty do několika přehledných článků (Törnqvist, 2002; Bailey 1987; Farmer, 1993, 1999 a 2004; Boogaard, 2002).

2.3.2. Adukty SO

Menší část SO vzniklého v játrech je vyloučena do krevního oběhu. Zde SO ochotně reaguje s přítomnými biomakromolekulami (např. s krevními proteiny nebo s DNA) a dochází ke vzniku aduktů SO.

Styren-7,8-oxid je chirální molekula s jedním stereogenním centrem na epoxidickém uhlíku a může existovat ve dvou enantiomerních formách: (*R*)-SO a (*S*)-SO. Díky tomu, že reakce SO s nukleofilní skupinou může probíhat na obou elektrofilních epoxidových uhlících ($C\alpha$ nebo $C\beta$), vznikají dva možné typy regioizomerů: 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 regioizomerů dochází k inverzi absolutní konfigurace na uhlíku $C\alpha$, zatímco tvorba 22HPE regioizomerů probíhá za zachování původní konfigurace na uhlíku $C\beta$.

2.3.2.1. Stanovení aduktů SO s proteiny

Styren-7,8-oxid se s různou mírou intenzity váže na nukleofilní vazebná místa přítomná v krevních proteinech, např. v globulinu či v sérovém albuminu. Nejčastěji se váže na α -aminoskupinu N-koncové aminokyseliny (např. valinu u globulinu), thiolovou skupinu v cysteinu a oba imidazolové dusíky v histidinu. 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 vzniklé SO adukty obsaženy v proteinu v různé míře.

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.

2.3.2.1.1. Využití modifikované Edmanovy degradace

Metoda používající modifikované Edmanovy degradace (MED) se využívá ke stanovení aduktů s N-koncovou aminokyselinou. V případě lidského globinu je touto aminokyselinou výhradně valin. Pomocí činidla pentafluorfenylizothiokyanátu 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-izopropylhydantoin), který je z reaktivní směsi selektivně extrahován a stanoven metodou GC/MS s negativní chemickou ionizací (Törnqvist, 1986). Tato velmi selektivní a citlivá metoda byla hojně aplikována ke studiu aduktů SO s N-koncovým valinem (SO-Val) (Pauwels, 1997).

První použití MED bylo publikováno ve studii Nordqvist a spol. (1985), kteří intraperitoneálně (i.p.) podávali myším styren radioaktivně značený ^{14}C . Po izolaci hemoglobinu (Hb) a aplikaci MED zjistili, že adukty SO-Val tvoří jen 3 % z celkového SO navázaného na Hb. 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. (1993) studovali stabilitu a kinetiku vzniku aduktů SO-Val a jejich korelaci s DNA adukty a s vylučováním metabolitů styrenu (MA a styrenglykolu) v moči. 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 hranicích meze stanovitelnosti. U 7 exponovaných osob našli průměrnou hladinu aduktů SO-Val 28 pmol/g globinu, avšak pozitivní nálezy byly zaznamenány i u osob neexponovaných. Následně Severi a spol. nenašli po aplikaci MED adukty SO-Val u žádného pracovníka, který byl součástí pracovní skupiny exponované průměrně 8 ppm styrenu v ovzduší (Severi, 1994).

Osterman-Golkar studoval metodou MED vznik aduktů SO-Val u laboratorních potkanů a myši exponovaných styrenu a SO *in vivo* (Osterman-Golkar, 1995). Při zkoumání vztahu mezi hladinou aduktů SO-Val a mírou expozice zjistil, 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 Pauwels, který podával intraperitoneálně styren laboratorním myším v rozmezí 0 až 4,35 mmol/kg živé váhy (Pauwels, 1996). Výsledná hladina aduktů SO-Val byla zjištěna v rozmezí <10 až 305 pmol/g Hb. Tentýž autor později provedl srovnávací studii *in vitro* inkubace lidského Hb různými alkylačními činidly (ethylenoxid, propylenoxid, SO) a zjistil, že SO reaguje s N-koncovým valinem lidského Hb ve srovnání ostatními epoxidy (EO a PO) relativně velmi málo (Pauwels, 1998). EO a PO vytvářejí adukty s N-koncovým valinem v mnohem větší míře.

Johansson a spol. exponovali čtyři dobrovolníky parám styrenu značeného ¹³C o koncentraci 50 ppm po dobu 2 hod (Johansson, 2000). Poté v jejich krvi našli jen stopy aduktů SO-Val značených ¹³C, jejichž průměrná odhadnutá hladina byla 0,3 pmol/g globinu. Takto nízká hladina narážela na teoretické limity analytické metody. Vodička a spol. 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 globinu u pracovníků profesionálně exponovaných styrenu (Vodička, 1999).

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* relativně vysokým dávkám styrenu. Proto byly zkoumány další cesty umožňující stanovení aduktů SO s jinými aminokyselinami.

2.3.2.1.2. Využití Raneyova niklu (Ra-Ni)

Použitím Ra-Ni jako katalyzátoru selektivně štěpícího sulfidické vazby přítomné v proteinu lze stanovit cysteinové adukty. Pokud je Ra-Ni použit v případě proteinu nesoucího adukty SO s cysteinem (SO-Cys), dojde k uvolnění navázané molekuly SO v podobě 1-fenylethanolu (1-PE) a 2-fenylethanolu (2-PE), které lze ze směsi

extrahovat a snadno stanovit metodou GC. Tuto metodu poprvé zavedli Ting a spol. pro měření 2-PE, který vzniká uvolněním SO z molekuly S-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinu (Ting, 1990). U potkanů byla pozorována dobrá korelace mezi velikostí expozice SO *in vivo* a množstvím uvolněného 2-PE z aduktů SO-Cys.

Na tuto práci navázali Rappaport a spol., kteří testovali použitelnost metody na vzorcích Hb a Alb získaných z lidské a potkaní krve exponované SO *in vitro* (Rappaport, 1993 a 1996). Yeowell-O'Connell a spol. rozšířili měření i na 1-PE, který se uvolnil štěpením sulfidické vazby S-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinu (Yeowell-O'Connell, 1996a). V této *in vivo* studii provedené na lidských pracovnících byla nalezena korelace jen mezi hladinou aduktů SO-Cys přítomných v Alb u lidí a velikostí expozice styrenu a SO v pracovním ovzduší. Podobná korelace v případě aduktů SO-Cys v Hb nebyla nalezena. Hlavním nedostatkem této a dalších podobných studií využívajících Ra-Ni byla potíž s relativně vysokými hladinami 1-PE a 2-PE, které byly překvapivě poměrně vysoké (na úrovni cca jednotek nmol/g globinu) a které byly pozorovány i u neexponovaných kontrolních osob. Přitom profesionální expozice nevedly k významnému zvýšení hladin těchto biomarkerů (Rappaport, 1999; Fustinoni, 1998).

2.3.2.1.3. Využití mírně 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 SO-Asp a SO-Glu lze snadno štěpit alkalickým činidlem, přičemž dochází k uvolnění styrenglykolu (SG) (Sepai, 1993). Sepai použil SO značený radioaktivním uhlíkem ^{14}C v koncentraci 8,7 mM k *in vitro* inkubaci lidské krve po dobu 24 hod. Po provedení alkalické hydrolyzy 0,1 M NaOH dospěl analýzou uvolněného SG ke zjištění, že cca 15 % aduktů SO přítomných v globinu bylo ve formě esterů. Byl proveden pokus i o stanovení aduktů SO-Asp a SO-Glu u lidí exponovaných styrenu *in vivo*, ale nalezené hladiny SG byly pod limitem detekce metody (< 15 pmol/g globinu). Osterman-Golkar navíc ve své studii zjistil, že estery SO jsou po svém vzniku v organismu nestabilní, čímž se liší od aduktů SO-Val (Osterman-Golkar, 1995). Zatímco pokles obsahu aduktů SO-Val po jednorázové expozici styrenu u laboratorních zvířat byl přibližně lineární, pokles obsahu aduktů SO-Asp a SO-Glu byl mnohem rychlejší, což se nedalo vysvětlit jen pouhým odbouráváním hemoglobinu obsahujícího adukty SO.

Rozsáhlou srovnávací studii provedli Yeowell-O'Connell a spol. (1997), kteří inkubovali vzorky lidské, potkaní a myší krve *in vitro* různým koncentracím SO v rozmezí 0 až 1000 μM . Po izolaci příslušných SO-modifikovaných globinů v nich stanovili obsah aduktů SO-Val technikou MED, dále obsah aduktů SO-Cys technikou Ra-Ni a obsah esterů SO technikou využívající mírně alkalickou hydrolyzu. Autoři pozorovali velké mezidruhové rozdíly v obsahu zkoumaných aduktů, zejména v obsahu aduktů SO-Cys. Nejpočetnějšími nalezenými adukty v lidské krvi byly estery SO, následované S-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinem, N α -(2-fenyl-2-hydroxyethyl)valinem a nejméně byl přítomen S-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)cystein. U myší a potkanů bylo toto pořadí jiné. Nejvíce bylo nalezeno S-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinu následovaného S-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinem a estery SO. Adukty SO s jinými aminokyselinami (např. His nebo Lys) nebyly v této studii stanoveny.

2.3.2.1.4. Ostatní nesespecifické metody

Jednu z prvních studií zkoumajících obecně vznik aduktů SO s aminokyselinami provedl Hemminki (1983). 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 \gg 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* různým koncentracím SO byl studován též metodami současné proteomiky. Takto modifikovaný globin byl pak podroben enzymatické 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. inkubovali hemoglobin *in vitro* 25 mM roztokem racemického SO (Kaur, 1989). Následnou HPLC-CID-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 autoři, kteří inkubovali lidský hemoglobin širšímu rozsahu koncentrací SO a při tom zjistili výskyt aduktů SO i na dalších vazebných místech v hemoglobinu. Badghisi a spol. analyzovali metodou LC/MS/MS s ionizací elektrosprejem Hb inkubovaný 40 mM koncentrací SO (Badghisi, 2002). 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. (2002) zjistili použitím kombinace LC/MS s elektrosprejovou ionizací a techniky MALDI-TOF u Hb inkubovaného s SO v molárním poměru 1:10⁻⁴ (Hb: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 Hb inkubovaného s SO v molárním poměru 1:5 (Hb: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 Hb při relativně nízkých koncentracích SO *in vitro* je aminokyselina histidin, následovaná cysteinem a teprve až pak N-koncovým valinem.

Bohužel v těchto studiích nebyla studována tvorba různých regioizomerů aduktů SO, která je zejména v případě aduktů SO s histidinem (SO-His) velmi zajímavá, neboť u histidinu mohou být alkylovány oba dva imidazolové dusíky. Za zmínku stojí i to, že ve třech výše zmíněných studiích nikdo nezaznamenal výskyt aduktů SO s jinými dalšími aminokyselinami (kromě Cys, His a Val), např. s lysinem, tak jak bylo zjištěno ve studiích Jágr a spol. (2005b a 2007b).

Hlavním nedostatkem metod popsaných v této kapitole (jedná se většinou o variace na přímé LC/MS analýzy tryptických štěpů po enzymatické hydrolyze globinu) je fakt, že použitá metoda neumožňuje zahrnout do postupu separaci analytů od nadbytku matrice, takže citlivost metody je limitována množstvím vzorku, které může být vneseno do analytického systému.

Lze konstatovat, že dosud žádný postup stanovení aduktů SO s aminokyselinami v globinu nebo sérového albuminu se neukázal jako vhodný pro rutinní účely biologického monitorování expozice styrenu u člověka.

2.3.3. Adukty s DNA

Využití aduktů elektrofilních činidel (např. SO) s DNA pro účely biologického monitorování expozice v praxi je díky velmi nízkému obsahu DNA v organismu velmi problematické. Průměrný obsah DNA v krvi činí cca 6 μ g/ml (Lodish, 2001; Törnqvist, 2002). Poločas života lymfocytů je sice, na rozdíl od erythrocytů, větší než

180 dnů, vzhledem k účinku reparačních enzymů je ale poločas života vzniklých DNA aduktů obvykle menší než 24 hodin.

Na druhou stranu schopnost nějaké sloučeniny se vázat na DNA báze je obecně chápána jako přímý výraz jejího mutagenního a karcinogenního potenciálu (Poirier a Weston, 1996). Stanovení aduktů cizorodých látek s DNA je jedním z nejvhodnějších způsobů, jak posoudit míru genetického poškození účinkem těchto látek.

Elektrofilní činidla se v DNA váží na nukleofilní vazebná místa, jako jsou dusíkové a kyslíkové atomy v guaninu a dusíkové atomy v adeninu. Nejaktivnějšími z těchto míst jsou dusíkové atomy v pozici N-7 v guaninu a N-3 v adeninu. Stabilita vzniklých aduktů je různá, adukty jsou selektivně odstraňovány účinkem reparačních enzymů, nebo jsou odstraněny spontánní depurinací. Aktivita opravných mechanismů navíc často závisí na rozdílech v individuálních schopnostech reparace DNA. Přesto se může stát, že odstranění aduktů není stoprocentní a DNA adukty pak způsobí chybné párování DNA bází během replikace a tak dochází k mutacím, které mohou vést k iniciaci procesu karcinogeneze.

DNA adukty se vyskytují ve velmi nízkých hladinách, proto jejich detekce vyžaduje vysoce citlivé a selektivní analytické techniky, schopné stanovit přibližně jeden DNA adukt na 10^6 - 10^8 nemodifikovaných DNA bází. DNA adukty se stanovují buď jako odpovídající nukleosidy či nukleotidy získávané z různých zdrojů, jako jsou leukocyty a lymfocyty nebo případně jako příslušné purinové či pyrimidinové báze vzniklé odštěpením modifikovaných bází a jejich vyloučením do moče.

Byla vyvinuta řada metod vhodných ke stanovení DNA aduktů, některé z nich jsou zcela odlišné od metod zkoumajících adukty s proteiny. Nejrozšířenější technikou detekce DNA aduktů je užití metody ^{32}P postlabellingu. Jedná se vlastně o dvojdimenzionální TLC separaci radioizotopicky značeného analytu, ve které se vzorek DNA enzymaticky rozštěpí na deoxyribonukleosid-3'-monofosfáty, které se následně enzymaticky označí radioaktivním fosforem ^{32}P na jejich 5'-konci. DNA adukty se pak detegují pomocí autoradiografie (Vodička, 1993 a 1996; Kumar, 1997; Otteneder, 1999). Jedná se o velmi citlivou metodu (je schopna detekovat jeden DNA adukt mezi 10^9 nukleotidy) a vyžaduje pouze malá množství DNA (2-10 μg) (Moller, 1993; Koskinen, 2000). Bohužel tato vysoce citlivá metoda není schopna přímo určit strukturu zkoumaných aduktů, a tak každý postup musí být optimalizován pro každý jednotlivý typ aduktu.

Jinou metodou, která v poslední době dynamicky rozvíjí své pole působnosti, je využití metod hmotnostní spektrometrie v kombinaci se separačními technikami. Tyto metody nabízejí dobrou citlivost a navíc umožňují zkoumat strukturu aduktu. Jako příklad využití LC/MS metody může sloužit stanovení 7-(2-hydroxyethyl)guaninových derivátů nebo detekce a charakterizace biomarkerů aflatoxinů v moči potkanů vystavených působení aflatoxinu B₁ (Liao, 2001; Walton, 2001). GC/MS metoda byla použita k analýze O⁶-methyl- a O⁶-(hydroxyethyl)guaninu (Chiu, 1993).

2.3.3.1. Stanovení aduktů SO s DNA

SO adukty s DNA jsou nejčastěji stanovovány metodou ³²P-postlabellingu (Vodička 1993 a 1996; Kumar 1997; Otteneder, 1999; Edler, 2005).

Zajímavou metodu kvantifikace nukleotidů z DNA modifikované SO popisují ve své práci Siethoff a spol. (1999). Tito autoři využili kombinace LC/MS s elektrosprejovou ionizací a získali slibné výsledky blížíící se nejcitlivějším dosud známým metodám. V současné době byla metodou LC/MS/MS prokázána v moči laboratorních myši exponovaných styrenu přítomnost 7-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)guaninu a 7-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)guaninu, guaninových bází odvozených od aduktů SO s DNA. Bylo však zjištěno, že jen asi 10⁻⁵ % z celkové absorbované dávky styrenu je tvořeno těmito guaninovými adukty (Vodička, 2006b).

Problematika aduktů SO s DNA byla přehledně shrnuta v práci Vodičky a spol., kde čtenář nalezne i odkazy na citace významných článků (Vodička, 2002a).

2.4. Metoda extrakce tuhou fází (SPE) a její využití ke studiu aduktů

2.4.1. Teoretický úvod k metodě SPE

Metoda extrakce tuhou fází (SPE - solid phase extraction) patří k jednomu z mnoha efektivních nástrojů moderní analytické chemie (Hennion, 1999; Fontanals, 2004). Hlavním principem metody SPE je záchyt určité sloučeniny, na kterou je zaměřena pozornost a která je ve vzorku většinou přítomná v komplexní směsi, na vhodném sorbentu. Při tom je žádoucí, aby ostatní složky vzorku na sorbentu zachycovány nebyly a mohly být vymyty promývacím roztokem. Poté je zachycená složka ze sorbentu uvolněna elučním roztokem, zakoncentrována či případně dále nějak upravena a stanovena. Ve výsledku lze tak tohoto principu využít k mnoha dalším

různým účelům, jako je např. přečišťování vzorků od solí či od jiných nežádoucích složek nebo zakoncentrování stopových množství sloučenin. V praxi doznala metoda SPE využití v mnoha rozmanitých analytických aplikacích. Byla využita v různých environmentálních analýzách, zabývajících se stanovením farmaceutických substancí (Weigel, 2004), stanovením pesticidů (Frassanito 1998) či jiných škodlivých látek v povrchových vodách (Kostrhounová, 2004; Rodríguez, 2000). Dále byla využita k analýze škodlivin v potravinách, např. ke stanovení obsahu akrylamidu v hranolkách (Becalski, 2004). Metoda SPE byla též využita v biologickém monitorování k prekoncentraci malých množství aduktů ze vzorků, jak je více rozepsáno v kapitole 2.4.2.

Tabulka 2. Přehled základních typů stacionárních fází používaných v SPE.

	Typ fáze	Obchodní značení
reverzní fáze	oktadecyl	C ₁₈
	oktyl	C ₈
	fenyl	Ph
normální fáze	silika	Si
	aminopropyl	NH ₂
	kyanopropyl	CN
iontově výměnné fáze	anex (kvartérní amin)	SAX
	katex (kyselina sulfonová)	SCX
polymerní fáze	styren-divinylbenzen	Strata-X

Využití metody SPE k zamýšleným účelům závisí především na typu analyzované látky a na nalezení vhodného sorbentu, který by byl schopen za určitých podmínek tuto látku ze směsi extrahovat. SPE sorbenty lze rozdělit na několik typů, prvním a dosud nejužívanějším typem „klasického“ SPE sorbentu je silikagel, modifikovaný různými, nejčastěji nepolárními, koncovými skupinami. Podle typu koncové skupiny pak takovýto sorbent pracuje buď v reverzním či normálním módu anebo slouží jako měnič iontů. Dalším typem SPE sorbentu, jsou vysoce zesíťované polymerní sorbenty, velmi často polystyren-divinylbenzenového typu (PS-DVB, např. sorbent Strata-X od fy. Phenomenex). Tento typ sorbentu má díky svému velkému specifickému povrchu (800-1200 m²g⁻¹) vyšší retenční schopnost než předchozí „klasický“ typ, jehož

specifický povrch je 350-500 m²·g⁻¹. Do polymerních sorbentů jsou navíc vnášeny různé polární skupiny, např. komerčně dostupný SPE sorbent Oasis-HLB od fy. Waters má díky svému složení (kopolymer N-vinylpyrrolidonu s divinylbenzenem) hydrofilní vlastnosti, vhodné zejména pro retenci polárních sloučenin. V tabulce 2 je uveden přehled některých základních typů stacionárních fází připravovaných firmou Phenomenex pro použití v SPE.

2.4.2. Využití metody SPE ke stanovení aduktů

Metodu SPE lze díky jejím schopnostem s výhodou využít i k aplikacím v toxikologii. Schopnost zakoncentrování stopových množství sloučeniny se výborně hodí tam, kde je obsah sloučeniny prakticky nedetekovatelný, jak tomu často bývá v případě některých metabolitů v moči nebo DNA či proteinových aduktů v biologických materiálech.

Tak „klasická“ SPE na C₁₈ sorbentu byla využita k přečištění vzorků lidské moči a k následnému stanovení merkapturových kyselin (Maestri, 1996). SPE extrakce byla využita i k prekoncentrování DNA aduktů z moči. Takto byly studovány DNA adukty N,N-dimethylformamidu či benzo[*a*]pyrenu (Hennebrüder, 2005; Chen-Lung, 2005).

Jiní autoři provedli zakoncentrování N τ -(2-hydroxyethylthioethyl) histidinových aduktů na SPE kolonkách. Tímto způsobem byli schopni detekovat tyto adukty ve vzorcích globinu získaných z krve lidských obětí otrav hořčičným plynem (Black, 1997). Helleberg a Törnqvist provedli zakoncentrování aduktů benzo[*a*]pyren-diolepoxidu s histidinem ze vzorků lidského sérového albuminu a hemoglobinu. Po aplikaci vysokoúčinné μ HPLC/MS/MS metody dosáhli citlivosti měření aduktů na úrovni fmol/g (Helleberg, 2000). V poslední době byla popsána metoda stanovení aduktů akrylamidu s valinem, která využívá extrakce těchto aduktů na SPE kolonkách Strata-X (Ospina, 2005).

2.5. Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE) a její využití ke studiu aduktů

2.5.1. Teoretický úvod k PAGE

Polyakrylamidová elektroforéza (PAGE) patří do skupiny elektroanalytických separačních metod, které využívají vlivu elektrického pole k dělení látek. V PAGE dochází k dělení různých látek v polyakrylamidovém gelu, čehož se využívá zejména

k analýzám organických biomakromolekul, např. DNA a proteinů. Do dnešní doby doznalo provedení PAGE různých modifikací, nejrozšířenější modifikací je tzv. konvenční SDS-PAGE, kterou poprvé zavedl Laemmli (1970). V SDS-PAGE se používá přídavek dodecylsírany sodného (SDS) do polyakrylamidového gelu i ke vzorku, kde slouží jako detergent. SDS je schopen obalit molekuly proteinu a změnit jejich tvar do válcovité podoby. Většina proteinů váže SDS ve stejném poměru, asi 1,4 g SDS/g proteinu, což odpovídá zhruba jedné molekule SDS na dva aminokyselinové zbytky. Vysoký negativní náboj navázaného SDS překrývá vlastní náboj proteinu, takže proteiny pokryté SDS mají shodné poměry počtu nábojů na jednotku hmoty a podobný tvar. Následkem toho se při SDS-PAGE proteiny dělí působením gelové filtrace podle své molekulové hmotnosti. Schopnost gelu dělit proteiny o určitém rozmezí M_r závisí na velikosti pórů gelu, tj. na stupni zesíťování gelu. Menší molekuly snáze pronikají póry gelu a tak se v elektrickém poli pohybují rychleji, větší molekuly pronikají póry hůře a tím se pohybují relativně pomaleji. Po ukončení elektroforézy se oddělené molekuly vzorku detekují obarvením. S přesností 5-10 % je možno stanovit pomocí SDS-PAGE molekulovou hmotnost běžně velkých proteinů (Voet, 1995). Relativní pohyblivost proteinů se při SDS-PAGE lineárně mění s logaritmem jejich molekulové hmotnosti dle vztahu [1].

Vzdálenost, kterou molekuly vzorku urazily, se kalibruje na příslušné značkovací standardy, jejichž molekulová hmotnost je známa.

$$\log (M_r) = a \times s + b \quad [1]$$

(s - vzdálenost uražená molekulou v mm, koeficienty a , b se určí z rovnice získané měřením značkovacích proteinů o známé M_r)

Mnohem méně používanými modifikacemi gelové elektroforézy je tzv. nativní PAGE (Lee, 1999; Al-Saleh, 2002), nebo prakticky neznámá kyselá PAGE (Alter, 1980). Nativní PAGE nepoužívá přídavek žádného detergentu, takže k dělení molekul vzorku v gelu vlivem elektrického pole dochází převážně na základě skutečného celkového náboje příslušných molekul, který závisí na jejím složení. Vzhledem k nutnosti optimalizovat podmínky separace pro každý druh molekuly zvlášť a tím i vysoké pracovní metody nedoznala nativní PAGE do současnosti příliš velkého rozšíření.

Další, v dnešní době se bouřlivě rozvíjející modifikace gelové elektroforézy, je její dvojdimenzionální varianta, která je vhodná k dělení velmi komplexních směsí bílkovin v proteomice, obsahujících stovky až tisíce sloučenin. V tomto případě nejprve dochází při dělení v prvním směru k izoelektrické fokusaci proteinů. Posléze dochází ve druhém směru k dělení bílkovin metodou SDS-PAGE (Dunn, 1987; Chiou, 1999; Tietz, 1987).

Proteiny se nejčastěji vizualizují barvivem nazvaným Coomassie-modř (Herbert, 2001; Dunn, 1987). Asi padesátkrát citlivější, ale zároveň více pracnou metodou je barvení proteinů stříbrem (Patras, 1999; Lopez, 2000). Jiný způsob detekce bílkovin používá vyříznutí proteinů z gelu a následnou aplikaci metod MALDI-TOF (Schrimpf, 2001) či LC-ESI-TOF-MS (Raymackers, 2000).

2.5.2. Využití PAGE k separaci globinu

Separace intaktních globinových řetězců byla popsána v práci Lie-Injo a spol. (1978). Tito autoři použili metodu SDS-PAGE ke screeningu neobvyklých a prodloužených forem hemoglobinu. Alter a spol. (1980) využili kyselou PAGE s přidavkem močoviny k separaci α , β a γ řetězců globinu. Falk a spol. (1998) zkoumali pomocí kyselé PAGE rybí varianty hemoglobinu. Pomocí nativní PAGE byly zkoumány různé proteiny, ale k separaci globinových řetězců se tento přístup neosvědčil (Lee, 1999; Al-Saleh, 2002).

Do dnešního dne nebyly popsány žádné přístupy využívající PAGE k biologickému monitorování aduktů SO s proteiny. V této studii byla optimalizována Laemmliho konvenční SDS-PAGE k analýze vzorků globinů s navázanými adukty SO. Po obarvení proteinů stříbrem byla u vzorků stanovena jejich M_r a tím i nepřímo množství SO navázaného na proteiny.

3. CÍLE PRÁCE

Předkládaná dizertační práce je součástí výzkumného záměru odborné skupiny pro hodnocení expozice chemickým látkám na pracovišti SZÚ, která se dlouhodobě zabývá zkoumáním aduktů průmyslově významných látek a jejich metabolitů s proteiny. Práci v této skupině jsem měl možnost se věnovat zkoumání aduktů SO z netradičního hlediska a za použití moderních analytických postupů.

Výzkum jsem prováděl především s těmito cíli:

- Prostudovat adukty SO s aminokyselinami přítomnými v lidském globinu inkubovaném větším množstvím SO *in vitro*. Identifikovat nejzastoupenější adukty, které by byly vhodné jako biomarkery expozice.

- Vyvinout postup syntézy standardů těchto aduktů. Vzhledem k tomu, že adukty mohou nabývat podoby více regioizomerů a diastereomerů, bylo nutno následně vyvinout postup separace těchto izomerů ze směsi a charakterizovat chemickou strukturu jednotlivých izomerů.

- Připravit deuterované analogy příslušných aduktů.

- Provést kvantitativní analýzu aduktů SO metodou GC/MS v materiálu získaném inkubací lidské krve SO *in vitro* za využití připravených standardů a jejich deuterovaných analog jako vnitřních standardů.

- Vyvinout analytický postup vhodný k extrakci aduktů SO z hydrolyzátu SO-modifikovaného lidského globinu.

- Provést obohacení hydrolyzátu SO-modifikovaného lidského globinu o adukty SO a provést kvantitativní analýzu těchto aduktů metodou GC-FID.

- Dalším cílem této práce bylo prostudovat využití PAGE pro analýzu vzorků SO-modifikovaného lidského globinu.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1. Seznam chemikálií

L-Cystein^a, Na-(*terc*-butoxykarbonyl)-L-histidin^a, Na-(*terc*-butoxykarbonyl)-L-lysin^a, (*R*)-styren-7,8-oxid [(*R*)-SO, >98 %], kyselina 3-chlorperoxybenzoová (~70 %), triethylamin (>99,5 %), dimethylsulfoxid-*d*6 (DMSO-*d*6, 99,9 % D), (*S*)-2-chlor-1-fenylethanol (>97 %), *N-terc*-butyldimethylsilyl-*N*-methyl-trifluoracetamid (MTBSTFA, >97 %), *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid obsahující 1 % trimethylchlorsilanu (BSTFA + TMCS), ethylchlormravenčan (ECF, >98 %), izobutylchlormravenčan (iBuCF, >96 %), heptafluorbutanol (HFB, >95 %), pyridin (>99 %), dodecylsiran sodný (SDS, >99 %), akrylamid (>99 %), methylen-bisakrylamid (Bis, >99 %), tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris, >99,8 %), glycin (>99 %), *N,N,N',N'*-tetramethylethylendiamin (TEMED, >99 %), peroxodisíran amonný (APS, >98 %) a 2-merkptoethanol (>99 %) byly nakoupeny od Fluky, Švýcarsko. (*S*)-Styren-7,8-oxid [(*S*)-SO, 98%] a styren-*d*8 (98 %) byly obdrženy od firmy Aldrich, USA. Kyselina trifluoroctová (TFA, 99 %) pocházela od fy. Riedel de Haën. Acetonitril (ACN, gradient grade pro HPLC) byl zakoupen od fy. Merck, Německo. *N,N*-Dimethylformamid (DMF, >99,8 %) a heptan (99,5 %) od Fluky byly před použitím skladovány nad molekulovým sítem. Pronase[®] (směs proteolytických enzymů získaných z mikroorganismu *Streptomyces griseus*) byla nakoupena od fy. Calbiochem, USA. Od fy. Sigma byl nakoupen i kit obsahující směs nízkomolekulárních proteinů o známé relativní molekulové hmotnosti: hovězí sérový albumin, ovalbumin, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza, anhydráza, trypsinogen, soybean trypsinový inhibitor, α -laktalbumin a aprotinin. Tento kit byl využíván jako standard v PAGE. Všechny ostatní chemikálie, jako methanol, chloroform, dichlormethan, glycerol, bromfenolová modř, dusičnan stříbrný, formaldehyd, octan sodný, uhličitan sodný, absolutní ethanol, kyselina octová a kyselina mravenčí byly analytické čistoty (p.a.) a byly zakoupeny od firmy Lachema, Česká republika. Lidská plná krev byla získána od zdravých dobrovolníků.

^aV této práci použité názvosloví aminokyselin a od nich odvozených aduktů je založeno na systému absolutní konfigurace, zavedeném autory Cahn-Ingold-Prelog (1966). V tomto systému L-cystein odpovídá (*R*)-cysteinu, zatímco L-histidin a L-lysin odpovídají (*S*)-histidinu, respektive (*S*)-lysinu.

4.2. Experimentální zařízení

Spektra nukleární magnetické rezonance byla měřena na NMR spektrometru Varian Gemini 300 (USA), pracovní frekvence 300 MHz pro ^1H . Deuterovaný DMSO- d_6 byl použit jako rozpouštědlo a zároveň i jako referenční složka; hodnoty δ jsou udány v ppm, hodnoty J v Hz.

LC/MS chromatografie byla provedena na systému Waters 2695 Alliance připojeném k Bruker Daltonics Esquire 2000 hmotnostnímu spektrometru vybavenému iontovou pastí a elektrosprejovým ionizátorem (ESI) pracujícím v pozitivním módu. Analýzy vzorků na tomto přístroji byly prováděny na koloně Synergi Polar RP 80Å 4 μm (délka 150 mm, vnitřní průměr 2,0 mm, dávkovaný objem vzorku 5 μl) s předkolonou Security Guard od fy. Phenomenex (USA). Složení použité mobilní fáze bylo: 0,1 % kyselina mravenčí, průtok mobilní fáze: 0,12 ml/min. Bruker Daltonics hmotnostní spektrometr byl též použit pro měření ESI hmotnostních spekter jednotlivých sloučenin. V tomto případě byly vzorky rozpuštěny v 0,1 % kyselině mravenčí a zaváděny injekční stříkačkou poháněnou pumpou do hmotnostního spektrometru, hodnoty jsou udány v m/z .

Semi-preparativní HPLC byla provedena na Waters HPLC chromatografu skládajícím se z pumpy Waters 606 a UV detektoru Waters 490E. Jednotlivé sloučeniny byly monitorovány při vlnové délce 220 nm. Separace byla provedena na semi-preparativní koloně Synergi Polar RP 80Å 4 μm (délka 250 mm, vnitřní průměr 10 mm, průtoková rychlost: 5 ml/min.).

GC/MS analýzy byly prováděny na systému Finnigan GCQ vybaveném iontovou pastí. Složky byly analyzovány na kapilární koloně DB-5ms (délka 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm, tloušťka filmu 0,25 μm) zakoupené od firmy J&W Scientific. Nosný plyn: helium o lineární průtokové rychlosti 30 cm/sec. Pro kvantitativní analýzu byl použit injektor pracující v režimu splitless, kvalitativní analýzy byly prováděny v režimu split 1:10. Teplota injektoru: 270 °C, teplotní program kolony: izotermálně 150 °C po dobu 2 min, poté nárůst teploty 5 °C/min až na 200 °C, dále gradient 10 °C/min do dosažení 300 °C, nakonec izotermálně 300 °C po dobu 10 min., teplota „transfer line“: 300 °C, iontového zdroje: 200 °C. Sloučeniny byly v hmotnostním spektrometru ionizovány nárazem elektronů (EI), energie elektronů: 70 eV; hodnoty jsou udány v m/z (rel. %).

GC-FID analýzy byly prováděny na GC chromatografu Agilent 6890N, vybaveném automatickým dávkovačem Agilent 7693 a plamenovým ionizačním

detektorem (FID, teplota detektoru 250 °C). V tomto případě jako nosný plyn sloužil dusík, jinak všechny ostatní významné parametry měření byly totožné s parametry použitými v případě GC/MS analýz.

Měření UV spekter bylo provedeno na Varian UV spektrometru. Jednotlivé sloučeniny byly rozpuštěny v roztoku 0,1 % TFA: acetonitril (ACN), 90:10, v/v.

Polyakrylamidová gelová elektroforéza byla provedena na zařízení Bio Rad pro vertikální elektroforézu.

Názvy všech připravených syntetických standardů aduktů SO-Cys, SO-Lys a SO-His jsou přehledně shrnuty v tabulce 3. Sušení vzorků před derivatizací probíhalo v Gyrovapu - vyhřívané odstředivce připojené ke zdroji vakua.

Tabulka 3. Seznam připravených aduktů aminokyselin (*R*)-cysteinu, (*S*)-lysinu a (*S*)-histidinu s enantiomery styren-7,8-oxidu: (*R*)-SO a (*S*)-SO. Struktura těchto aduktů je znázorněna ve schématech 2-4.

Aminokyselina	(<i>R,S</i>)-SO ^a	(<i>R</i>)-SO	(<i>S</i>)-SO
<i>(R)</i> -cystein	S-(21HPE)cystein: <u>1</u>	(<i>S,R</i>)- <u>1</u>	(<i>R,R</i>)- <u>1</u>
	S-(22HPE)cystein: <u>2</u>	(<i>R,R</i>)- <u>2</u>	(<i>S,R</i>)- <u>2</u>
<i>(S)</i> -lysin	N ϵ -(21HPE)lysin: <u>3</u>	(<i>S,S</i>)- <u>3</u>	(<i>R,S</i>)- <u>3</u>
	N ϵ -(22HPE)lysin: <u>4</u>	(<i>R,S</i>)- <u>4</u>	(<i>S,S</i>)- <u>4</u>
<i>(S)</i> -histidin	N π -(21HPE)histidin: <u>5</u>	(<i>S,S</i>)- <u>5</u>	(<i>R,S</i>)- <u>5</u>
	N π -(22HPE)histidin: <u>6</u>	(<i>R,S</i>)- <u>6</u>	(<i>S,S</i>)- <u>6</u>
	N τ -(21HPE)histidin: <u>7</u>	(<i>S,S</i>)- <u>7</u>	(<i>R,S</i>)- <u>7</u>
	N τ -(22HPE)histidin: <u>8</u>	(<i>R,S</i>)- <u>8</u>	(<i>S,S</i>)- <u>8</u>

^a 21HPE: 1-fenyl-2-hydroxyethyl; 22HPE: 2-fenyl-2-hydroxyethyl

4.3. Syntéza aduktů SO

4.3.1. Syntéza aduktů SO-Cys: S-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinu 1 a S-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinu 2

L-Cystein (120 mg, 1 mmol) byl rozpuštěn ve vodě (2 ml), do které byl přidán triethylamin (140 μ l, 1 mmol). Do tohoto roztoku byl následně po kapkách přidán opticky čistý (*R*)-SO nebo (*S*)-SO (228 μ l, 2 mmol). Reakce v tomto roztoku probíhala při pokojové teplotě a za stálého míchání po dobu dvou hodin. Následně byla provedena TLC analýza reakční směsi na tenkých vrstvách Silica gel 60 F²⁵⁴

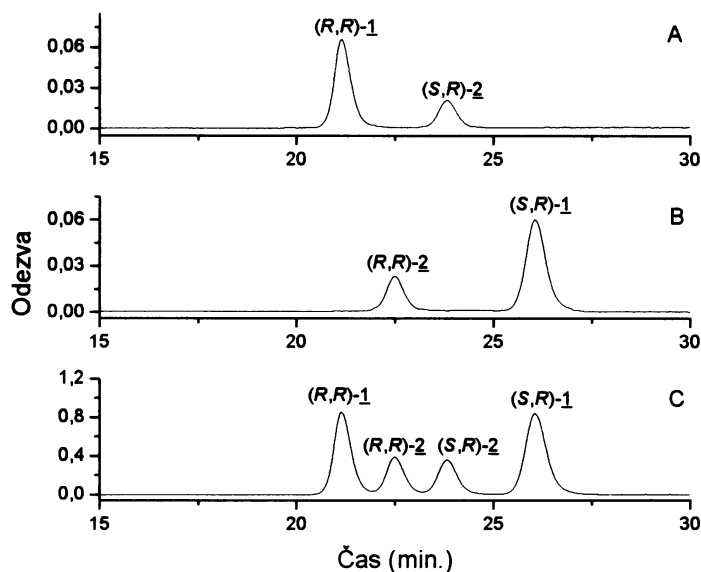
(Merck, Německo), složení eluentu: butanol/kyselina octová/voda, 3:1:1, v/v/v, která prokázala úplnou konverzi výchozího materiálu na směs dvou regioizomerů aduktů SO-Cys: 1 a 2. Oba dva regioizomery spolu koeluovaly na TLC desce a jejich detekce roztokem ninhydrinu poskytla jedinou skvrnu rudé barvy ($R_f = 0.51$). Produkty byly z reakčního roztoku izolovány přidávkem 100 ml acetonu, který způsobil vysrážení aduktů SO-Cys. Sraženina byla z roztoku odfiltrována, promyta nejprve acetonem, posléze etherem a vysušena na vzduchu za zisku produktu v podobě prášku bílé barvy (125 mg, 0,52 mmol, výtěžek 52 %). Tento produkt byl následně podroben semi-preparativní HPLC, mobilní fáze: 100 % voda. V chromatogramu získaném HPLC analýzou produktů vzniklých reakcí (*R*)-cysteinu s (*R*)-SO, je patrný výskyt dvou oddělených píků odpovídajících jednomu páru regioizomerů SO-Cys: (*S,R*)-1 a (*R,R*)-2. Na druhou stranu reakce (*R*)-cysteinu s druhým enantiomerem (*S*)-SO způsobila vznik druhého páru regioizomerů SO-Cys: (*R,R*)-1 a (*S,R*)-2. Pokud oba dva páry regioizomerů SO-Cys byly analyzovány ve směsi současně, pak jejich pořadí eluce bylo: (*R,R*)-1 < (*R,R*)-2 < (*S,R*)-2 < (*S,R*)-1 (obrázek 2). Relativní poměr ploch těchto sloučenin ve směsi produktů vzniklých reakcí cysteinu s racemickým SO a změřených UV detektorem při 220 nm činil 3:1:1:3. Vzhledem k tomu, že molární absorpční koeficienty těchto látek byly při 220 nm prakticky shodné, tak tento poměr ploch vyjadřoval i hmotnostní zastoupení složek ve směsi. Opakovaným sbíráním složek obsahujících jednotlivé diastereomery, které byly analyzovány semi-preparativní HPLC, bylo po vysušení získáno dostatečné množství materiálu (řádově 20-30 mg) v podobě bílého prášku. Jednotlivé diastereomery byly charakterizovány a identifikovány na základě jejich ¹H-NMR a MS spekter. Jejich čistota byla >99 % (GC/MS). Tyto adukty bylo třeba před provedením GC/MS analýz derivatizovat silylačním činidlem za vzniku TBDMS derivátů tak, jak je popsáno v kapitole 4.4.1.

(*R,R*)-1: ¹H-NMR: δ 2,65 (1H, *dd*, $J = 15,0, 7,5$, SCH₂), 2,95 (1H, *d*, $J = 15,0$, SCH₂), 3,23 (1H, *bs*, CHCOOH), 3,71 (2H, *m*, CH₂OH), 3,98 (1H, *t*, $J = 6,0$, SCH), 7,31 (5H, *m*, *Ph*). (*S,R*)-1: ¹H-NMR: δ 2,67 (1H, *m*, SCH₂), 2,82 (1H, *d*, $J = 10,0$, SCH₂), 3,29 (1H, *bs*, CHCOOH), 3,71 (2H, *d*, $J = 5,4$, CH₂OH), 3,99 (1H, *t*, $J = 5,1$, SCH), 7,31 (5H, *m*, *Ph*).

(*R,R*)-1 a (*S,R*)-1: ESI-MS: m/z 242 [M+H]⁺. MS/MS iontu m/z 242: 225 [M+H-NH₃]⁺, 121 [PhCHCH₂OH]⁺, 105. GC/MS: m/z (relativní intenzita) 568 [M-CH₃]⁺ (3 %), 526 [M-C(CH₃)₃]⁺ (90 %), 498 [M-C(CH₃)₃-(C=O)]⁺ (24 %), 424 [M-

COOTBDMS]⁺ (18 %), 394 (22 %), 316 (11 %), 302 (65 %), 262 (100 %), 235 [CHPhCH₂OTBDMS]⁺ (21 %). UV: ϵ_{220} 11,5 mM⁻¹ cm⁻¹.

Obrázek 2. HPLC-UV analýza produktů vzniklých reakcí (*R*)-cysteinu s A: (*S*)-SO, B: (*R*)-SO a C: (*R,S*)-SO.



(*R,R*)-2: ¹H-NMR: δ 2,76 (3H, *m*, CH₂CHCOOH a CH₂CHOH), 2,99 (1H, *d*, *J* = 10, CH₂CHCOOH), 3,38 (1H, *bs*, CHCOOH), 4,66 (1H, *bs*, CHOH), 7,31 (5H, *m*, Ph). ¹H-NMR analýzou diastereomeru (*S,R*)-2 byla získána prakticky identická spektra.

(*R,R*)-2 a (*S,R*)-2: ESI-MS: *m/z* 242 [M+H]⁺. MS/MS iontu *m/z* 242: 224 [M+H-H₂O]⁺, 207, 135 [M+H-CHOHPh]⁺. GC/MS: *m/z* (relativní intenzita) 568 [M-CH₃]⁺ (2 %), 526 [M-C(CH₃)₃]⁺ (70 %), 498 [M-C(CH₃)₃-(C=O)]⁺ (12 %), 424 [M-COOTBDMS]⁺ (7 %), 394 (10 %), 316 (7 %), 302 (45 %), 262 (100 %). UV: ϵ_{220} 11,5 mM⁻¹ cm⁻¹.

4.3.2. Syntéza aduktů SO-Lys: N ϵ -(1-fenyl-2-hydroxyethyl)lysinu **3** a N ϵ -(2-fenyl-2-hydroxyethyl)lysinu **4**

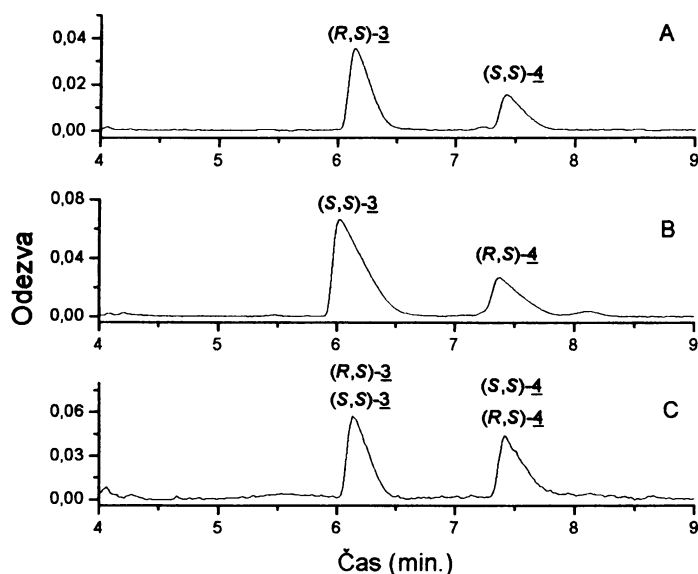
N α -Boc-L-lysin (1,23 g, 5 mmol) byl rozpuštěn ve vodě (10 ml), do které byl předem přidán triethylamin (0,7 ml, 5 mmol). Do této reakční směsi byl poté po kapkách přidán opticky čistý (*R*)-SO nebo (*S*)-SO (0,6 ml, 5,26 mmol). Reakční směs

byla posléze zahřívána pod zpětným chladičem na olejové lázni při 80 °C po dobu 16 hodin. Během této doby reakční směs zežloutla a následně byla neutralizována přidávkem koncentrované HCl. Směs byla zahuštěna na rotační vakuové odparce a rozpuštěna ve cca 15 ml TFA, aby byla odbourána α -Boc skupina. Po 5 hodinách míchání za pokojové teploty prokázala TLC analýza produktů úplné odstranění α -Boc skupiny. Po odpaření kyseliny trifluoroctové byl získán produkt v podobě nažloutlého oleje. TLC analýzou produktu (butanol/kyselina octová/voda, 3:1:1, v/v/v, detekční činidlo ninhydrin) bylo detekováno pět skvrn. Dvě skvrny (R_f 0,24 a 0,28) odpovídaly výskytu požadovaných produktů aduktů SO-Lys: 3 a 4. Druhé dvě, nejrychleji se pohybující skvrny (R_f 0,36 a 0,40) byly předběžně identifikovány jako nežádoucí vedlejší produkty. Izolaci těchto složek z TLC vrstvy a jejich následnou LC/MS/MS analýzou bylo potvrzeno, že jsou složeny ze dvou molekul SO navázaných na jedinou molekulu lysinu a tudíž se jedná o bis-SO-Lys adukty. Nejpomaleji se pohybující skvrnu tvořil zbytek nezreagovaného lysinu (R_f 0,06).

Pro izolaci SO-Lys aduktů ze směsi byla použita sloupcová chromatografie se silikagelovou náplní, eluentem byla směs rozpouštědel chloroform/methanol/kyselina octová (3:5:1, v/v/v). Frakce eluátu obsahující adukty SO-Lys 3 a 4 byly odpařeny do sucha a opětovně podrobeny sloupcové chromatografii, tentokrát s jinou směsí rozpouštědel butanol/kyselina octová/voda, 3:1:1, v/v/v. Poté byly jednotlivé frakce eluátu obsahující výhradně adukty 3 a 4 zahuštěny, znovu rozpuštěny ve vodě a povařeny s aktivním uhlím. Po odfiltrování aktivního uhlí byl získán bezbarvý roztok, který byl odpařen do sucha. Na dně zůstal bílý prášek (0,40 g, 1,5 mmol, výtěžek 30 %). Tento prášek byl posléze používán pro účely kvantitativních studií nebo byl dále zpracován rozdělením na jednotlivé složky. Semi-preparativní HPLC analýzou směsi získané reakcí α -Boc-L-lysínu s (*R*)-SO nebo (*S*)-SO byly v obou případech obdrženy dva píky odpovídající výskytu dvou regioizomerů. Na rozdíl od SO-Cys diastereomerů, v případě HPLC separace SO-Lys diastereomerů (*R,S*)-3 / (*S,S*)-3 a (*R,S*)-4 / (*S,S*)-4 nebylo pozorováno jejich vzájemné dělení. Pořadí eluce aduktů SO-Lys ve směsi bylo (*S,S*)-3 ~ (*R,S*)-3 < (*S,S*)-4 ~ (*R,S*)-4 (obrázek 3). Mobilní fáze: izokraticky 0,1 % TFA/acetonitril 90:10, v/v. Relativní poměr ploch obou 3 (21HPE) a 4 (22HPE) regioizomerů při 220 nm činil cca 1,3:1 pro produkty vzniklé jak z (*R*)-SO, tak i z (*S*)-SO. Opakovaným sbíráním složek obsahujících jednotlivé čisté diastereomery bylo získáno dostatečné množství materiálu pro změření jejich ^1H -

NMR a MS spekter (před GC/MS analýzou byly adukty derivatizovány TBDMS silylačním činidlem).

Obrázek 3. HPLC-UV analýza produktů vzniklých reakcí α -Boc-(*S*)-lysinu s **A**: (*S,S*)-**3**, **B**: (*R*)-**3** a **C**: (*R,S*)-**3** po odstranění α -Boc skupiny.



(*R,S*)-**3**: $^1\text{H-NMR}$: δ 1,27 a 1,34 (1+1H, *m*, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH}$), 1,65 (2+2H, *m*, NHCH_2CH_2 a CH_2CHCOOH), 2,60 a 2,79 (1+1H, *m*, NHCH_2), 3,75 (1+2H, *m*, CHCOOH a CH_2OH), 4,29 (1H, *t*, $J = 5,5$, NHCH), 5,7 (1H, *bs*, NH), 7,40 (3H, *m*, *Ph*) a 7,48 (2H, *m*, *Ph*), 8,6 (2H, *bs*, NH_2). Diastereomer (*S,S*)-**3** poskytl velmi podobné $^1\text{H-NMR}$ spektrum se zanedbatelnými rozdíly v hodnotách δ vodíků CH_2CHCOOH , NHCH_2 a jejich multipletů.

(*R,S*)-**3** a (*S,S*)-**3**: ESI-MS: m/z 267 $[\text{M}+\text{H}]^+$. MS/MS iontu m/z 267: 222 $[\text{M}+\text{H}-\text{COOH}]^+$, 147 $[\text{M}+\text{H}-\text{PhCHCH}_2\text{O}]^+$, 130 $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHNH}_2\text{COOH}]^+$, 121 $[\text{PhCHCH}_2\text{OH}]^+$, 84. GC/MS: m/z (relativní intenzita) 608 $[\text{M}]^+$ (2 %), 593 $[\text{M}-\text{CH}_3]^+$ (2 %), 551 $[\text{M}-\text{C}(\text{CH}_3)_3]^+$ (5 %), 463 $[\text{M}-\text{CH}_2\text{OTBDMS}]^+$ (100 %), 419 (6 %), 356 (19 %), 300 (14 %). UV: ϵ_{220} 11,2 $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$.

(*S,S*)-**4**: $^1\text{H-NMR}$: δ 1,37 (2H, *m*, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHCOOH}$), 1,63 (2H, *m*, NHCH_2CH_2), 1,74 (2H, *m*, CH_2CHCOOH), 2,91 (2H, *t*, $J = 8,9$, NHCH_2CH_2), 2,98 a 3,13 (1+1H, 2 \times *d*, $J = 11,6$, CH_2CHOH), 3,70 (1H, *t*, $J = 6,0$, CHCOOH), 4,90 (1H, *d*, $J = 9,1$,

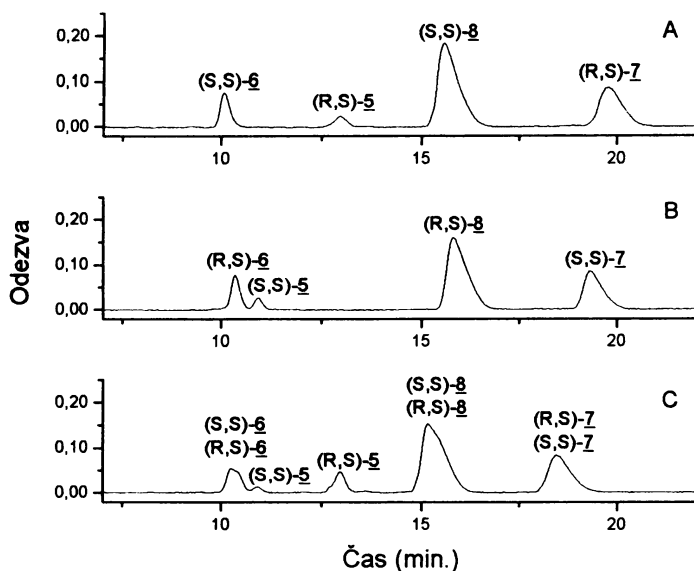
CHOH), 7,31 (1H, m, *Ph*) a 7,38 (4H, m, *Ph*), 8,6 (2H, bs, NH₂). Prakticky identické ¹H-NMR spektrum bylo získáno u diastereomeru (*R,S*)-4.

(*R,S*)-4 a (*S,S*)-4: ESI-MS: *m/z* 267 [M+H]⁺. MS/MS iontu *m/z* 267: 249 [M+H-H₂O]⁺, 232, 188, 130 [CH₂CH₂CH₂CH₂CHNH₂COOH]⁺, 120, 84. GC/MS: *m/z* (relativní intenzita) 551 [M-C(CH₃)₃]⁺ (5 %), 387 [M-CHPhOTBDMS]⁺ (100 %), 419 (17 %), 300 (19 %), 256 (80 %). UV: ε₂₂₀ 11,2 mM⁻¹ cm⁻¹.

4.3.3. Syntéza aduktů SO-His: Nπ-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)histidinu 5, Nπ-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)histidinu 6, Nτ-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)histidinu 7 a Nτ-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)histidinu 8

Adukty SO-His byly připraveny postupem analogickým přípravě aduktů SO-Lys. Nα-Boc-L-histidin (1,275 g, 5 mmol) byl v tomto postupu použit místo Nα-Boc-L-lysinu. Po odstranění chránicí Nα-Boc skupiny a odpaření kyseliny trifluoroctové byl získán nahnědlý olej. TLC analýzou produktu (butanol/kyselina octová/voda, 3:1:1, v/v/v, detekce ninhydrinem) bylo detekováno pět skvrn. Dvě z těchto skvrn [R_f 0,23 (5 a 6) a R_f 0,28 (7 a 8)] odpovídaly výskytu požadovaných aduktů SO-His. Dvě nejrychleji se pohybující skvrny (R_f 0,40 a 0,47) byly předběžně identifikovány jako nežádoucí vedlejší produkty skládající se ze dvou molekul SO navázaných na jednu molekulu histidinu (izolaci těchto složek z TLC vrstvy a jejich následnou LC/MS/MS analýzou toto bylo potvrzeno). Zbytky nezreagovaného histidinu poskytly nejpomaleji se pohybující skvrnu (R_f 0,08). Pro izolaci aduktů SO-His ze směsi byla použita sloupcová chromatografie se silikagelovou náplní, eluentem byla směs rozpouštědel chloroform/methanol/kyselina octová (3:6:1, v/v/v). Frakce eluátu obsahující adukty SO-His 5, 6, 7 a 8 byly odpařeny do sucha a opětovně podrobeny sloupcové chromatografii, tentokrát s jinou směsí rozpouštědel butanol/kyselina octová/voda, 3:1:1, v/v/v. Poté byly jednotlivé frakce eluátu obsahující výhradně adukty 5-8 zahuštěny, znovu rozpuštěny ve vodě a povařeny s aktivním uhlím. Po odfiltrování aktivního uhlí byl získán bezbarvý roztok, který byl odpařen do sucha. Na dně zůstal naředlý prášek (0,475 g, 1,73 mmol, výtěžek 34,6 %). Tento prášek byl posléze používán pro účely kvantitativních studií nebo byl dále zpracován rozdělením na jednotlivé složky pomocí semi-preparativní HPLC. Mobilní fáze: izokraticky 0,1 % TFA/acetonitril, 97:3, v/v.

Obrázek 4. HPLC-UV analýza produktů vzniklých reakcí $\text{N}\alpha$ -Boc-(*S*)-histidinu s **A:** (*S*)-SO, **B:** (*R*)-SO a **C:** (*R,S*)-SO po odstranění $\text{N}\alpha$ -Boc skupiny.



Semi-preparativní HPLC analýzou směsi získané reakcí $\text{N}\alpha$ -Boc-L-histidinu s (*S*)-SO byly pozorovány čtyři píky reflektující vznik čtyř diastereomerů: [(*S,S*)-6, (*R,S*)-5, (*S,S*)-8 a (*R,S*)-7]. Taktéž analýzou směsi vzniklé reakcí $\text{N}\alpha$ -Boc-L-histidinu s (*R*)-SO byly získány čtyři píky, znamenající přítomnost čtyř dalších diastereomerů: [(*R,S*)-6, (*S,S*)-5, (*R,S*)-8 a (*S,S*)-7]. Pokud bylo všech osm diastereomerů analyzováno ve směsi, tak bylo patrné dělení pouze jednoho páru diastereomerů: (*R,S*)-5 a (*S,S*)-5. Relativní poměr ploch všech čtyř 5, 6, 7 a 8 regioizomerů při 220 nm činil cca 1:5:18:28 pro adukty SO-His vzniklé jak z (*R*)-SO, tak i z (*S*)-SO. Pořadí eluce aduktů SO-His ve směsi bylo (*S,S*)-6 ~ (*R,S*)-6 < (*S,S*)-5 < (*R,S*)-5 < (*S,S*)-8 ~ (*R,S*)-8 < (*S,S*)-7 ~ (*R,S*)-7 (obrázek 4). Opakovaným sbíráním HPLC frakcí obsahujících jednotlivé samotné diastereomery bylo získáno dostatečné množství materiálu pro změření jejich $^1\text{H-NMR}$ a MS spekter (před GC/MS analýzou byly adukty derivatizovány TBDMS silylačním činidlem).

(*R,S*)-5: $^1\text{H-NMR}$: δ 2,98 (1H, *dd*, $J = 16,4, 7,8$, CCH_2) a 3,10 (1H, *m*, CCH_2), 4,02 (2H, *m*, CH_2OH), 4,17 (1H, *t*, $J = 7,5$, CHCOOH), 5,52 (1H, *bs*, NCHPh), 7,30 (6H, *m*, *Ph* a N-CH=C), 8,79 (1H, *s*, N-CH=N). (*S,S*)-5: $^1\text{H-NMR}$: δ 3,06 (2H, *m*,

CH₂CHCOOH), 3,87 a 4,08 (2H, *m*, CH₂OH), 4,17 (1H, *dd*, *J* = 9,0, 8,4, CHCOOH), 5,56 (1H, *bs*, *J* = 7,0, NCHPh), 7,35 (6H, *m*, *Ph* a N-CH=C), 9,00 (1H, *s*, N-CH=N).

(*R,S*)-5 a (*S,S*)-5: ESI-MS: *m/z* 276 [M+H]⁺. MS/MS iontu *m/z* 276: 258 [M+H₂O]⁺, 230 [M-COOH]⁺, 156 [M+H-CHPhCH₂O]⁺, 110. GC/MS: *m/z* (relativní intenzita) 602 [M-CH₃]⁺ (3 %), 560 [M-C(CH₃)₃]⁺ (16 %), 532 [M-C(CH₃)₃-(C=O)]⁺ (6 %), 316 (20 %), 302 (17 %), 234 [CHPhCH₂OTBDMS-H]⁺ (100 %). UV: ε₂₂₀ 3,8 mM⁻¹ cm⁻¹.

(*S,S*)-6: ¹H-NMR: δ 3,13 (1H, *dd*, *J* = 15,1, 7,1, CCH₂) a 3,26 (1H, *dd*, *J* = 15,1, 5,7, CCH₂), 4,21 (1H, *t*, *J* = 7,2, CHCOOH), 4,18 (1H, *dd*, *J* = 14,4, 8,2, NCH₂) a 4,35 (1H, *dd*, *J* = 14,4, 2,0, NCH₂), 4,91 (1H, *dd*, *J* = 8,0, 2,0, CHOH), 7,38 (5H, *m*, *Ph*), 7,43 (1H, *s*, N-CH=C), 8,90 (1H, *s*, N-CH=N). ¹³C-NMR: δ 29,3 (CCH₂), 56,5 (CHCOOH), 58,2 (NCH₂), 76,5 (CHOH), 122,9 (N-CH=C), 131,5, 133,3 a 146,7 (*Ph*), 133,7 (N-CH=C), 139,9 (N-CH=N), 175,1 (COOH). (*R,S*)-6: ¹H-NMR: δ 3,17 (2H, *m*, CCH₂), 4,10 (1H, *t*, *J* = 5,7, CHCOOH), 4,18 (1H, *dd*, *J* = 13,3, 8,2, NCH₂) a 4,31 (1H, *d*, *J* = 12,8, NCH₂), 4,91 (1H, *dd*, *J* = 7,8, CHOH), 7,38 (6H, *m*, *Ph* a N-CH=C), 8,74 (1H, *s*, N-CH=N).

(*R,S*)-6 a (*S,S*)-6: ESI-MS: *m/z* 276 [M+H]⁺. MS/MS iontu *m/z* 276: 259 [M+H-NH₃]⁺, 232, 215, 156 [M+H-CH₂CHOPh]⁺, 110, 95. GC/MS: *m/z* (relativní intenzita) 602 [M-CH₃]⁺ (2 %), 560 [M-C(CH₃)₃]⁺ (15 %), 532 [M-C(CH₃)₃-(C=O)]⁺ (6 %), 400 (4 %), 316 (20 %), 302 (18 %), 178 (100 %). UV: ε₂₂₀ 3,8 mM⁻¹ cm⁻¹.

(*R,S*)-7: ¹H-NMR: δ 3,12 (1H, *dd*, *J* = 14,9, 7,8, CCH₂) a 3,24 (1H, *dd*, *J* = 14,9, 6,3, CCH₂), 3,98 (1H, *dd*, *J* = 11,6, 4,4, CH₂OH) a 4,15 (1H, *dd*, *J* = 11,6, 4,4, CH₂OH), 4,22 (1H, *t*, *J* = 6,6, CHCOOH), 5,59 (1H, *dd*, *J* = 4,4, 8,7, NCHPh), 7,37 (5H, *m*, *Ph*), 7,60 (1H, *m*, N-CH=C), 9,10 (1H, *s*, N-CH=N). ¹³C-NMR: δ 31,1 (CCH₂), 56,4 (CHCOOH), 67,8 (CH₂OH), 70,0 (NCHPh), 125,1 (N-CH=C), 132,7, 134,3 a 141,7 (*Ph*), 134,1 (N-CH=C), 140,8 (N-CH=N), 175,1 (COOH). (*S,S*)-7: ¹H-NMR: δ 3,05 (1H, *dd*, *J* = 15,8, 6,8, CCH₂) a 3,17 (1H, *dd*, *J* = 15,8, 5,9, CCH₂), 3,97 (1H, *dd*, *J* = 11,8, 4,5, CH₂OH) a 4,15 (1H, *dd*, *J* = 11,8, 8,8, CH₂OH), 4,19 (1H, *t*, *J* = 7,7, CHCOOH), 5,60 (1H, *dd*, *J* = 4,4, 8,5, NCHPh), 7,37 (5H, *m*, *Ph*), 7,50 (1H, *m*, N-CH=C), 8,82 (1H, *s*, N-CH=N).

(*R,S*)-7 a (*S,S*)-7: ESI-MS: *m/z* 276 [M+H]⁺. MS/MS iontu *m/z* 276: 230 [M-COOH]⁺, 110. GC/MS: *m/z* (relativní intenzita) 617 [M]⁺ (1 %), 602 [M-CH₃]⁺ (3 %), 560 [M-C(CH₃)₃]⁺ (60 %), 532 [M-C(CH₃)₃-(C=O)]⁺ (2 %), 458 [M-COOTBDMS]⁺

(18 %), 400 (5 %), 316 (100 %), 298 (16 %), 235 [CHPhCH₂OTBDMS]⁺ (8 %). UV: ϵ_{220} 3,8 mM⁻¹ cm⁻¹.

(*S,S*)-**8**: ¹H-NMR: δ 3,16 (1H, *dd*, $J = 14,3, 7,5$, CCH₂) a 3,25 (1H, *dd*, $J = 14,3, 6,0$, CCH₂), 4,17 (1+1H, *m*, CHCOOH a NCH₂) a 4,35 (1H, *dd*, $J = 14,6, 2,8$, NCH₂), 4,91 (1H, *dd*, $J = 8,5, 2,8$, CHOH), 7,33 (5H, *m*, *Ph*), 7,55 (1H, *s*, N-CH=C), 8,91 (1H, *s*, N-CH=N). ¹³C-NMR: δ 31,0 (CCH₂), 56,6 (CHCOOH), 60,7 (NCH₂), 76,3 (CHOH), 126,4 (N-CH=C), 131,4, 133,7 a 146,8 (*Ph*), 133,3 (N-CH=C), 141,5 (N-CH=N), 175,0 (COOH). (*R,S*)-**8**: ¹H-NMR: δ 3,13 (1H, *dd*, $J = 15,0, 6,6$, CCH₂) a 3,21 (1H, *dd*, $J = 15,0, 6,0$, CCH₂), 4,18 (1+1H, *m*, CHCOOH a NCH₂) a 4,34 (1H, *dd*, $J = 13,5, 2,8$, NCH₂), 4,89 (1H, *dd*, $J = 8,2, 2,8$, CHOH), 7,31 (5H, *m*, *Ph*), 7,47 (1H, *s*, N-CH=C), 8,79 (1H, *s*, N-CH=N).

(*R,S*)-**8** a (*S,S*)-**8**: ESI-MS: m/z 276 [M+H]⁺. MS/MS iontu m/z 276: 230 [M-COOH]⁺, 215. GC/MS: m/z (relativní intenzita) 617 [M]⁺ (1 %), 602 [M-CH₃]⁺ (5 %), 560 [M-C(CH₃)₃]⁺ (100 %), 532 [M-C(CH₃)₃-(C=O)]⁺ (4 %), 458 [M-COOTBDMS]⁺ (23 %), 400 (10 %), 316 (74 %). UV: ϵ_{220} 3,8 mM⁻¹ cm⁻¹.

4.3.4. Syntéza deuterovaného styren-7,8-oxidu (SO-*d8*) a deuterovaných analogů aduktů SO-Cys (SO-Cys-*d8*)

SO-*d8* byl připraven podle metody popsané v publikaci Sepai a spol. (1993) Deuterovaný styren byl oxidován kyselinou *m*-chlorperoxybenzoovou. Identita vzniklého produktu (SO-*d8*, 1,6 g, čistota 93 %) byla zkontrolována metodou GC/MS a jeho hmotnostní spektrum bylo ve shodě s předpokládanou strukturou. Adukty SO-Cys-*d8* byly následně připraveny stejným postupem jako adukty SO-Cys přímou alkylací L-cysteinu s deuterovaným SO. Výsledný produkt (SO-Cys-*d8*) byl získán v podobě bílého prášku (výtěžek 57,2 %). Tento produkt se skládal ze směsi dvou regioizomerů: S-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinu-*d8* 1-d8 a S-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinu-*d8* 2-d8. Před analýzou metodami GC/MS a GC-FID byly složky derivatizovány TBDMS silylačním činidlem. Plocha píků aduktů 1-d8 a 2-d8 v produktu změřená metodou HPLC-UV při 220 nm byla cca 3:1.

1-d8: GC/MS: m/z (relativní intenzita) 592 [M+H]⁺ (2 %), 534 [M-C(CH₃)₃]⁺ (34 %), 506 [M-C(CH₃)₃-(C=O)]⁺ (16 %), 422 (10 %), 402 (12 %), 316 (11 %), 302 (53 %), 262 (100 %), 243 [CDPhCD₂OTBDMS]⁺ (13 %).

2-d8: GC/MS: *m/z* (relativní intenzita) GC/MS: 592 [M+H]⁺ (<1 %), 534 [M-C(CH₃)₃]⁺ (15 %), 506 [M-C(CH₃)₃-(C=O)]⁺ (5 %), 422 (2 %), 402 (4 %), 316 (12 %), 302 (32 %), 262 (100 %).

4.3.5. Syntéza deuterovaných analog aduktů SO-His (SO-His-*d8*)

Adukty SO-His-*d8* byly připraveny reakcí deuterovaného SO (SO-*d8*) s Na-Boc-L-histidinem s využitím postupu analogického přípravě aduktů SO-His. Výsledný produkt se skládal ze směsi čtyř regioizomerů: Nπ-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)histidinu-*d8* 5-d8, Nπ-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)histidinu-*d8* 6-d8, Nτ-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)histidinu-*d8* 7-d8 a Nτ-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)histidinu-*d8* 8-d8 a byl získán v podobě naředěného prášku (výtěžek 34,6 %). Před analýzou metodami GC/MS a GC-FID byly složky derivatizovány TBDMS silylačním činidlem. Poměr ploch pík jednotlivých regioizomerů v produktu zjištěný metodou HPLC-UV při 220 mn byl: 1:6:19:28, 5-d8:6-d8:7-d8:8-d8.

5-d8: GC/MS: *m/z* (relativní intenzita) 610 [M-CH₃]⁺ (3 %), 568 [M-C(CH₃)₃]⁺ (20 %), 540 [M-C(CH₃)₃-(C=O)]⁺ (7 %), 324 (70 %), 302 (30 %).

6-d8: GC/MS: *m/z* (relativní intenzita) 610 [M-CH₃]⁺ (5 %), 568 [M-C(CH₃)₃]⁺ (40 %), 540 [M-C(CH₃)₃-(C=O)]⁺ (13 %), 438 (6 %), 408 (15 %), 324 (55 %), 302 (44 %), 186 (100 %).

7-d8: GC/MS: *m/z* (relativní intenzita) 625 [M]⁺ (<1 %), 610 [M-CH₃]⁺ (3 %), 568 [M-C(CH₃)₃]⁺ (100 %), 466 (25 %), 454 (30 %), 396 (6 %), 352 (60 %), 324 (80 %), 299 (40 %).

8-d8: GC/MS: *m/z* (relativní intenzita) 625 [M]⁺ (1 %), 610 [M-CH₃]⁺ (5 %), 568 [M-C(CH₃)₃]⁺ (100 %), 466 (23 %), 454 (22 %), 408 (20 %), 352 (60 %), 324 (52 %).

4.4. Postupy derivatizace aduktů SO

4.4.1. Příprava TBDMS derivátů

Pro derivatizaci aminokyselin a aduktů SO silylačním činidlem před jejich analýzou plynovou chromatografií byl použit postup popsáný v práci Mawhinney a spol. (1986), který byl mírně modifikován. V uvedené práci je popsáno použití silylačního činidla MTBSTFA, které vede ke vzniku *tert*-butyldimethylsilyl (TBDMS) derivátů. Jednotlivé vzorky standardů nebo vysušeného hydrolyzátu globinu byly před derivatizací rozpuštěny či suspendovány v suchém DMF (100 μl) za

pomocí ultrazvuku. Poté bylo do směsi přidáno silylační činidlo MTBSTFA (50 μ l) a směs byla zahřívána v uzavřených vialkách v termostatovaném bloku při 110 °C po dobu 1 hodiny. Vzniklé TBDMS deriváty byly extrahovány do suchého heptanu (50 μ l) a 1 μ l této směsi byl analyzován metodou GC/MS nebo GC-FID.

4.4.2. Ostatní postupy derivatizace

Silylace TMS činidlem byla provedena dle modifikovaného postupu, popsaném v práci Moll a spol. (1999). Jednotlivé vzorky standardů byly před derivatizací rozpuštěny či suspendovány v suchém DMF (50 μ l) za pomoci ultrazvuku. Poté bylo do směsi přidáno silylační činidlo [směs BSTFA + TMCS (50 μ l)] a směs byla zahřívána v uzavřených vialkách v termostatovaném bloku při 110 °C po dobu 1 hodiny. Vzniklé TBDMS deriváty byly extrahovány do suchého heptanu (50 μ l) a 1 μ l této směsi byl analyzován metodou GC/MS.

Derivatizace chlormravenčany byla provedena dle Huška (1991). Před derivatizací byly připraveny 5 mM roztoky standardů aduktů SO a aminokyselin rozpuštěné v 0,1 M HCl. Pro vlastní derivatizaci bylo vzato 15 μ l roztoku standardu, do něhož bylo postupně přidáno 60 μ l H₂O, 40 μ l směsi ethanol/pyridin (4:1, v/v) a 5 μ l ethylchlormravenčanu. Směs byla poté zamíchána a ponechána stát 1-2 minuty. Po uplynutí této doby do ní bylo přidáno 100 μ l chloroformu obsahujícího 1 % přídavek ethylchlormravenčanu a směs byla opět míchána po dobu 1 minuty. Vzniklé chlormravenčanové deriváty byly vyextrahovány do spodní chloroformové fáze, která byla analyzována metodou GC/MS (1 μ l). V jiné modifikaci tohoto postupu byl ethanol nahrazen heptafluorbutanolem a místo ethylchlormravenčanu byl použit izobutylchlormravenčan.

4.5. Příprava šarží SO-modifikovaných lidských globinů (SO-Gb)

Plná lidská krev (10 ml) s přídavkem protisrážecího činidla (citrát sodný) byla kvůli oddělení krevní plazmy od erythrocytů centrifugována při 1000 \times g po dobu 15 min. Po odstranění krevní plazmy byly erythrocyty třikrát promyty izotonickým roztokem (30 ml). Erythrocyty byly následně hemolyzovány přidáním destilované vody (5 ml) v ultrazvukové lázni. Výsledný hemolyzát byl naředěn 0,15 M fosfátovým pufrům o pH 7,4 na objem 50 ml. Do tohoto hemolyzátu byl následně přidán racemický SO tak, aby výsledná koncentrace SO v hemolyzátu odpovídala

molárnímu poměru SO/Gb 100:1. Další alikvót naředěného hemolyzátu byl inkubován s desetinásobně nižším množstvím racemického SO, molární poměr SO/Gb v hemolyzátu v tomto případě činil 10:1. Směs byla inkubována SO při pokojové teplotě po dobu 24 hod. Po této době byla do směsi přidána 2 % HCl v ledovém acetonu (30 ml) a po chvíli došlo k vysrážení globinu, který byl následně promyt 3 × 30 ml ledového acetonu, potom 3 × 30 ml éteru a vysušen při 60 °C ve vakuu.

Jiné šarže vzorků SO-Gb byly připraveny inkubací hemolyzátu lidského globinu s opticky čistými enantiomery (*R*)-SO a (*S*)-SO. Enantiomery SO byly do hemolyzátu přidány v takovém množství, aby jejich výsledná koncentrace v inkubační směsi odpovídala molárnímu poměru SO/Gb cca 0,625:1. Další postup inkubace globinu a jeho následné izolace byl shodný s postupem uvedeným v předchozím odstavci. Přehled všech připravených šarží SO-Gb je uveden v tabulce 4.

Kontrolní lidský globin byl z plné krve izolován postupem shodným s přípravou SO-Gb. V tomto případě inkubace hemolyzátu s SO samozřejmě nebyla provedena.

Tabulka 4. Přehled připravených šarží lidských globinů modifikovaných SO *in vitro*.

SO použitý k inkubaci lidského Gb	Molární poměr SO/Gb	Označení SO-modifikovaného globinu
racemát SO	100:1	SO-Gb 100:1
racemát SO	10:1	SO-Gb 10:1
(<i>R</i>)-SO	0,625:1	SO-Gb (<i>R</i>)-SO 0,625:1
(<i>S</i>)-SO	0,625:1	SO-Gb (<i>S</i>)-SO 0,625:1

4.6. Enzymatická hydrolýza proteinů

Enzymatická hydrolýza byla provedena dle studie Mráze a spol. (2004). Vzorek SO-modifikovaného globinu (SO-Gb, 5 mg) byl suspendován ve vodě (250 μ l) v ultrazvukové lázni. Do směsi byl posléze přidán 0,1 M fosfátový pufr o pH 7,4 (250 μ l) spolu s přidavkem 1 % suspenze enzymu Pronase[®] ve fosfátovém pufru o pH 7,4 (50 μ l). Jednotlivé vzorky byly posléze zahřívány při 37 °C po dobu 24 hodin a výsledný enzymatický hydrolyzát byl následně přefiltrován přes 0,45 μ m mikrofiltr Ultrafree (Millipore). Takto připravený hydrolyzát pak byl buď rovnou analyzován metodou LC/MS anebo byl vysušen, podroben derivatizaci a analyzován metodou

GC/MS. V tomto případě byl vzorek extrahován do heptanu a 1 μ l této fáze byl dávkován splitless do plynového chromatografu.

4.7. Kvalitativní a kvantitativní analýza aduktů SO v SO-modifikovaném lidském globinu metodou GC/MS

Pro kvantitativní analýzu metodou GC/MS byl hmotnostní detektor nastaven tak, aby pracoval v módu selektivního monitorování iontů (SIM). Jednotlivé fragmenty TBDMS derivátů aduktů SO byly monitorovány při m/z 463 (záchyt aduktů SO-Lys), m/z 526 (záchyt aduktů SO-Cys), m/z 534 (záchyt vnitřního standardu SO-Cys-*d8*), m/z 560 (záchyt aduktů SO-His) a m/z 568 (záchyt vnitřního standardu SO-His-*d8*).

Za účelem zkonstruování kalibrační křivky byl kontrolní lidský globin v množství 5 mg spikován 100 μ l „standardního roztoku“ obsahujícího směs aduktů SO-Cys, SO-Lys a SO-His o takové koncentraci, aby přidané množství každého z aduktů činilo: 0; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100; 200 a 500 nmol/vzorek. Dále bylo ke vzorku globinu přidáno vždy 100 μ l roztoku obsahujícího vnitřní standardy SO-Cys-*d8* a SO-His-*d8* (přidané množství každého z obou vnitřních standardů činilo 50 nmol). Jednotlivé vzorky byly posléze zpracovány postupem shodným se zpracováním autentických vzorků. Všechny analýzy byly opakovány třikrát.

4.8. Vývoj metody SPE vhodné k obohacení hydrolyzátu lidského globinu o adukty SO

Byly připraveny základní roztoky jednotlivých aminokyselin a aduktů SO ve fosfátovém pufru o pH = 8,0. Koncentrace aminokyselin (Ala, Val, Glu, Asp, Lys, Ser, His a Thr) v těchto základních roztocích byla 10,8 mg/ml. Koncentrace méně rozpustných aminokyselin (Phe) byla 3,6 mg/ml a u Tyr a Trp 0,9 mg/ml. Dále byl připraven základní roztok standardů (SO-Cys, SO-Lys a SO-His) o $c = 0,2$ mg/ml. Z těchto základních roztoků byl smícháním připraven standardní modelový hydrolyzát (dále jen „MH“) o následujícím složení: koncentrace aminokyselin (Val, Ala, Leu, Ser, Thr, Asp, Glu, His, Lys, Phe, Tyr a Trp) v „MH“ činila: 0,1 mg/ml, koncentrace aduktů SO-Cys, SO-Lys a SO-His v „MH“ byla zvolena nižší: 0,01 mg/ml. Celková koncentrace všech aminokyselin a aduktů v tomto „MH“ byla tedy: 1,23 mg/ml. Rozpouštědlem byl fosfátový pufr o pH = 8,0. Dále byl připraven roztok vnitřního standardu norleucinu o $c = 0,2$ mg/ml (vzhledem k tomu, že tyto vzorky byly následně

analyzovány metodou GC-FID, tak jako vnitřní standardy nemohly být použity deuterované analogy aduktů SO-Cys a SO-His, ale byla použita aminokyselina norleucin).

4.8.1. Výběr nejvhodnějšího sorbentu

Byly testovány SPE kolonky s různými sorbenty (tabulka 5), které byly k dispozici ve velikosti 100 mg/3 ml, kromě SPE kolonek Strata-X a Oasis-HLB, které byly ve velikosti 60 mg/3 ml.

Tabulka 5. Přehled testovaných SPE kolonek.

Výrobce	SPE kolonka	Typ sorbentu
Phenomenex	Strata C-18	oktadecyl-
	Strata C-8	oktyl-
	Strata Ph	fenyl-
	Strata NH ₂	amino-
	Strata CN	kyano-
	Strata-X	polystyren-divinylbenzen
	Strata SDB-L	polystyren-divinylbenzen
Waters	Oasis-HLB	vinylpyrrolidon-polystyren-divinylbenzen
Supelco	Discovery DSC C-18	oktadecyl-
	Discovery DSC C-8	oktyl-
	Discovery DSC Ph	fenyl-
	Discovery DSC NH ₂	amino-
	Discovery DSC CN	kyano-

SPE kolonky byly nejprve kondicionovány 2 × 1 ml MeOH a posléze 2 × 1 ml H₂O. Po aplikaci vzorku „MH“ (1 ml) byly kolonky promyty vodou (3 × 1 ml). To způsobilo vymytí většiny aminokyselin, které se na sorbentu nezachytily. Po promytí kolonek byly zachycené adukty eluovány 1,8 ml směsí organických rozpouštědel (dále jen „eluční činidlo“) o složení: MeOH/acetonitril/0,1 % trifluoroctová kys., 45/45/10, v/v/v. Po aplikaci vzorku byly jednotlivé 1 ml frakce proteklé kolonkami zachycovány do vialek. Poté bylo do každé vialky přidáno 30 μl roztoku obsahujícího vnitřní standard norleucin o c = 0,2 mg/ml. Roztok ve vialce byl posléze vysušen za vakua

v Gyrovapu (70 °C) a uschován v suchu. Těsně před měřením byl vzorek rozpuštěn v 50 μ l suchého N,N-dimethylformamidu, bylo k němu přidáno 25 μ l silylačního činidla (MTBSTFA) a vzorek byl zahříván v termostatovaném bloku při 110 °C po dobu 1 hodiny. Zpracovaný vzorek byl následně ochlazen, extrahován do 100 μ l suchého heptanu a 1 μ l této heptanové fáze byl ihned dávkován splitless do systému GC-FID.

4.8.2. Optimalizace metody SPE

Tato optimalizace byla prováděna výhradně na kolonkách Strata-X 60 mg/3 ml.

4.8.2.1. Studium průběhu extrakce a optimalizace objemu vzorku

Byl připraven roztok „MH“ o celkové koncentraci aminokyselin a aduktů 1,0 mg/ml. Na sérii kolonek Strata-X 60mg/3ml byly nanášeny různé objemy vzorku „MH“ v rozmezí od 0,25 ml až do 2,0 ml. Po nanesení vzorku byly kolonky promývány postupně 7 \times 1 ml vody a poté 3 \times 1 ml „elučního činidla“. Proteklý eluát byl sbírán do vialek vždy po 1 ml. Do každé vialky s eluátem bylo poté přidáno 30 μ l roztoku obsahujícího vnitřní standard (norleucin), vzorek byl vysušen v Gyrovapu a dále zpracován tak, jak je uvedeno v kapitole 4.8.1.

4.8.2.2. Optimalizace objemu vody vhodného k promytí kolonek

Postup práce byl opět prakticky shodný s postupem uvedeným v předchozím odstavci, jen s tím rozdílem, že nanášený objem vzorku „MH“ byl zde stále konstantní (0,5 ml), ale měnil se objem vody použité v promývacím kroku. Vzorky byly promyty buď 3 ml či 5 ml nebo 7 ml vody. Zachycené adukty byly opět eluovány vždy 3 ml „elučního činidla“. Proteklý eluát byl sebrán a poté bylo do něho přidáno 30 μ l roztoku obsahujícího vnitřní standard. Po vysušení vzorku v Gyrovapu bylo jeho další zpracování bylo shodné s postupem uvedeným v kapitole 4.8.1.

4.8.2.3. Optimalizace koncentrace aminokyselin ve vzorku

Byla připravena série roztoků „MH“ o celkové koncentraci aminokyselin a aduktů v rozmezí 1 mg/ml, 2 mg/ml a 4 mg/ml, přičemž dílčí koncentrace aduktů v „MH“ byla ve všech sériích stejná: 0,01 mg/ml. Objem nanášeného vzorku „MH“ na kolonky byl zvolen v rozmezí 1 – 4 ml pro c („MH“) = 1 mg/ml, dále 0,5 – 2,5 ml pro c („MH“) = 2 mg/ml a 0,25 – 1,25 ml pro c („MH“) = 4 mg/ml. Znamená to tedy, že

na kolonky bylo nanášeno takové množství aminokyselin a aduktů, které odpovídalo 1 až 5 mg vzorku. Po nanášení vzorku byly kolonky promyty 7 ml vody a zachycené látky byly poté eluovány 3 ml „elučního činidla“. Proteklý eluát byl sebrán, poté bylo do něho přidáno 30 μ l roztoku obsahujícího vnitřní standard, vzorek byl vysušen v Gyrovapu a dále zpracován tak, jak je uvedeno v kapitole 4.8.1.

4.8.3. Aplikace metody SPE na vzorky hydrolyzátu lidského globinu

Tento postup byl proveden na kolonkách Strata-X 60 mg/3 ml. Byl připraven „standardní roztok“ obsahující směs aduktů SO-Cys, SO-Lys a SO-His. Koncentrace jednotlivých aduktů SO ve „standardním roztoku“ byla 5 mM. Dále byl připraven pronázový hydrolyzát lidského kontrolního globinu o $c = 5$ mg/ml (tento hydrolyzát byl připraven dle postupu uvedeného v kapitole 4.6.1).

Za účelem sestrojení kalibrační křivky byly vzorky hydrolyzátu lidského globinu (1 ml) spikovány takovým objemem „standardního roztoku“, aby množství přidávaných aduktů SO činilo: 0; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 5; 10; 50; 100 a 500 nmol/vzorek. Tyto vzorky byly posléze nanášeny na předem kondicionované SPE kolonky, promyty 3 ml, 5 ml nebo 7 ml vody. Zachycené adukty byly vymyty 3 ml „elučního činidla“, do eluátu bylo přidáno 30 μ l roztoku obsahujícího vnitřní standard, vzorek byl vysušen v Gyrovapu a dále zpracován jak je uvedeno v kapitole 4.8.1. Každý vzorek sloužící jako jeden kalibrační bod byl změřen třikrát. Jako srovnávací standard pro výpočet výtěžků extrakce sloužily ty samé vzorky hydrolyzátu spikované daným objemem „standardního roztoku“, které nebyly nanášeny na SPE kolonku, ale jinak byly zpracovány stejným způsobem.

4.8.4. Stanovení aduktů SO v SO-modifikovaném lidském globinu metodou SPE

Toto stanovení bylo provedeno na kolonkách Strata-X Giga Tubes o velikosti 1 g/12 ml. Byl stanoven obsah aduktů SO ve vzorcích SO-Gb. Enzymatickou hydrolyzu vzorků SO-Gb pronázou bylo zde nutno provést ve větším měřítku (80 mg vzorku bylo hydrolyzováno v 16 ml rozpouštědla). Vzhledem k velké navážce vzorku a následnému velkému objemu hydrolyzátu nebylo možno provést filtraci hydrolyzátu na 0,45 μ m mikrofiltrech Ultrafree. Filtrace tedy byla provedena na fritě o porozitě č. 4. SPE kolonky Giga Tubes byly kondicionovány 2 \times 16 ml MeOH a posléze 2 \times 16 ml H₂O. Po nanášení vzorku čirého hydrolyzátu (16 ml) byly kolonky promyty vodou (48 ml). Po promytí kolonek byly zachycené adukty eluovány 24 ml „elučního

činidla“. Do eluátu bylo posléze přidáno 30 μ l roztoku obsahujícího vnitřní standard (norleucin), vzorek byl zakoncentrován v rotační vakuové odparce a poté vysušen v Gyrovapu a dále zpracován tak, jak je uvedeno v kapitole 4.8.1.

4.9. Polyakrylamidová gelová elektroforéza (PAGE)

4.9.1. Příprava polyakrylamidového gelu

Základní roztoky pufru, monomeru akrylamidu a polymerizačních činidel byly připraveny dle instrukcí výrobce přístroje pro gelovou elektroforézu (Tabulka 6).

Roztoky byly skladovány v lednici (4 °C). Základní roztok akrylamidu byl obměňován každých 30 dní. 10 % roztok APS byl připravován denně čerstvý. Vlastní gely byly připravovány ve velikosti: 80 mm výška, 90 mm šířka a 0,75 mm tloušťka. Složení polymerizačního roztoku potřebného pro přípravu 4 % startovního gelu a 20 % dělicího gelu je uvedeno v tabulce 7.

Tabulka 6. Složení základních roztoků a pufrů potřebných pro SDS-PAGE.

Název roztoku či pufru	Složení
30 % w/v akrylamid/Bis (100 ml)	29,2 g akrylamid 0,8 g methylen bis-akrylamid (Bis)
1,5 M Tris-HCl, pH = 8,8 (100 ml)	18,15 g Tris úprava pH na 8,8 pomocí 6 M HCl
0,5 M Tris-HCl, pH = 6,8 (100 ml)	6 g Tris úprava pH na 6,8 pomocí 6 M HCl
startovní pufr (9,5 ml)	3,75 ml deionizované vody 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl, pH = 6,8 2,5 ml glycerol 2,0 ml 10 % w/v SDS 1 mg bromfenolová modř
10 × elektrodový pufr (500 ml)	30,3 g Tris 144,0 g glycin 10,0 g SDS

Polymerizace dělicího gelu byla iniciována přidáním 50 μ l 10 % APS a 5 μ l TEMED do 10 ml gelu. Pro polymerizaci 10 ml startovního gelu bylo do něj přidáno

50 μ l 10 % APS a 10 μ l TEMED. Ihned po iniciaci polymerizace byly gely nality do skleněné formy, kde během 1 hodiny ztuhly.

Tabulka 7. Příprava gelů (10 ml), všechny objemy jsou uvedeny v ml.

Gel (%)	Deionizovaná voda	30 % akrylamid/Bis	Pufř *	10 % w/v SDS
4	6,1	1,3	2,5	0,1
20	0,7	6,7	2,5	0,1

* pro přípravu dělicího gelu byl použit pufř 1,5 M Tris-HCl, pH = 8,8 a pro přípravu startovního gelu byl použit pufř 0,5 M Tris-HCl, pH = 6,8.

4.9.2. Elektroforéza SO-modifikovaného lidského globinu

80 ml 10 \times elektrodového pufřu bylo naředěno na desetinásobný objem přidáním 720 ml deionizované vody. Vysušené vzorky proteinů (1-0,5 mg) byly rozpuštěny v 950 μ l startovního pufřu, do kterého bylo následně přidáno 50 μ l 2-merkptoethanolu. Vzorky byly následně krátce zahřáty na teplotu 97 $^{\circ}$ C po dobu 4 minut a po vychlazení nanoseny na 4 % startovní gel do předem připravených jamek.

Vlastní elektroforéza byla provedena ve 20 % dělicím gelu, připojeném na napětí 300 V po dobu 50 minut. Po ukončení elektroforézy a vyjmutí gelu byly proteiny v gelu obarveny stříbrem dle metody Yan a spol. (2000). Po obarvení byly plátky gelu vysušeny napnuté mezi dvěma fóliemi celofánu a uschovány v suchu.

5. VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1. Příprava standardů jednotlivých aduktů SO s aminokyselinami

Standardy aduktů SO s aminokyselinami cysteinem, histidinem a lysinem byly připraveny jednoduchou alkylací aminokyselin nebo jejich Na-Boc chráněných derivátů molekulami SO ve vodném prostředí. Tento způsob syntézy měl za následek vznik směsi různých regioizomerů příslušných aduktů. Jednotlivé regioizomery bylo proto nutno následně ze směsi izolovat semi-preparativní HPLC. Po určení struktury čistých regioizomerů NMR technikami byly tyto látky použity především jako standardy k identifikaci a kvantifikaci aduktů SO v SO-modifikovaném lidském globinu.

5.1.1. Adukty SO-Cys

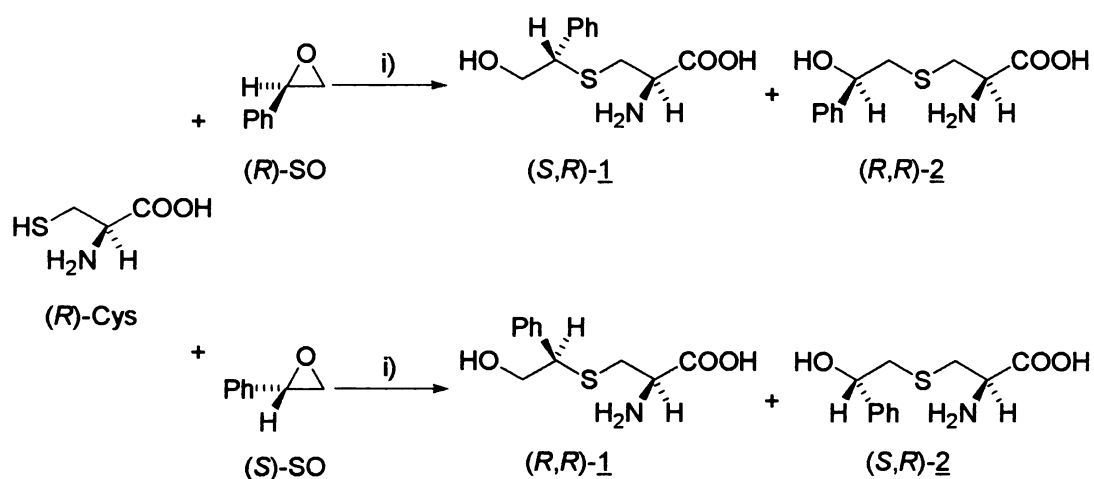
5.1.1.1. Syntéza aduktů SO-Cys

Postup přípravy aduktů SO-Cys, jmenovitě směsi dvou jejich regioizomerů S-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinu **1** a S-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinu **2**, byl poprvé popsán v práci Yagen a spol. (1984). Jejich následovníci publikovali doplňující data o hmotnostních spektrech těchto látek (Chakrabarti, 1996). Vzhledem k tomu, že původní postup přípravy aduktů SO-Cys byl velmi zdlouhavý a zbytečně složitý, tak jsem tento postup vylepšil zavedením triethylaminu do reakční směsi místo 1 M NaOH použitého v původním postupu. Výsledné adukty SO-Cys byly z matečného roztoku jednoduše vysráženy acetonem. Thiolová skupina cysteinu byla ve vodné reakční směsi přímo alkylována molekulou SO. Triethylamin zde sloužil jako bazický katalyzátor, který deprotonací thiolové skupiny umožnil její nukleofilní reakci s epoxidovou skupinou SO. Díky vysoké reaktivitě thiolové skupiny probíhala reakce dostatečně i za pokojové teploty a reakční směs nebylo nutno zahřívát. Za těchto podmínek nebyla pozorována žádná tvorba vedlejších a nežádoucích produktů reakce SO např. s α -amino skupinou nebo s karboxylovou skupinou cysteinu, a proto nebylo nutno tyto dvě skupiny cysteinu blokovat před alkylací SO nějakou chránicí skupinou.

Na obrázku 2 je znázorněna semi-preparativní HPLC analýza produktů vzniklých reakcí (*R*)-cysteinu s jednotlivými enantiomery (*S*)-SO, (*R*)-SO a s racemickým SO. Jednotlivé adukty SO-Cys byly monitorovány UV detektorem při 220 nm. Z obrázku 2 je patrné, že reakce (*R*)-cysteinu s (*S*)-SO poskytla dva produkty, odpovídající

přítomnosti dvou píků, kdežto reakce (*R*)-cysteinu s (*R*)-SO poskytla jiné dva produkty, odpovídající přítomnosti dvou píků o jiných retenčních časech než předchozí dva produkty. HPLC analýzou produktů reakce (*R*)-cysteinu s racemickým SO pak byly získány čtyři dobře oddělené píky, které měly retenční časy identické s předchozími produkty. HPLC analýza tedy prokázala, že bazicky katalyzovaná reakce (*R*)-cysteinu s jednotlivými enantiomery SO probíhá S_N2 mechanismem. Celkový průběh této reakce je naznačen ve schématu 2.

Schéma 2. Reakce (*R*)-cysteinu s enantiomery (*R*)-SO a (*S*)-SO: i) H_2O /triethylamin, 25 °C.



Takovýto průběh reakce je v souladu s pozorováním Yagena a spol. (1984), kteří ve své studii prokázali S_N2 mechanismus u reakce N-acetyl-L-cysteinu s SO. Ze S_N2 mechanismu vyplývá, že během bazicky katalyzované reakce thiolové skupiny s molekulou SO dochází ke vzniku dvou regioizomerů [S-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinu a S-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinu], a to v závislosti na tom, na kterém ze dvou stereogenních epoxidových uhlíků (α nebo β) reakce proběhne. Pokud tato reakce proběhne na α -uhlíku, dojde zároveň k inverzi jeho absolutní konfigurace, zatímco pokud reakce proběhne na β -uhlíku, tak jeho absolutní konfigurace zůstane zachována (Linhart, 2001). Vzhledem k tomu, že jednotlivé regioizomery aduktů SO-Cys obsahují dvě stereogenní centra (jedno centrum je na α nebo β uhlíku pocházejícím z původní molekuly SO a druhé centrum je na uhlíku pocházejícím z molekuly cysteinu), mohou oba dva regioizomery S-(21HPE)cystein a S-(22HPE)cystein poskytovat celkem čtyři možné diastereomery, což bylo dobře

prokázáno jejich HPLC analýzou (obrázek 2). Bylo prokázáno, že reakce (*R*)-cysteinu s (*S*)-SO poskytla dva produkty, odpovídající přítomnosti dvou regioizomerů: (*R,R*)-*S*-(21HPE)cysteinu (*R,R*)-1 a (*S,R*)-*S*-(22HPE)cysteinu (*S,R*)-2, kdežto reakce (*R*)-cysteinu s (*R*)-SO poskytla taktéž dva produkty, odpovídající přítomnosti dvou jiných regioizomerů: (*S,R*)-*S*-(21HPE)cysteinu (*S,R*)-1 a (*R,R*)-*S*-(22HPE)cysteinu (*R,R*)-2. HPLC analýzou produktů reakce (*R*)-cysteinu s racemickým SO pak byly ovšem získány čtyři dobře oddělené píky, odpovídající produktům, které eluují v tomto pořadí: (*R,R*)-1, (*R,R*)-2, (*S,R*)-2 a (*S,R*)-1. Tvorba aduktů SO-Cys tedy proběhla stereospecificky. Za zmínku stojí i to, že úspěšná HPLC analýza čtyř diastereomerů aduktů SO-Cys vedoucí k jejich dobré separaci nebyla dosud nikde popsána (Jágr, 2004).

Při HPLC analýze všech čtyř SO-Cys diastereomerů byla zjištěna zajímavá závislost rozdílů v retenčních časech těchto diastereomerů v závislosti na vzdálenosti obou stereogenních center v jejich molekulách. Rozdíly v retenčních časech a tím i rozlišení jednoho páru diastereomerů: (*R,R*)-1, a (*S,R*)-1 byly větší než rozlišení v případě druhého páru diastereomerů: (*R,R*)-2 a (*S,R*)-2. V prvním případě byla totiž obě stereogenní centra od sebe vázaná jen přes tři kovalentní vazby, kdežto ve druhém případě byla obě centra vázaná přes čtyři kovalentní vazby.

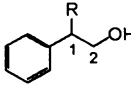
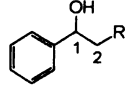
5.1.1.2. Charakterizace struktury aduktů SO-Cys

Jednotlivé diastereomery aduktů SO-Cys: (*R,R*)-1, (*S,R*)-1, (*R,R*)-2 a (*S,R*)-2 byly ze směsi izolovány semi-preparativní HPLC na koloně Synergi-Polar RP. Struktura těchto aduktů byla následně určena technikou ¹H-NMR. Jednotlivé signály aduktů byly přiřazeny k příslušným atomům s pomocí softwarového programu "¹H- and ¹³C-NMR predictor" (CS ChemNMR Pro 5.0, www.upstream.ch, Curych, Švýcarsko) a podle obecně platných pravidel pro přiřazování signálů protonů vodíků. Jednotlivé regioizomery *S*-(21HPE)cysteinu a *S*-(22HPE)cysteinu byly snadno rozpoznatelné podle charakteristických posunů δ signálů jejich vodíků, zejména vodíků vázaných na uhlíky pocházející z epoxidické skupiny SO: H α a H β . Chemické posuny těchto vodíků jsou nejen pro adukty SO-Cys, ale i pro ostatní zkoumané adukty SO-Lys a SO-His shrnuty v tabulce 8.

Signál vodíku H α (CH₂CHOHPh) regioizomeru 2 byl ve srovnání s regioizomerem 1 posunut směrem k vyšším hodnotám ppm cca o 0,68 ppm k hodnotě $\delta = 4,66$ ppm, zatímco signál vodíku H β (CH₂CHOHPh) byl posunut směrem k nižším

hodnotám ppm cca o 0,95 ppm k hodnotě $\delta = 2,76$ ppm. Mezi jednotlivými diastereomery byly pozorovány jen velmi malé, téměř zanedbatelné rozdíly v hodnotách chemických posunů δ . Tak např. pro názornost, hodnota δ dubletu vodíku náležejícímu skupině SCH_2 v diastereomeru (R,R) -1 činila 2,65 a 2,95 ppm, zatímco ve druhém diastereomeru (S,R) -1 byla mírně odlišná: 2,67 a 2,82 ppm.

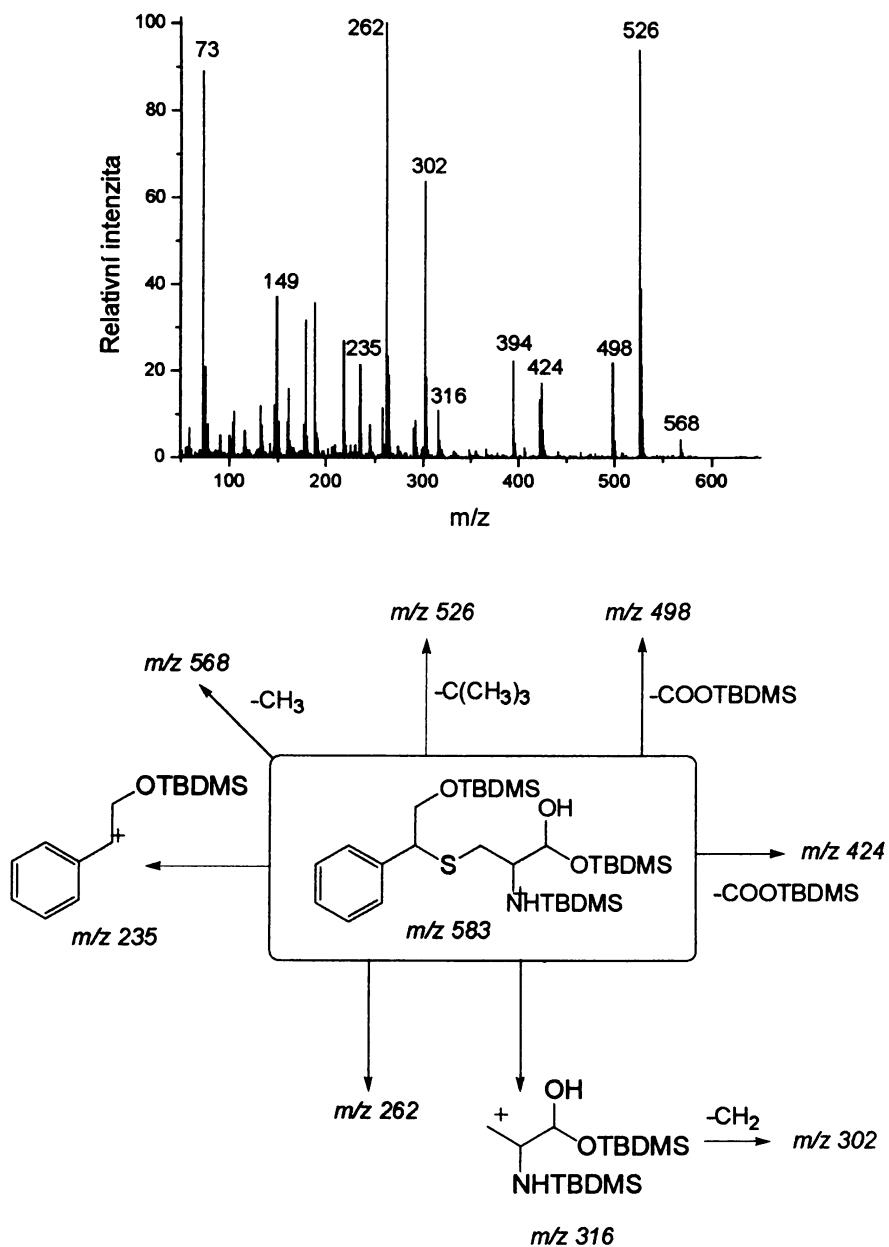
Tabulka 8. Chemické posuny význačných protonů vodíku v 21HPE a 22HPE regioizomerech aduktů SO-Cys, SO-Lys a SO-His.

Typ regioizomerie	Sloučenina	δ (H1) = H α (ppm)	δ (H2) = H β (ppm)
21HPE 	(R,R) - <u>1</u>	3,71	3,71
	(S,R) - <u>1</u>	3,71	3,71
	(S,S) - <u>3</u>	4,29	3,75
	(R,S) - <u>3</u>	4,29	3,75
	(S,S) - <u>5</u>	5,56	3,87 a 4,08
	(R,S) - <u>5</u>	5,52	4,02
	(S,S) - <u>7</u>	5,60	3,97 a 4,15
	(R,S) - <u>7</u>	5,59	3,98 a 4,15
22HPE 	(R,R) - <u>2</u>	4,66	2,76
	(S,R) - <u>2</u>	4,66	2,76
	(R,S) - <u>4</u>	4,90	2,98 a 3,13
	(S,S) - <u>4</u>	4,90	2,98 a 3,13
	(R,S) - <u>6</u>	4,91	4,18 a 4,31
	(S,S) - <u>6</u>	4,91	4,18 a 4,35
	(R,S) - <u>8</u>	4,89	4,18 a 4,34
	(S,S) - <u>8</u>	4,91	4,17 a 4,35

Jakmile byla struktura obou regioizomerů 1 a 2 jednoznačně určena technikou $^1\text{H-NMR}$, interpretace hmotnostních spekter těchto aduktů se stala mnohem snadnější. V LC/MS spektru regioizomeru 2 bylo možno pozorovat fragment o $m/z = 135$ ($[\text{M}+\text{H-CHOHPh}]^+$, charakteristický pouze pro tento regioizomer. Další fragment, charakteristický pro regioizomer 1, bylo možno pozorovat v GC/MS spektrech TBDMS derivátů aduktů SO-Cys. Zatímco v GC/MS spektru derivátu 1-(TBDMS)₃ bylo možno pozorovat fragment $[\text{CHPhCH}_2\text{OTBDMS}]^+$ o $m/z = 235$ (obrázek 5),

vzniklý štěpením C-S vazby, ve spektru druhého regioizomeru 2-(TBDMS)₃ nebyl pozorován žádný fragment, který by mohl vzniknout podobným způsobem.

Obrázek 5. GC/MS spektrum TBDMS derivátu S-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)cysteinu (nahore) a schéma znázorňující pravděpodobný průběh fragmentace derivátu (dole).



Při syntéze aduktů SO-Cys ve vodném roztoku obsahujícím triethylamin byl získán produkt, který se skládal ze směsi dvou regioizomerů. V tomto produktu převažoval S-(21HPE)cystein nad S-(22HPE)cysteinem a to v poměru cca 3:1. Byly vyzkoušeny i různé modifikace postupu syntézy aduktů SO-Cys, zejména úprava pH

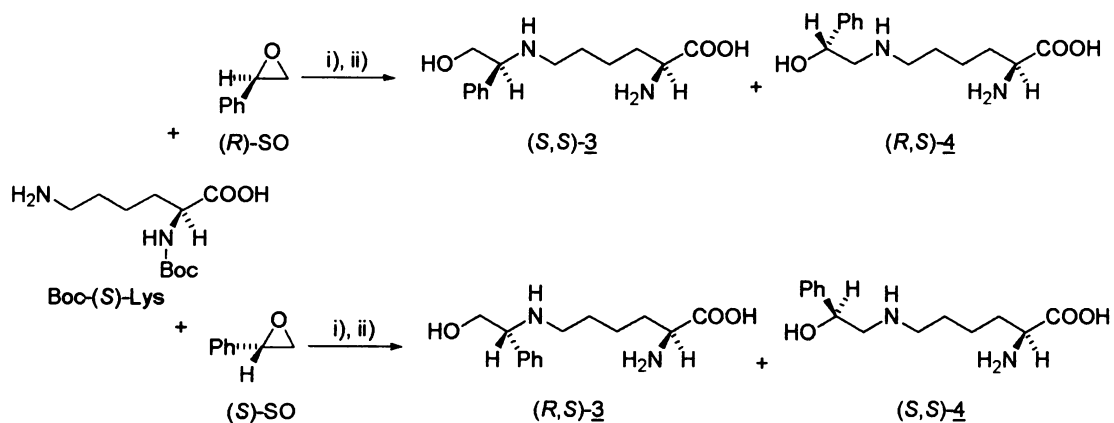
reakční směsi přidávkem NaOH tak, aby pH reakční směsi bylo cca 9,0. Tímto způsobem bylo dosaženo změny poměru mezi S-(21HPE)cysteinem a S-(22HPE)cysteinem v produktu na 1,2:1. Pokud byl cystein alkylován SO v ještě více alkalickém prostředí (pH cca 11), pak ve výsledném produktu převažoval naopak S-(22HPE)cystein nad S-(21HPE)cysteinem, a to v poměru cca 2:1. Tato pozorování jsou vesměs v souladu s údaji uvedenými ve studii Hemminki (1986), který prováděl alkykaci cysteinu SO v pufru o pH = 7,4. Výsledný poměr mezi S-(21HPE)cysteinem a S-(22HPE)cysteinem činil 2:1.

5.1.2. Aduky SO-Lys

5.1.2.1. Syntéza aduktů SO-Lys

Aduky SO s lysinem (SO-Lys) byly syntetizovány přímou alkykací N α -Boc-lysinu styren-7,8-oxidem, následovanou odstraněním N α -Boc skupiny kyselinou trifluoroctovou. Průběh této reakce je prezentován ve schématu 3.

Schéma 3. Reakce N α -Boc-(S)-lysinu s enantiomery (R)-SO a (S)-SO: i) H₂O/triethylamin, 80 °C; ii) TFA.



Na rozdíl od reakce SO s volným cysteinem, jehož funkční skupiny nebylo potřeba díky zvoleným reakčním podmínkám chránit, v případě alkykace lysinu bylo nutno chránit jeho α -amino skupinu tak, aby tato skupina nemohla být za zvýšené teploty reakční směsi alkylována a aby reakce probíhala pouze na ϵ -amino skupině lysinu. Z důvodu menší reaktivity ϵ -amino skupiny lysinu ve srovnání s thiolovou skupinou cysteinu bylo totiž nutno použít vyšší teplotu reakční směsi pro úspěšnou alkykaci lysinu (80 °C). Za těchto podmínek nebyla pozorována reakce SO s

karboxylovou skupinou lysinu za vzniku esterů (případně příslušné estery vznikaly, ale v zanedbatelném množství nebo byly nestabilní), takže tuto skupinu nebylo nutno v konečném důsledku chránit. Pokud byla reakce prováděna za pokojové teploty, tak probíhala velmi pomalu a s nízkými výtěžky produktu (pod 1 %). Prodloužení doby reakce ze 16 na 48 hodin nevedlo ke zvýšení výtěžku aduktů SO-Lys (po 16 hodinách činil výtěžek cca 30 %), protože docházelo k následné alkylationi již vzniklých aduktů SO-Lys na dvojnásob alkylované nežádoucí vedlejší produkty, adukty bis-SO-Lys, nadbytkem nezreagovaného SO přítomného v reakční směsi. Snížený výtěžek aduktů SO-Lys byl pozorován i tehdy, pokud byla zvolena vyšší teplota reakční směsi (>100 °C), pravděpodobně kvůli rychlé degradaci molekuly SO.

Výslednou směs bylo po odbourání $N\alpha$ -Boc skupiny kyselinou trifluoroctovou nejprve třeba přecistit od nečistot tvořených zbytky nezreagovaného lysinu a dalšími degradačními produkty. K tomu se výborně hodila chromatografie na sloupci naplněném silikagelem. Tímto způsobem ale nebylo možno od sebe oddělit jednotlivé izomery 3 a 4. Tyto izomery byly proto následně izolovány semi-preparativní HPLC na koloně Synergi-Polar RP. Na obrázku 3 je ukázána HPLC separace aduktů SO-Lys vzniklých reakcí $N\alpha$ -Boc-(*S*)-lysínu s jednotlivými enantiomery SO i s racemickým SO. Na tomto obrázku je zřetelně vidět, že na použité HPLC koloně sice docházelo k oddělení jednotlivých regioizomerů 3 a 4, ale kolona už nebyla schopná vzájemně separovat jednotlivé diastereomery (*R,S*)-3 od (*S,S*)-3 a (*R,S*)-4 od (*S,S*)-4. Tato skutečnost se dá vysvětlit větší vzdáleností dvou stereogenních center v případě aduktů SO-Lys, mezi kterými se nachází 6 kovalentních vazeb u diastereomerů (*R,S*)-3 a (*S,S*)-3 či 7 kovalentních vazeb u diastereomerů (*R,S*)-4 a (*S,S*)-4.

Pro tvorbu aduktů SO-Lys alkylationi $N\alpha$ -Boc-lysínu molekulou SO bylo zvoleno alkalické prostředí za přítomnosti triethylaminu. Analogicky k reakci, kterou vznikaly adukty SO-Cys, kde byl prokázán S_N2 mechanismus reakce, lze usuzovat, že i alkylatione $N\alpha$ -Boc-lysínu probíhala S_N2 mechanismem. V tomto případě by reakcí $N\alpha$ -Boc-(*S*)-lysínu s (*R*)-SO vznikly dva produkty, odpovídající přítomnosti dvou regioizomerů: (*S,S*)-N ϵ -(21HPE)lysínu (*S,S*)-3 a (*R,S*)-N ϵ -(22HPE)lysínu (*R,S*)-4, zatímco reakce $N\alpha$ -Boc-(*S*)-lysínu s (*S*)-SO by poskytla taktéž dva produkty, odpovídající přítomnosti dvou jiných regioizomerů: (*R,S*)-N ϵ -(21HPE)lysínu (*R,S*)-3 a (*S,S*)-N ϵ -(22HPE)lysínu (*S,S*)-4. Poměr regioizomerů 3 a 4 ve směsi určený HPLC-UV analýzou byl 1,3 : 1,0 pro produkty vzniklé jak z (*R*)-SO, tak i z (*S*)-SO. Byla vyzkoušena i alkylatione $N\alpha$ -Boc-(*S*)-lysínu styren-7,8-oxidem v prostředí 0,1 M NaOH.

Za těchto podmínek vznikl téměř výhradně jen jeden regioizomer: 3, kdežto množství vzniklého druhého regioizomeru 4 bylo prakticky zanedbatelné (poměr mezi 3 a 4 byl v tomto případě cca 50:1).

5.1.2.2. Charakterizace struktury aduktů SO-Lys

Struktura jednotlivých regioizomerů 3 a 4 byla jednoznačně určena díky použití techniky $^1\text{H-NMR}$. Hodnoty chemických posunů (δ) vodíků H_α a H_β charakteristických pro jednotlivé regioizomery 3 a 4 jsou prezentovány v tabulce 2. V případě aduktů SO-Lys byly pro tyto vodíky pozorovány podobné posuny jako u aduktů SO-Cys. Tak signál H_α v 4 byl ve srovnání s druhým regioizomerem 3 posunut směrem k vyšším hodnotám ppm o cca 0,61 ppm k hodnotě $\delta = 4,90$ ppm, zatímco signál H_β byl posunut směrem k nižším hodnotám ppm: 2,98 a 3,13. V $^1\text{H-NMR}$ spektrech byly pozorovány prakticky zanedbatelné rozdíly (v rozsahu cca $\pm 0,04$ ppm) mezi $^1\text{H-NMR}$ spektry diastereomerů (R,S)-3 a (S,S)-3, respektive mezi (R,S)-4 a (S,S)-4.

Po jednoznačném určení struktury obou SO-Lys regioizomerů 3 a 4 bylo možno snadno interpretovat jejich hmotnostní spektra. V GC/MS spektrech TBDMS derivátů aduktů SO-Lys se daly pozorovat fragmenty charakteristické pro jednotlivé diastereomery. Zatímco v GC/MS spektru derivátu 3-(TBDMS)₃ bylo možno pozorovat pro tento regioizomer charakteristický fragment o $m/z = 463$, vzniklý odštěpením $[\text{CH}_2\text{OTBDMS}]^+$ skupiny, ve spektru druhého regioizomeru 4-(TBDMS)₃ byl pozorován zcela jiný charakteristický fragment o $m/z = 387$, vzniklý odštěpením $[\text{CHPhOTBDMS}]^+$ skupiny. Oba dva fragmenty charakteristické pro jednotlivé regioizomery byly navíc v GC/MS spektrech nejintenzivnější, což bylo dále využito k jejich velmi citlivému a selektivnímu kvantitativnímu stanovení metodou GC/MS pracující v SIM módu. Za zmínku zde stojí i to, že postup přípravy aduktů SO-Lys a charakterizace jejich struktury nebyl dosud nikde popsán (Jágr, 2005b).

5.1.3. Adukty SO-His

5.1.3.1. Syntéza aduktů SO-His

Molekula histidinu obsahuje ve své imidazolové skupině dva dusíkové atomy (N_π a N_τ). Oba dva dusíkové atomy mohou reagovat s alkylačním činidlem, při tom dochází ke vzniku dvou druhů regioizomerů: N_π a N_τ . Díky možnosti vzniku dalších dvou regioizomerů u aduktů histidinu se styren-7,8-oxidem (21HPE a 22HPE) může v

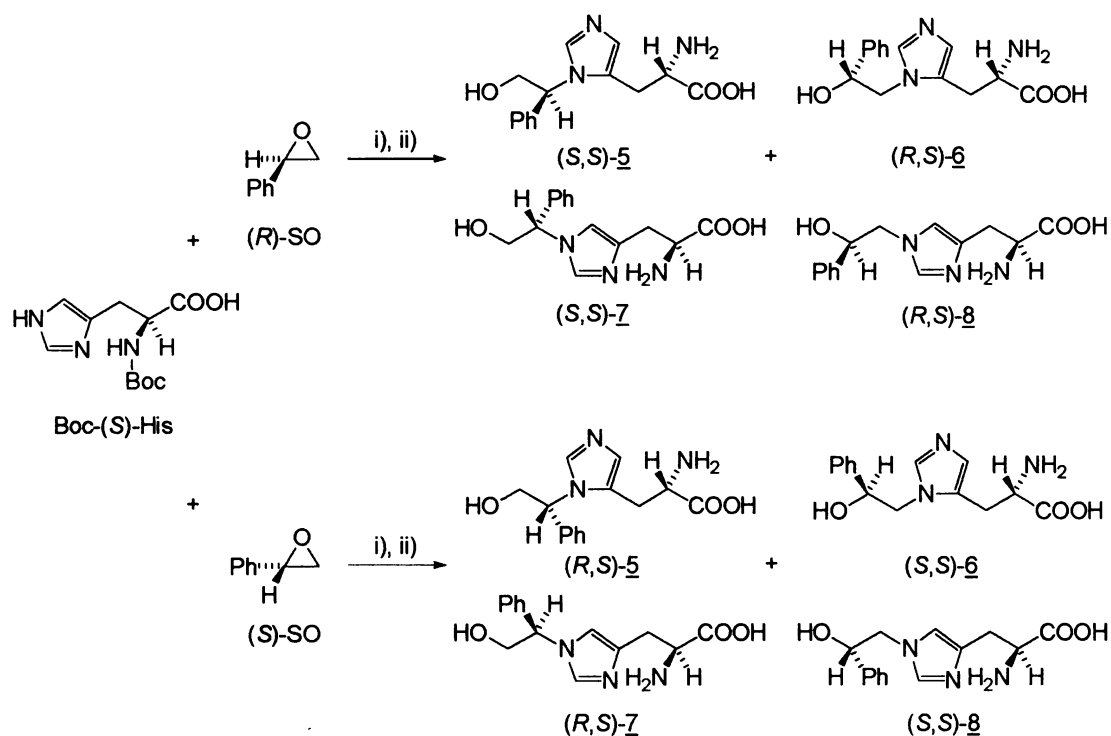
jejich případě dojit ke vzniku dvojnásobného počtu regioizomerů než je tomu u aduktů SO-Cys a SO-Lys (tabulka 3).

Tvorba aduktů SO-His, jak u polyaminokyselin, tak i u globinu inkubovaného *in vitro* s SO, byla popsána v několika studiích (Hemminki, 1986; Kaur, 1989; Badghisi, 2002; Basile, 2002), avšak dosud nebyl publikován žádný postup přípravy a izolace těchto aduktů v čistém stavu. Dosud byla popsána jen příprava aduktů histidinu s jinými alkylačními činidly. Tak Calleman a Campbell syntetizovali adukty histidinu s ethylenoxidem a propylenoxidem. V tomto případě bylo pozorováno, že imidazolový atom dusíku N τ byl těmito činidly snadněji alkylován než druhý imidazolový atom dusíku N π . Dělo se tomu tak pravděpodobně ze sterických příčin. Ve výsledném produktu pak převažovaly N τ adukty nad N π adukty (Calleman, 1979; Campbell, 1983). Též Noort a spol. připravili standardy histidinových aduktů s hořčičným plynem. V tomto případě byl jako výchozí surovina použit methylester N α -Boc-L-histidinu, který byl alkylován 2-(2-*terc*-butyloxyethylthio)ethyl chloridem (Noort, 1997). Také zde byla pozorována alkylace obou imidazolových dusíků vedoucí ke vzniku obou druhů regioizomerů (N π a N τ).

V této práci byly adukty SO s aminokyselinou histidinem (SO-His) připraveny přímou alkylací N α -Boc-(*S*)-histidinu styren-7,8-oxidem v alkalickém prostředí. Poté byla N α -Boc skupina odbourána v kyselém prostředí kyseliny trifluoroctové. Průběh této reakce je znázorněn ve schématu 4. Podobně jako v případě syntézy aduktů SO-Lys, tak i v tomto případě byla N α -amino skupina histidinu chráněna, aby nemohla být alkylována molekulami SO a aby reakce probíhala pouze na imidazolových atomech dusíku (N π či N τ). Z důvodu relativně menší reaktivity imidazolových atomů dusíku bylo nutno zvolit vyšší teplotu reakční směsi pro alkylaci (80 °C). Za těchto podmínek též nebylo pozorováno, že by probíhala reakce SO s karboxylovou skupinou histidinu ve významném měřítku, takže tuto funkční skupinu nebylo nutno chránit.

Podmínky reakce (teplota reakční směsi, doba reakce a relativní množství SO vůči N α -Boc-(*S*)-histidinu) byly optimalizovány tak, aby bylo dosaženo co nejvyššího výtěžku požadovaných aduktů SO-His (výtěžek činil cca 34 %). Podobně jako v případě aduktů SO-Lys, i zde byla při delší době reakce nebo při větším nadbytku SO pozorována tvorba dvojnásob alkylovaných nežádoucích vedlejších produktů bis-SO-His.

Schéma 4. Reakce $N\alpha$ -Boc-(*S*)-histidinu s enantiomery (*R*)-SO a (*S*)-SO: i) H_2O /triethylamin, 80 °C; ii) TFA.



Směs získanou po odbourání $N\alpha$ -Boc skupiny kyselinou trifluoroctovou bylo nejprve třeba předčistit od nečistot tvořených zbytky nezreagovaného histidinu, dvojnásob alkylovanými adukty histidinu a dalšími degradačními produkty. Toto předčištění bylo provedeno sloupcovou chromatografií na silikagelu. Sloupcová chromatografie musela být vícekrát opakována. Nejprve byly za použití jednoho systému rozpouštědel (chloroform:methanol:kyselina octová) odstraněny ze směsi velmi nepolární, nejrychleji eluované nečistoty. Poté byla použita jiná mobilní fáze (butanol:kyselina octová:voda, 3:1:1). Teprve pak se podařilo požadované adukty SO-His (5-8) zbavit zbývajících příměsí, hlavně zbytků nezreagovaného histidinu.

Jednotlivé diastereomery byly ze směsi následně izolovány semi-preparativní HPLC na koloně Synergi-Polar RP. Na obrázku 4 je ukázána HPLC separace aduktů SO-His vzniklých reakcí $N\alpha$ -Boc-(*S*)-histidinu s jednotlivými enantiomery SO i s racemickým SO.

Reakce $N\alpha$ -Boc-(*S*)-histidinu s (*R*)-SO poskytla čtyři produkty, odpovídající přítomnosti čtyř regioizomerů: (*S,S*)-N π -(21HPE)histidinu (*S,S*)-5, (*R,S*)-N π -(22HPE)histidinu (*R,S*)-6, (*S,S*)-N τ -(21HPE)histidinu (*S,S*)-7 a (*R,S*)-N τ -

(22HPE)histidinu (*R,S*)-8, zatímco reakce $N\alpha$ -Boc-(*S*)-histidinu s (*S*)-SO poskytla taktéž čtyři produkty, odpovídající přítomnosti čtyř jiných regioizomerů: (*R,S*)- $N\pi$ -(21HPE)histidinu (*R,S*)-5, (*S,S*)- $N\pi$ -(22HPE)histidinu (*S,S*)-6, (*R,S*)- $N\tau$ -(21HPE)histidinu (*R,S*)-7 a (*S,S*)- $N\tau$ -(22HPE)histidinu (*S,S*)-8.

Z obrázku 4 je jasně patrné, že na použité HPLC koloně docházelo k dělení jednotlivých regioizomerů 5 až 8, ale kolona už nebyla schopná rozdělit jednotlivé diastereomery (*R,S*)-6 od (*S,S*)-6, (*R,S*)-7 od (*S,S*)-7 a (*R,S*)-8 od (*S,S*)-8. Jedinou výjimkou byl pár diastereomerů: (*R,S*)-5/*(S,S)*-5, který byl separován. Tuto skutečnost je možno vysvětlit poměrně nejmenší vzdáleností dvou stereogenních center právě v regioizomeru 5, kde obě centra jsou vázána přes 4 kovalentní vazby. Ostatní regioizomery (6-8) mají tuto vzdálenost ve svých molekulách větší (5-6 kovalentních vazeb). Z výhradní přítomnosti diastereomeru (*S,S*)-5 v reakční směsi po alkylaci $N\alpha$ -Boc-(*S*)-histidinu s (*R*)-SO, a z toho, že alkylací $N\alpha$ -Boc-(*S*)-histidinu s (*S*)-SO vznikl výhradně diastereomer (*R,S*)-5, lze usuzovat, že alkylace $N\alpha$ -Boc-(*S*)-histidinu molekulou SO v alkalickém prostředí za přítomnosti triethylaminu probíhala S_N2 mechanismem tak, jak je navrženo ve schématu 4.

Poměr regioizomerů 6, 5, 8 a 7 ve směsi určený HPLC-UV analýzou byl cca 5:1:28:18 a byl prakticky shodný pro produkty vzniklé jak z (*R*)-SO, tak i z (*S*)-SO. Z toho je zřejmé, že $N\tau$ imidazolový dusík histidinu reagoval s molekulou SO mnohem ochotněji než $N\pi$ imidazolový dusík.

5.1.3.2. Charakterizace struktury aduktů SO-His

Struktura jednotlivých regioizomerů 5, 6, 7 a 8 byla zkoumána technikou $^1\text{H-NMR}$. Tímto způsobem se podařilo předběžně rozpoznat 21HPE či 22HPE regioizomery aduktů SO-His. 21HPE a 22HPE regioizomerii těchto aduktů bylo možno určit díky charakteristickým chemickým posunům signálů vodíků $H\alpha$ a $H\beta$. Hodnoty chemických posunů (δ) těchto vodíků $H\alpha$ a $H\beta$ pro regioizomery 5 až 8 jsou prezentovány v tabulce 8. Bylo zjištěno, že pořadí hodnot chemických posunů signálů vodíků $H\alpha$ a $H\beta$ u 21HPE a 22HPE regioizomerů aduktů SO-His je právě opačné než je tomu u odpovídajících 21HPE a 22HPE regioizomerů aduktů SO-Cys a SO-Lys. Tento jev by se dal vysvětlit vlivem imidazolové skupiny na chemické posuny příslušných vodíků $H\alpha$ a $H\beta$. Tak signály $H\alpha$ byly v 22HPE regioizomerech (6 a 8) posunuty směrem k nižším hodnotám ppm, zatímco signály $H\beta$ byly posunuty směrem k vyšším hodnotám ppm ve srovnání s 21HPE regioizomery (5 a 7). Chemické posuny

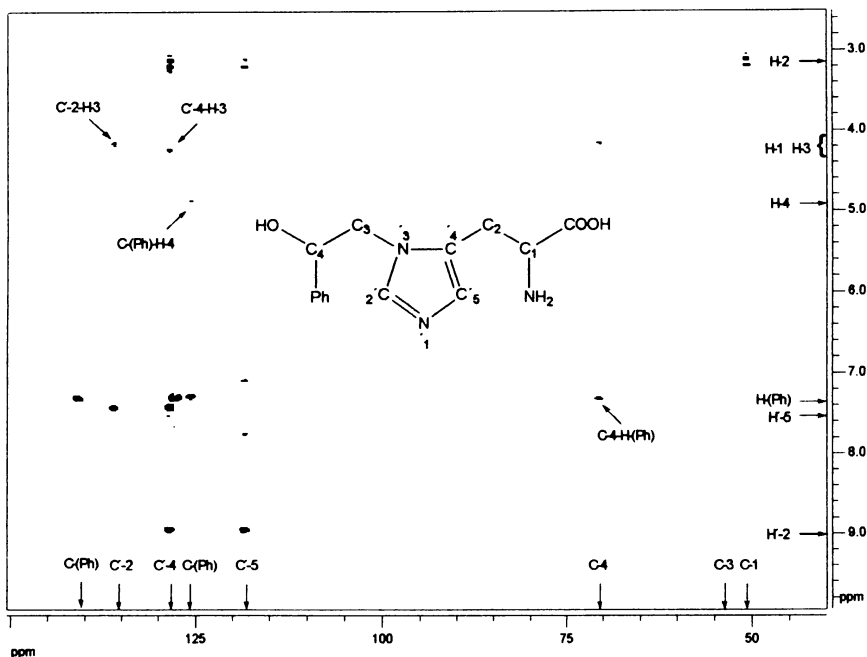
imidazolových vodíků ve všech regioizomerech aduktů SO-His ležely v rozmezí δ (ppm) = 7,3-7,6 a 8,7-9,1. Bohužel díky poměrně malým rozdílům v chemických posunech těchto imidazolových vodíků nebylo možno na základě použití výhradně jejich $^1\text{H-NMR}$ spekter přiřadit signály těchto vodíků k jednotlivým druhům $N\pi$ a $N\tau$ regioizomerie. Ani porovnání $^1\text{H-NMR}$ spekter aduktů SO-His se spektry jiných derivátů histidinu substituovaných na imidazolovém kruhu nepomohlo ve správném přiřazení druhu $N\pi$ a $N\tau$ regioizomerie k příslušným sloučeninám (Matthews, 1973).

Ke správnému a jednoznačnému určení místa alkylace imidazolového kruhu v příslušných aduktech SO-His, bylo nutno změřit jejich dvojdimenzionální (2D) NMR spektra. Zkoumané sloučeniny byly podrobeny nedávno vyvinutým 2D-NMR experimentům, konkrétně HMQC (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) a HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation), díky kterým už bylo možno jednoznačně charakterizovat jejich strukturu.

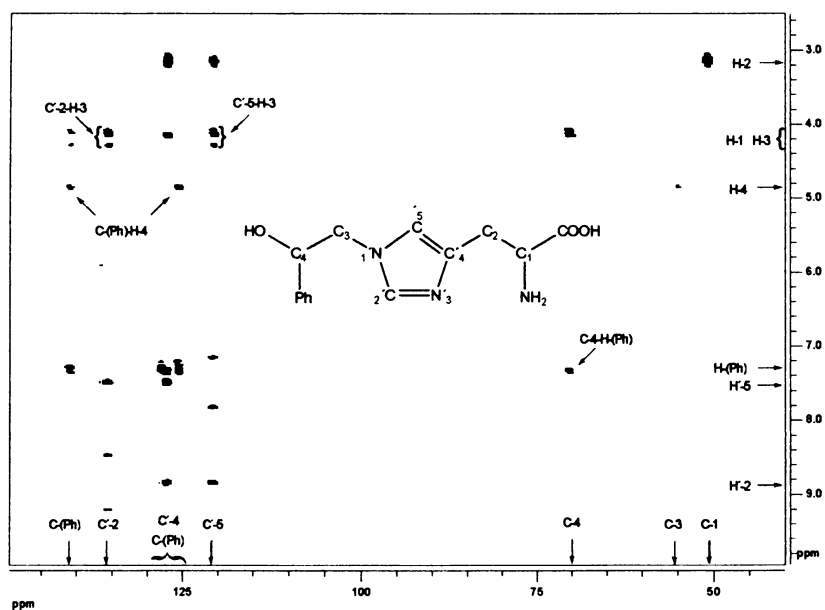
Byla změřena HMQC a HMBC spektra těchto regioizomerů: (*S,S*)- $N\pi$ -(2-fenyl-2-hydroxyethyl)histidinu (*S,S*)-6, (*R,S*)- $N\tau$ -(1-fenyl-2-hydroxyethyl)histidinu (*R,S*)-7 a (*S,S*)- $N\tau$ -(2-fenyl-2-hydroxyethyl)histidinu (*S,S*)-8. U těchto sloučenin byla také změřena jejich $^{13}\text{C-NMR}$ a APT (Attached Proton Test) spektra, aby bylo možno přiřadit signály protonů k signálům jednotlivých konkrétních uhlíků. Z důvodu příliš malého dostupného množství regioizomeru $N\pi$ -(1-fenyl-2-hydroxyethyl)histidinu nebyla jeho HMQC a HMBC spektra změřena. V HMQC spektrech jsou viditelné interakce mezi uhlíky a vodíky, které jsou na nich přímo navázané (interagující proton a uhlík jsou vázány přes jednu kovalentní vazbu). Proto díky HMQC spektrům bylo u měřených sloučenin možno přiřadit signály vodíků k signálům uhlíků, na které byly přímo navázány.

Parametry HMBC experimentů byly nastaveny tak, aby se prokázaly interakce mezi protony a uhlíky interagujícími s intrakční konstantou (coupling constant) $J_{\text{HC}} = 7$ Hz, která odpovídá vzdálenosti 3 kovalentních vazeb mezi interagujícími atomy a kdy je alespoň jeden z interagujících atomů součástí aromatického nebo imidazolového kruhu. Proto HMBC spektra umožnila jednoznačné přiřazení obou možných typů regioizomerie ($N\pi$ vs. $N\tau$ a 21HPE vs. 22HPE) k jednotlivým aduktům SO-His. Na obrázcích 6, 7 a 8 jsou spolu se strukturou příslušné sloučeniny a značením jejich atomů ukázána naměřená HMBC spektra těchto sloučenin. Krosníky indikující pozici substituce jsou na těchto obrázcích označeny šipkou.

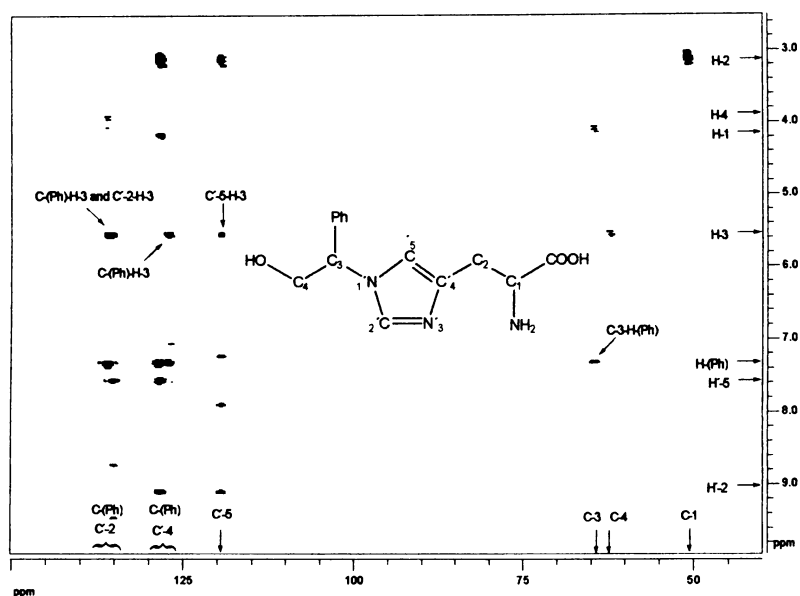
Obrázek 6. HMBC spektrum a struktura aduktu (*S,S*)- $N\pi$ -(2-fenyl-2-hydroxyethyl)histidinu, signály krospektrů indikující přítomnost interakce uhlíků C'-2 a C'-4 s protonem H-3 a interakce uhlíku C-4 s protonem H-(Ph) a uhlíku C-(Ph) s protonem H-4 jsou označeny šipkou.



Obrázek 7. HMBC spektrum a struktura aduktu (*S,S*)- $N\tau$ -(2-fenyl-2-hydroxyethyl)histidinu. Signály krospektrů indikující přítomnost interakce uhlíků C'-2 a C'-5 s protonem H-3 a interakce uhlíku C-4 s protonem H-(Ph) a uhlíku C-(Ph) s protonem H-4 jsou označeny šipkou.



Obrázek 8. HMBC spektrum a struktura aduktu (*R,S*)- $N\tau$ -(1-fenyl-2-hydroxyethyl)histidinu. Signály krosníků indikující přítomnost interakce uhlíků C'-2 a C'-5 s protonem H-3 a interakce uhlíku C-3 s protonem H-(Ph) a uhlíku C-(Ph) s protonem H-3 jsou označeny šipkou.



Na obrázku 6 je patrná přítomnost krosníku protonu H-3 s uhlíky C'-2 a C'-4. To spolu s absencí interakce mezi protonem H-3 a uhlíkem C'-5 indikuje skutečnost, že uhlík C-3 musí v imidazolovém kruhu sousedit s dusíkem N'-3. Z toho vyplývá fakt, že sloučenina (*S,S*)-6 je $N\tau$ regioizomerem. Navíc přítomnost krosníku mezi protony H-4 a fenylovými uhlíky indikuje přítomnost regioizomerie 22HPE. Ve výsledku to celé znamená, že sloučenina (*S,S*)-6 je (*S,S*)- $N\tau$ -(2-fenyl-2-hydroxyethyl)histidin.

Na obrázku 7 jsou patrné krosníky protonu H-3 s uhlíky C'-2 a C'-5. To spolu s přítomností interakce mezi protonem H-4 a fenylovými uhlíky a absencí jakékoliv interakce mezi protonem H-3 a uhlíkem C'-4 znamená, že sloučenina (*S,S*)-8 je (*S,S*)- $N\tau$ -(2-fenyl-2-hydroxyethyl)histidin.

Na obrázku 8 je znázorněno HMBC spektrum sloučeniny (*R,S*)-7. V tomto případě přítomnost krosníků protonu H-3 s uhlíky C'-2 a C'-5 spolu s interakcí mezi protonem H-3 a aromatickými uhlíky ukazuje na sloučeninu (*R,S*)- $N\tau$ -(1-fenyl-2-hydroxyethyl)histidin. Jakmile byla struktura sloučenin (*S,S*)-6, (*R,S*)-7 a (*S,S*)-8 jednou jednoznačně známa, tak se stalo naprosto zřejmým faktem, že zbývající čtvrtý regioizomer 5 nemůže být nic jiného, než $N\tau$ -(1-fenyl-2-hydroxyethyl)histidin. Tento fakt je navíc podporován naměřenými $^1\text{H-NMR}$ a MS spektry regioizomeru 5, které

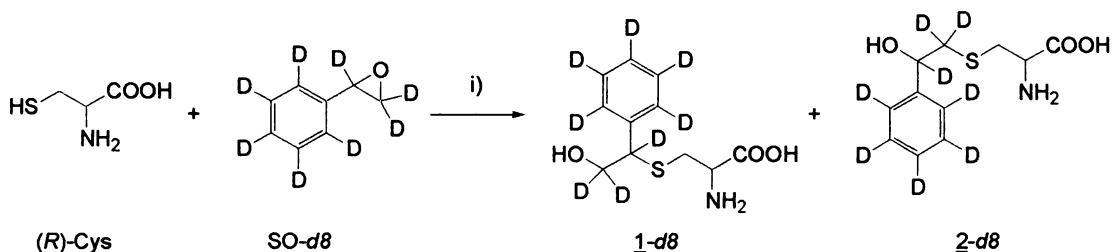
jsou naprosto v souladu s uvažovanou strukturou. Kromě toho ze vzájemných porovnání $^1\text{H-NMR}$ spekter jednotlivých diastereomerů je dále jasné, že jestliže sloučenina (*S,S*)-6 je $\text{N}\pi$ -(22HPE) regioizomer, tak také (*R,S*)-6 musí být $\text{N}\pi$ -(22HPE) regioizomer. Podobně pokud u (*R,S*)-7 bylo z 2D-NMR experimentů určeno, že jde o $\text{N}\tau$ -(21HPE) regioizomer, tak i (*S,S*)-7 musí být $\text{N}\tau$ -(21HPE) regioizomer a pokud (*S,S*)-8 je $\text{N}\tau$ -(22HPE) regioizomer, tak i (*R,S*)-8 musí být $\text{N}\tau$ -(22HPE) regioizomer. Za zmínku zde stojí i to, že postup přípravy aduktů SO-His a charakterizace jejich struktury nebyl dosud nikde popsán.

5.1.4. Syntéza deuterovaných analog SO-Cys a SO-His aduktů

Deuterované analogy aduktů SO-Cys a SO-His byly syntetizovány za využití postupů vycházejících z přípravy nedeuterovaných aduktů SO-Cys a SO-His. Na těchto postupech nebylo třeba nic měnit. Nejprve ovšem bylo nutno z deuterovaného styrenu připravit dostatečně čistý deuterovaný styren-7,8-oxid (SO-*d8*), který není běžně komerčně dostupný (Jágr, 2006c).

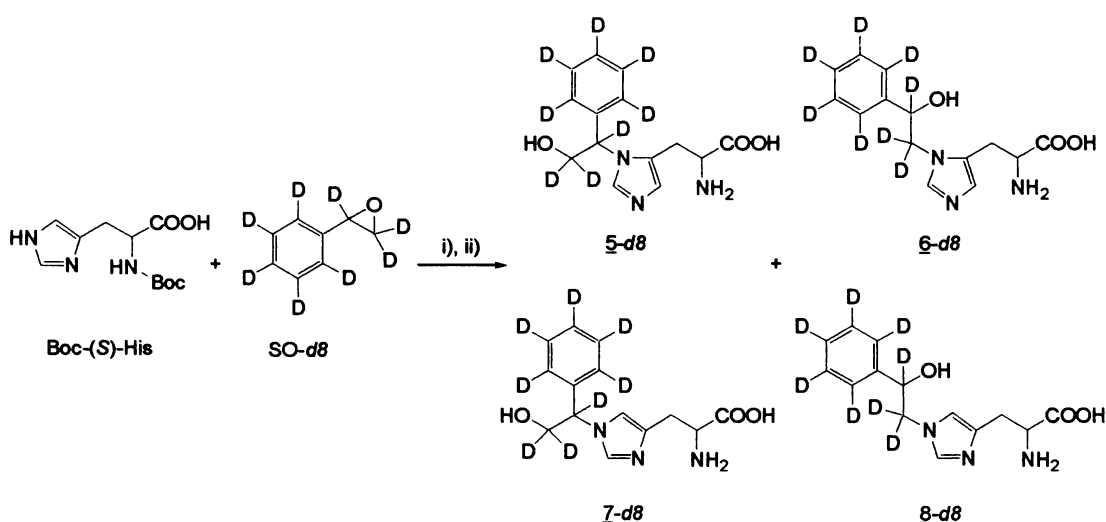
Po alkylationi (*R*)-cysteinu SO-*d8* ve vodném prostředí za přítomnosti triethylaminu vznikla směs dvou 21HPE a 22HPE regioizomerů deuterovaných aduktů cysteinu s SO (SO-Cys-*d8*). Průběh reakce je znázorněn ve schématu 5. Vzniklé adukty byly z reakční směsi vysráženy acetonem. Po promytí a vysušení produktu na vzduchu byl ve výsledném bílém prášku stanoven metodou HPLC-UV (detekce při 220 nm) poměr mezi oběma přítomnými regioizomery, který činil cca 3:1 (1-d8 : 2-d8). Za zmínku stojí i to, že výsledný poměr 21HPE a 22HPE regioizomerů byl prakticky totožný jak pro SO-Cys tak i pro SO-Cys-*d8* adukty. Tato skutečnost není překvapivá, protože tento poměr je závislý mimo jiné na pH reakčního média a to bylo v obou případech prakticky shodné.

Schéma 5. Reakce (*R*)-cysteinu s SO-*d8*: i) H_2O /triethylamin, 25 °C.



Za účelem syntézy deuterovaných analogů aduktů SO-His (SO-His-*d8*) byl příslušný Na-Boc-(*S*)-histidin alkylován předem připraveným SO-*d8*, poté byla Na-Boc chránící skupina produktu odbourána v kyselém prostředí a příslušné SO-His-*d8* adukty byly přečištěny na sloupci naplněném silikagelem. Průběh této syntézy je znázorněn ve schématu 6.

Schéma 6. Reakce Na-Boc-(*S*)-histidinu s SO-*d8*: i) H₂O/triethylamin, 80 °C; ii) TFA.



Po vysušení produktu byl ve výsledném naředěném prášku, prostém nežádoucích příměsí, stanoven metodou HPLC-UV (detekce při 220 nm) poměr mezi všemi čtyřmi přítomnými regioizomery, který činil cca 1:6:19:28 (5-*d8* : 6-*d8* : 7-*d8* : 8-*d8*). Zajímavé tedy je, že výsledný poměr N π vs. N τ a 21HPE vs. 22HPE regioizomerů byl pro adukty SO-His-*d8* prakticky totožný jako pro adukty SO-His.

Struktura aduktů SO-Cys-*d8* a SO-His-*d8* byla ověřena změřením GC/MS spekter jejich TBDMS derivátů. Tato spektra byla v plné shodě s předpokládanou strukturou. Významné fragmenty (např. [M+H]⁺, [M-C(CH₃)₃]⁺ a další) měly vždy o 8 m/z vyšší hodnotu než odpovídající fragmenty nedeuterovaných aduktů. Tato skutečnost znamená, že během alkylace aminokyselin deuterovaným SO došlo k plné inkorporaci všech osmi atomů deuteria pocházejících z molekuly SO-*d8* do struktury příslušného aduktu.

Adukty SO-Cys-*d8* a SO-His-*d8* byly připraveny za účelem jejich využití jako vnitřních standardů v následných studiích zabývajících se stanovením aduktů SO s

aminokyselinami v biologickém materiálu. Analýzou TBDMS derivátů aduktů SO-Cys, SO-His a jejich deuterovaných analog na kolonách DB-5ms či DB-1ms bylo zjištěno, že příslušné regioizomery a jejich deuterované protějšky mají na daných kolonách prakticky shodné retenční časy. Z toho vyplývá, že použití deuterovaných aduktů (SO-Cys-*d8* a SO-His-*d8*) jako vnitřních standardů je u plynové chromatografie omezeno jen na přístroje vybavené hmotnostními spektrometry.

5.1.5. Alternativní přístupy vedoucí k regioselektivní syntéze aduktů SO

Během vývoje postupů syntézy aduktů SO byly vyzkoušeny i jiné cesty, které by vedly k cíli. Tyto přístupy byly založeny na snaze syntetizovat adukty SO regioselektivním postupem, to znamená vypracovat takový postup, při kterém by ve směsi vznikal výhradně jen jeden regioizomer. Tak např. u cysteinu by to byl jen S-(21HPE)cystein, ale nikoliv už S-(22HPE)cystein. Tato regioselektivní syntéza nebyla při dosavadních výše popsaných postupech syntézy aduktů SO možná, protože v molekule SO, která byla použita k reakci, jsou k alkylnaci přístupné oba epoxidové uhlíky (i když každý relativně v jiné míře) a to vede k souběžné tvorbě jak 21HPE, tak i 22HPE regioizomerů.

K tomuto účelu se původně jevilo jako vhodné užití tzv. styren bromohydrinů. 2-Brom-1-fenylethanol byl připraven dle Daltona a spol. (1968) reakcí styrenu s N-brom-sukcinimidem. Připravený 2-brom-1-fenylethanol byl předestilován a jeho čistota byla prověřena metodou GC/MS. V produktu nebyly detekovány žádné jiné nečistoty.

Poté byla provedena reakce 2-brom-1-fenylethanolu s (*R*)-cysteinem, eventuálně s N α -Boc-(*S*)-histidinem či s N α -Boc-(*S*)-lysinem za různých podmínek a v přítomnosti různých bazických činidel, např. butyllithia v suchém tetrahydrofuranu nebo K₂CO₃ v suchém N,N-dimethylformamidu. Přitom mělo dojít k substituci atomu bromu v molekule styren bromohydrinu nukleofilní funkční skupinou aminokyseliny. Tímto způsobem tak měly teoreticky vznikat výhradně 22HPE regioizomery příslušných aminokyselin. Bohužel se ukázalo, že tento přístup selhal, neboť ve výsledném produktu bylo detekováno i významné množství nežádoucích 21HPE regioizomerů. Tak např. v produktu, získaném po alkylnaci cysteinu s 2-brom-1-fenylethanolem, bylo obdrženo cca 69% izomeru 2 a nezanedbatelné množství (cca 31 %) izomeru 1.

Byla vyzkoušena také alkylnace aminokyselin 2-chlor-1-fenylethanolem, který byl na trhu dostupný. 2-Chlor-1-fenylethanol byl využit k alkylnaci N α -Boc-(*S*)-histidinu

za účelem regiosektivní tvorby 22HPE izomerů histidinu. V tomto případě sice byl alkylován výhradně N τ imidazolový dusík, což vedlo ke tvorbě N τ -(22HPE)histidinu, bohužel cca 30 % výsledného produktu bylo tvořeno příměsí nežádoucího druhého regioizomeru: N τ -(21HPE)histidinu. Pravděpodobnou příčinou tvorby nežádoucích 21HPE regioizomerů vedle 22HPE regioizomerů by mohla být konverze části použitého 2-brom-1-fenylethanolu nebo 2-chlor-1-fenylethanolu na molekulu SO za bazických podmínek. Takto vytvořený SO by následně mohl alkylovat příslušné aminokyseliny za současné tvorby obou 21HPE a 22HPE regioizomerů.

Velkou nevýhodou těchto postupů byly navíc velmi nízké dosažené výtěžky produktů alkylace, které činily jen cca 1 % (vztaženo na množství použité aminokyseliny). Pravděpodobnou příčinou takto nízkých výtěžků mohla být nestabilita 2-brom-1-fenylethanolu či 2-chlor-1-fenylethanolu během syntetického procesu. Ukázalo se tedy, že použití 2-brom-1-fenylethanolu či 2-chlor-1-fenylethanolu nevede k žádoucímu cíli a proto bylo rozhodnuto, že adukty SO budou nadále syntetizovány v dobrých výtěžcích alkyací aminokyselin molekulami SO a jednotlivé regioizomery budou z produktu izolovány semi-preparativní HPLC, bude-li to potřeba.

Alternativní přístup regiosektivní syntézy 21HPE či 22HPE regioizomerů aduktů SO s aminokyselinami by mohl vycházet z práce Nováka a spol. (2004), ve které se autorům podařilo stereosektivně připravit 21HPE či 22HPE regioizomery DNA bázi díky použití styren bromohydrinů s hydroxylovou skupinou chráněnou allyl-skupinou. Použití chránící allyl-skupiny mělo za účel i snadnější alkylation DNA purinových bázi molekulou styren bromohydrinu.

Z důvodů jiných dalších výzkumných záměrů a nedostatku času nemohlo být více experimentálního úsilí v této práci věnováno přípravě styren bromohydrinů s allylovou chránící skupinou a zkoumání jejich reakce s aminokyselinami. Tato perspektivní cesta regiosektivní syntézy aduktů SO s aminokyselinami za použití takto chráněných styren bromohydrinů proto už nebyla dále zkoumána.

5.2. Derivatizace aduktů SO

Adukty SO-Cys, SO-Lys a SO-His je možno stanovit buď přímo metodou HPLC nebo po jejich derivatizaci metodou GC. Za účelem umožnění jejich GC-FID či GC/MS analýzy bylo nutno nalézt co nejvhodnější derivatizační činidlo, a proto byly

vyzkoušeny různé způsoby derivatizace aduktů SO (1-8). Hledaný způsob derivatizace, který by byl nejvhodnější pro adukty SO, by měl splňovat několik podmínek k tomu, aby byl v praxi snadno použitelný. Za prvé by derivatizace měla probíhat rychle a nejlépe v jednom kroku. Proto už předem byly jako nevhodné možné způsoby derivatizace vyloučeny všechny derivatizace prováděné ve dvou stupních. Jednalo se např. o esterifikaci následovanou acylací (Gamerith, 1983). Za druhé by derivatizace měla probíhat spolehlivě a za třetí by výsledné deriváty měly být snadno analyzovatelné. Jako nejvhodnější možný způsob derivatizace se tedy předběžně jevilo použití silylace či derivatizace chlormravenčanovými činidly.

5.2.1. Derivatizace silylačními činidly

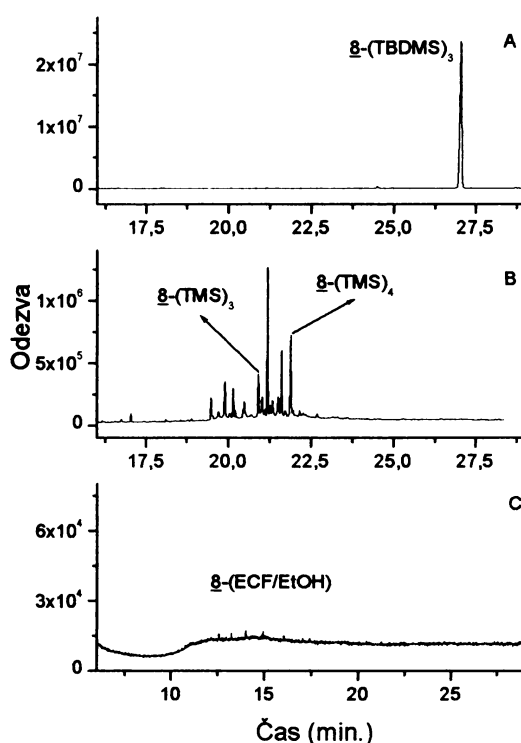
Byla vyzkoušena dvě silylační činidla: jednak směs bis(trimethylsilyl)trifluoracetamidu s 1 % trimethylchlorsilanem, která silyluje aminokyseliny za vzniku trimethylsilyl (TMS) derivátů, či *N-terc*-butyldimethylsilyl-*N*-methyl-trifluoracetamid, který vytváří *terc*-butyldimethylsilyl (TBDMS) deriváty. Teoreticky by tato silylační činidla měla derivatizovat všechny reaktivní skupiny přítomné v molekulách aduktů SO (tj. hydroxy-, amino- a karboxy-skupinu) (Mawhinney, 1986). Protože ve všech zkoumaných aduktech SO jsou přítomné tři takovéto silylovatelné skupiny, tak by měly vznikat trojnásob silylované deriváty. Derivatizace silylací byla vyzkoušena na všech připravených standardech aduktů SO. Použitý postup silylace oběma činidly je uveden v experimentální části.

Analýzou vzniklých derivátů na koloně DB-5ms bylo zjištěno, že příslušné TMS deriváty měly nižší retenční časy než jejich TBDMS protějšky a jejich derivatizace byla ve srovnání se silylací produkující TBDMS deriváty mnohem méně reprodukovatelná (vyšší citlivost TMS činidla a derivátů na stopy vlhkosti). Nadto byla kromě trojnásob silylovaných TMS derivátů zjištěna i překvapivá souběžná tvorba derivátů aduktů SO se čtyřmi navázanými TMS skupinami. Pravděpodobně zde docházelo k dvojnásobné silylaci amino-skupiny v molekulách aduktů SO. Poměr mezi tris-TMS a tetrakis-TMS deriváty závisel na typu sloučeniny a nebyl vždy stálý. Tak např. u aduktů SO-Cys činil podíl jejich tetrakis-TMS derivátů jen cca 1 % z celku, ale u TMS derivátů aduktů SO-Lys a SO-His byl tento podíl mnohem větší a činil cca 58 % a 70 %, jak je ukázáno na obrázku 9 (Jágr, 2006a).

TBDMS derivatizace se s oblibou užívá u těch látek, které mají být analyzovány metodou GC/MS, protože TBDMS deriváty mívají často v hmotnostních spektrech

velmi intenzivní ion $[M-C(CH_3)_3]^+$, umožňující snadnou identifikaci i kvantifikaci příslušného derivátu (Biermann, 1986). V mém případě byla silylace aduktů SO za vzniku TBDMS derivátů spolehlivější a reprodukovatelnější než silylace poskytující TMS deriváty. Podařilo se najít takový způsob derivatizace, kdy vznikaly výhradně deriváty se třemi navázanými TBDMS skupinami (tj. všechny funkční skupiny s aktivním vodíkem: hydroxy-, amino- a karboxylová skupina byly v aduktech SO silylovány).

Obrázek 9. GC/MS analýza regioizomeru $N\tau$ -(2-fenyl-2-hydroxyethyl)histidinu (**8**) po derivatizaci různými činidly: A) TBDMS; B) TMS; C) chlormravenčany.



Jednou z mála nevýhod TBDMS derivátů aduktů SO byla jejich poměrně nízká těkavost ústící v relativně vyšší retenční časy, např. ve srovnání s TMS deriváty. Tato nevýhoda se týkala zejména TBDMS derivátů aduktů SO-His (obrázek 9).

Překvapením byl velmi nízký výtěžek derivatizace pro $N\epsilon$ -(2-fenyl-2-hydroxyethyl)lysin. Pokud bylo určité množství tohoto regioizomeru silylováno TBDMS činidlem spolu se stejným množstvím druhého regioizomeru $N\epsilon$ -(1-fenyl-2-hydroxyethyl)lysinu, a obě dvě látky byly poté analyzovány na GC chromatografu vybaveném FID detektorem, tak výsledný pík $4-(TBDMS)_3$ byl cca 10-násobně menší

než pík 3-(TBDMS)₃. Pokusil jsem se tento nedostatek odstranit úpravou podmínek derivatizace. Pokud byla doba derivatizace zkrácena z 1 hodiny na 30 minut a teplota derivatizační směsi byla snížena ze 110 °C na 95 °C, tak bylo dosaženo jistého, ale stále neuspokojivého zlepšení. Tyto změny podmínek derivatizace neměly na výtěžek derivatizace ostatních aduktů SO 1-3 a 5-8 žádný vliv. Příčina velmi nízkého výtěžku derivatizace regioizomeru 4 proto zatím stále zůstává nejasná, pravděpodobně nejsou vznikající 4-(TBDMS)₃ deriváty stabilní a rychle podléhají následnému rozkladu. V další práci zaměřené na kvantitativní analýzu aduktů SO ve vzorcích globinu bylo nutno tedy počítat s tím, že v nich nebude možno metodou GC/MS či GC-FID korektně stanovit obsah Nε-(2-fenyl-2-hydroxyethylethyl)lysinu. Tvorba dvakrát či čtyřikrát silylovaných TBDMS derivátů nebyla u žádného ze zkoumaných aduktů SO pozorována.

TBDMS deriváty aduktů SO bylo možno díky jejich relativně nízké polaritě extrahovat před analýzou z N,N-dimethylformamidu do heptanu. Díky tomuto dodatečně zařazeném kroku byly TBDMS deriváty zbaveny nadbytku derivatizačního činidla i jiných více polárních nečistot, které zůstaly vesměs v dimethylformamidové fázi. Výtěžek extrakce TBDMS derivátů aduktů SO z dimethylformamidu do heptanu byl testován na příslušných standardech. Pro SO-Cys byl tento výtěžek cca 90 % a pro SO-Lys cca 80 %, v případě SO-His byl výtěžek extrakce nižší, činil pouze 40 %.

5.2.2. Derivatizace chlormravenčany

Jako třetí možný způsob derivatizace aduktů SO byla vyzkoušena derivatizace chlormravenčany, která byla v minulosti použita v různých studiích zabývajících se derivatizací aminokyselin. Vzniklé deriváty byly s výbornými výsledky separovány plynovou chromatografií na běžně dostupných kolonách (Hušek, 1991 a 2006; Simpson, 1996). Chlormravenčany acylují α-aminoskupinu aminokyseliny, zatímco alkohol, který je do derivatizační směsi přidáván, za přítomnosti chlormravenčanu esterifikuje karboxylovou skupinu. Aromatická hydroxylová skupina přítomná v tyrosinu též podléhá acylaci, zatímco alifatické hydroxyskupiny přítomné v serinu a threoninu zůstávají díky své nízké reaktivitě nedotčeny. Thiolová skupina přítomná v cysteinu, koncová ε-amino skupina lysinu a imidazolová skupina přítomná v histidinu podléhají acylaci, zatímco amidová skupina u Asn a Gln je esterifikována (Hušek, 2006). Hlavními výhodami postupu navrženého Huškem je rychlost derivatizace

(reakce je kompletně dokončena řádově v sekundách) a možnost reakce ve vodném prostředí.

Otestoval jsem různé systémy chlormravenčanových činidel (ethylchlormravenčan/ethanol nebo izobutylchlormravenčan/heptafluorbutanol). Výsledné produkty derivatizace jsem analyzoval na koloně DB-5ms metodou GC/MS. Na této koloně docházelo k eluci jen chlormravenčanových derivátů aduktů SO-Cys. Z MS spekter těchto derivátů se dalo vyčíst, že po aplikaci chlormravenčanových činidel byla u aduktů SO-Cys pozorována derivatizace karboxylové a amino skupiny, zatímco hydroxylová skupina zůstala nedotčena. Bohužel na dané koloně nebylo možno studovat chlormravenčanové deriváty aduktů SO-Lys a SO-His, neboť jejich píky nebyly v chromatogramu pozorovány a to ani po dlouhodobém vyhřívání kolony na 300 °C (obrázek 9). Jako nejpravděpodobnější vysvětlení se nabízí skutečnost, že hydroxylová skupina u aduktů SO-Lys a SO-His nebyla pro svou nízkou reaktivitu vůbec derivatizována, což způsobilo vyšší polaritu těchto aduktů kvůli přítomnosti volné hydroxylové skupiny a tím i nemožnost provedení jejich plynově-chromatografické analýzy. Ve výsledku se tedy jako nejvhodnější derivatizační činidlo pro analýzu aduktů SO metodou GC-FID či GC/MS ukázalo činidlo MTBSTFA poskytující TBDMS deriváty (Jágr, 2006a).

5.3. Detekce a stanovení aduktů SO v SO-modifikovaném lidském globinu

5.3.1. Identifikace aduktů SO v SO-modifikovaném lidském globinu

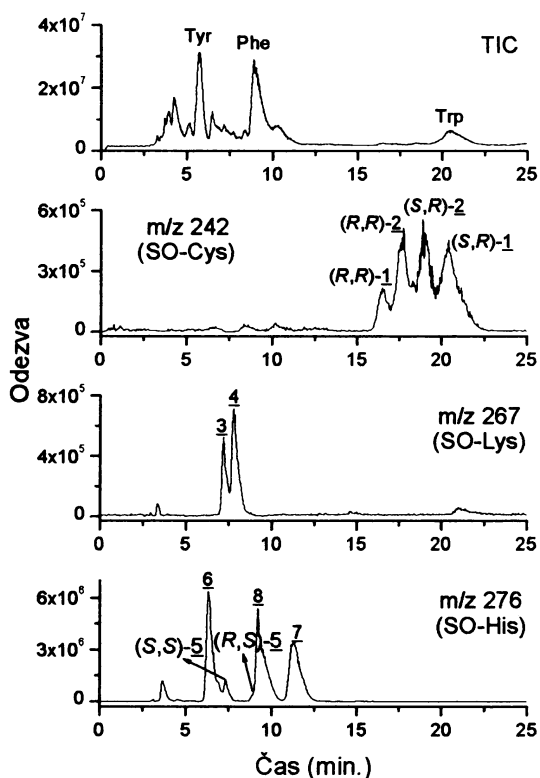
Jedním z cílů této práce bylo nejen identifikovat adukty SO s aminokyselinami v lidském globinu a vypracovat metodu jejich syntézy, ale též vypracovat analytickou metodu, která by byla vhodná k jejich stanovení. Tato metoda byla vyvinuta a ověřena na lidském globinu inkubovaném *in vitro* se 100-násobným molárním nadbytkem racemického SO (SO-Gb 100:1). Připravený SO-modifikovaný globin obsahuje velké množství aduktů SO, které lze pak snadno stanovit. Tento globin byl posléze podroben enzymatické hydrolýze pronázou či klasické kyselé hydrolýze 6 M HCl. Výsledný hydrolyzát byl posléze analyzován dvěma analytickými metodami: LC/MS nebo GC/MS.

Na obrázku 10 je ukázána LC/MS analýza enzymatického hydrolyzátu lidského globinu inkubovaného *in vitro* se 100-násobným molárním nadbytkem racemického SO a hydrolyzovaného pronázou při 37 °C po dobu 24 hodin. Látky byly ionizovány ESI technikou a jejich hmotnostní spektra byla snímána v rozsahu m/z 50-400.

Jednotlivé adukty SO byly identifikovány podle jejich kvazi-molekulárních iontů $[M+1]^+$, které měly hodnoty m/z 242 pro SO-Cys, m/z 267 pro SO-Lys a m/z 276 pro SO-His. Identita aduktů SO v hydrolyzátu globinu byla potvrzena porovnáním jejich hmotnostních spekter a retenčních časů s příslušnými standardy. Žádný z aduktů SO nebyl nalezen v hydrolyzátu kontrolního globinu.

Z porovnání obrázku 10 s obrázky 2, 3 a 4 je patrná o něco horší separační schopnost HPLC kolony Synergi-Polar RP o délce 15 cm ve srovnání s toutéž kolonou o délce 25 cm. Je zřejmé, že jednotlivé diastereomery aduktů SO-Cys nebyly na kratší koloně od sebe vzájemně zcela odděleny, zatímco na delší koloně už odděleny byly.

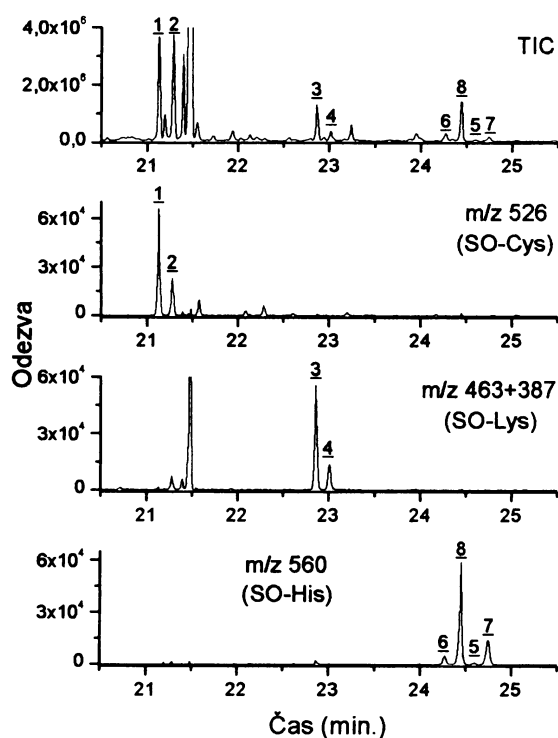
Obrázek 10. LC/MS analýza pronázového hydrolyzátu vzorku SO-Gb 100:1. TIC: celkový iontový proud; výběr iontů o m/z 242: detekce aduktů SO-Cys; výběr iontů o m/z 267: detekce aduktů SO-Lys; výběr iontů o m/z 276: detekce aduktů SO-His.



K tomu, aby bylo možné analyzovat adukty SO v enzymatickém hydrolyzátu lidského globinu metodou GC/MS, bylo zapotřebí hydrolyzáte nejprve pořádně vysušit a poté derivatizovat silylačním činidlem (MTBSTFA). GC/MS analýza výsledných TBDMS derivátů aduktů SO je ukázána na obrázku 11.

Jednotlivé sloučeniny byly ve hmotnostním spektrometru ionizovány nárazem elektronů. Porovnáním hmotnostních spekter aduktů SO přítomných v hydrolyzátu se standardy se ukázalo, že všechny funkční skupiny, tj. karboxylová, amino a hydroxylová, přítomné v aduktech, byly derivatizovány za vzniku trojnásobně silylovaných derivátů: SO-Cys-(TBDMS)₃, SO-Lys-(TBDMS)₃ a SO-His-(TBDMS)₃. Každý jednotlivý regioizomer těchto aduktů poskytl na chromatogramu jeden pík, který byl na koloně DB-5ms o délce 30 m dobře oddělený od píků ostatních regioizomerů aduktů SO i od píků jiných aminokyselin.

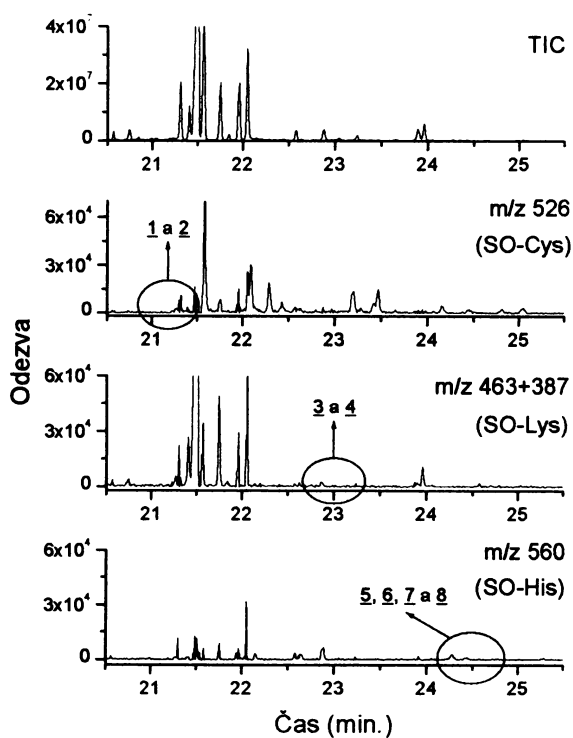
Obrázek 11. GC/MS analýza pronázového hydrolyzátu vzorku SO-Gb 100:1 po derivatizaci činidlem MTBSTFA. TIC: celkový iontový proud; výběr iontů o m/z 526: detekce aduktů SO-Cys; výběr iontů o m/z (463+387): detekce aduktů SO-Lys; výběr iontů o m/z 560: detekce aduktů SO-His.



Jednotlivé TBDMS deriváty aduktů SO-Cys a SO-His bylo možno identifikovat monitorováním jejich nejintenzivnějšího a charakteristického fragmentu $[M-C(CH_3)_3]^+$ o m/z 526 pro SO-Cys-(TBDMS)₃ a m/z 560 pro SO-His-(TBDMS)₃. Na druhou stranu v hmotnostním spektru vzniklém fragmentací derivátu SO-Lys-

(TBDMS)₃ vznikaly jen velmi málo intenzivní [M-C(CH₃)₃]⁺ fragmenty (*m/z* 551), ale byl v něm patrný velmi intenzivní fragment o *m/z* 463, který odpovídal fragmentu [M-CH₂OTBDMS]⁺ a který byl specifický pro regioizomer 3. Druhý regioizomer 4 byl identifikován podle jiného specifického a velmi intenzivního fragmentu [M-CHPhOTBDMS]⁺ o *m/z* 387 (Obrázek 11). Pro srovnání byla též provedena GC/MS analýza hydrolyzátu kontrolního globinu (Obrázek 12). Dle očekávání nebyly v tomto materiálu detekovány žádné píky odpovídající aduktům SO.

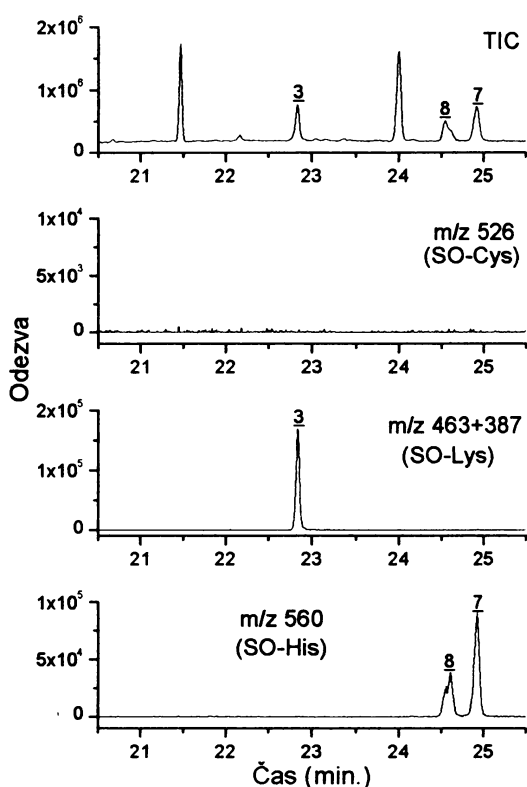
Obrázek 12. GC/MS analýza pronázového hydrolyzátu vzorku kontrolního globinu po derivatizaci činidlem MTBSTFA. TIC: celkový iontový proud; výběr iontů o *m/z* 526: pokus o detekci aduktů SO-Cys; výběr iontů o *m/z* (463+387): pokus o detekci aduktů SO-Lys; výběr iontů o *m/z* 560: pokus o detekci aduktů SO-His.



Kromě enzymatické hydrolyzy pronázou jsem vzorky SO-Gb 100:1 podrobil i klasické kyselé hydrolyze, při které dochází k úplné hydrolyze vzorku v prostředí 6 M HCl při 110 °C, po dobu 24 h (Fountoulakis, 1998). Hydrolyzát lidského globinu inkubovaného *in vitro* se 100-násobným molárním nadbytkem racemického SO byl vysušen, silylovan a výsledné TBDMS deriváty byly analyzovány metodou GC/MS na stejné koloně a za stejných podmínek jako byl analyzován enzymatický hydrolyzát (obrázek 13). Stejným způsobem byl zpracován a analyzován i hydrolyzát lidského

kontrolního globinu. Dle očekávání nebyly v hydrolyzátu kontrolního globinu detekovány žádné píky odpovídající aduktům SO.

Obrázek 13. GC/MS analýza hydrolyzátu vzorku SO-Gb 100:1 po hydrolyze 6 M HCl a po derivatizaci činidlem MTBSTFA. TIC: celkový iontový proud; výběr iontů o m/z 526: detekce aduktů SO-Cys; výběr iontů o m/z (463+387): detekce aduktů SO-Lys; výběr iontů o m/z 560: detekce aduktů SO-His.



V hydrolyzátu vzorku SO-Gb 100:1 podrobeném kyselé hydrolyze byly detekovány pouze některé regioizomery aduktů SO-Lys a SO-His, ale žádné adukty SO-Cys v něm detekovány nebyly. Dá se z toho usoudit, že během hydrolyzy v silně kyselém prostředí došlo k totální destrukci aduktů SO-Cys, pravděpodobně proto, že oba dva regioizomery aduktů SO-Cys (1 a 2) jsou organickými thioethery, které jsou přirozeně nestabilní v silně kyselém prostředí. Hypotéza, že adukty SO-Cys podléhají degradaci v prostředí 6 M HCl byla testována na standardech aduktů SO-Cys, které byly podrobeny simulované hydrolyze 6 M HCl při 110 °C. Analýzou výsledné směsi jsem v ní prokázal postupný úbytek výchozích sloučenin a výskyt degradačních produktů (cysteinu a styrenglykolu). Z tohoto důvodu byl ve všech pozdějších

pokusech lidský globin hydrolyzován výhradně enzymaticky, protože jedině tak bylo možno v hydrolyzátu současně stanovit adukty SO-Cys vedle aduktů SO-Lys a SO-His.

Výtěžky enzymatické hydrolyzy pronázou nebyly stanoveny, protože skutečný obsah aduktů SO v testovaných vzorcích SO-Gb nebyl předem znám. Ve studii Mráze a spol. (2004) byla enzymatická hydrolyza pronázou používána jako zcela kvantitativní, štěpící všechny peptidové vazby přítomné v globinu. V jiné studii (D'Aniello, 1993) byla enzymatická hydrolyza použita ke stanovení kyseliny asparagové v zubním dentinu. Pokud by ale bylo někdy v budoucích studiích zapotřebí stanovit výhradně adukty SO-His či SO-Lys, pak by byla klasická kyselá hydrolyza vhodnou alternativou k enzymatické hydrolyze.

Z obrázku 11 je zřejmé, že metodou GC/MS byly jako hlavní regioizomery aduktů SO ve studovaném globinu detekovány sloučeniny 1, 3 a 8. Protože se dá předpokládat, že vzájemný relativní poměr regioizomerů aduktů SO vzniklých v lidském globinu inkubovaném s vysokými dávkami SO nebo získaném z laboratorních zvířat vystavených styrenu *in vivo* bude velmi podobný, tak v dalších studiích byl stanoven obsah regioizomerů 1, 3 a 8. Žádný z těchto regioizomerů nebyl detekován v kontrolním globinu.

Kalibrační křivky byly sestaveny za pomoci příslušných standardů aduktů SO. Standardy aduktů SO použité zde pro kalibraci ovšem nebyly dostupné v dostatečném množství jako samotné regioizomery, neboť jejich příprava ve větším množství pomocí semi-preparativní HPLC by byla příliš drahá, ale byly dostupné jako směs regioizomerů aduktů SO v jistém, stále konstantním poměru. Tzn. v případě standardu SO-Cys šlo o směs 1 a 2, podobně u standardu SO-Lys se jednalo o směs 3 a 4 či u standardu SO-His o směs 5-8. Regioizomerické složení aduktů SO-Cys, SO-Lys a SO-His ve standardech bylo určeno metodou HPLC-UV (detekce při 220 nm). Díky tomu, že molární absorpční koeficienty (ϵ) jednotlivých regioizomerů aduktů SO byly při 220 nm prakticky shodné, dal se z ploch píků zjistit i hmotnostní poměr regioizomerů v použitém standardu. Zjištěné složení jednotlivých standardů aduktů SO bylo u standardu SO-Cys 3:1 (1:2), u standardu SO-Lys 1,3:1 (3:4) a u standardu SO-His 1:5:18:28 (5:6:7:8), jak je již uvedeno v experimentální sekci.

Podobně bylo zacházeno i s deuterovanými adukty SO, pokud byly používány jako vnitřní standardy. Hmotnostní poměr jednotlivých regioizomerů v těchto standardech byl zjištěn metodou HPLC-UV (detekce při 220 nm). Pro adukty SO-

Cys-*d8* činil 3:1 (1-d8:2-d8) a pro adukty SO-His-*d8* činil 1:6:19:28 (5-d8:6-d8:7-d8:8-d8).

5.3.2. Stanovení aduktů SO v SO-modifikovaném lidském globinu metodou GC/MS

Kvantitativní analýza regioizomerů 1, 3 a 8 v hydrolyzátu SO-Gb byla provedena metodou GC/MS. Hmotnostní detektor pracoval v módu SIM. Takto byly monitorovány plochy píků odpovídající nejintenzivnějším fragmentům jednotlivých regioizomerů. 1-d8 byl použit jako vnitřní standard ke stanovení nejen 1, ale i 3, neboť pro sloučeninu Nε-(21HPE)lysin nebyl k dispozici její deuterovaný analog. 8-d8 byl pak použit jako vnitřní standard ke stanovení regioizomeru 8.

Za účelem vytvoření kalibrační křivky byl kontrolní globin spikován různým množstvím standardů aduktů SO (testované rozmezí každého aduktu SO v jednom vzorku činilo 0 až 500 nmol). Ke vzorku spikovaného kontrolního globinu bylo přidáno vždy stejné množství vnitřního standardu (v množství 50 nmol). Byla vynesena závislost poměru plochy píku analyzovaného regioizomeru a píku jeho vnitřního standardu v závislosti na množství daného regioizomeru. Jednotlivé vzorky byly třikrát opakovaně změřeny. Všechny získané kalibrační křivky vykazovaly lineární závislost s koeficienty korelace R^2 : 0,998 pro 1, 0,997 pro 3 a 0,999 pro 8. Zjištěné hladiny nejvýznamnějších regioizomerů aduktů SO ve vzorcích SO-Gb 100:1 a SO-Gb 10:1 jsou prezentovány v tabulce 9 (Jágr, 2007b).

Tabulka 9. Hladiny vybraných aduktů SO ve vzorcích lidského globinu inkubovaného *in vitro* s racemickým SO.

Adukt	Hladina aduktů (μ mol/g globinu)	
	SO-Gb 10:1	SO-Gb 100:1
S-(21HPE)cystein: <u>1</u>	5	12
Nε-(21HPE)lysin: <u>3</u>	13	39
Nτ-(22HPE)histidin: <u>8</u>	48	149

Hodnoty uvedené v tabulce 9 vyjadřují výhradně obsah tří nejvýznamnějších regioizomerů aduktů SO v SO-modifikovaném lidském globinu. Skutečná celková hladina všech aduktů SO v analyzovaném globinu bude tedy větší, odhadem více než

dvojnásobně. Je tedy zřejmé, že velká část vazebných míst v analyzovaných vzorcích SO-Gb byla obsazena molekulami SO. Hladina aduktů SO ve vzorku SO-Gb 10:1 byla zhruba 3-krát menší než ve vzorku SO-Gb 100:1. Z toho vyplývá, že už při inkubaci globinu s relativně menším množstvím SO bylo prakticky dosaženo nasycení vazebné kapacity globinu.

Je jasné, že v reálných vzorcích globinu získaných z laboratorních zvířat či od lidí exponovaných styrenu *in vivo* budou hladiny aduktů SO mnohem menší, zhruba cca o 4 až 6 řádů. Tak např. hladina aduktů SO-Cys zjištěná metodou Ra-Ni byla řádově na úrovni nmol/g proteinu (Yeowell-O'Connell, 1996a), zatímco aduktů SO-Val bylo zjištěno mnohem méně: desítky až jednotky pmol/g globinu (Christakopoulos, 1993). Takto nízké hladiny aduktů nejsou měřitelné analytickou metodou popsanou v kapitole 4.7. Další úsilí bylo tedy věnováno zvýšení citlivosti analytického postupu tak, aby bylo jím bylo možno stanovit i mnohem nižší hladiny aduktů SO-Cys, SO-Lys a SO-His, zhruba na úrovni jednotek nmol/g globinu.

Zajímavé je porovnání vzájemného obsahu aduktů SO zjištěného různými autory v různých šaržích lidském globinu. Podíl aduktů SO-Val zjištěný metodou MED činil cca 5,2 % z celkového obsahu aduktů SO navázaného na zkoumaný vzorek globinu (Philips, 1994). Obsah aduktů SO-Cys zjištěný metodou Ra-Ni byl stanoven na 5,8 % (Ting, 1990). Obsah aduktů SO-Asp a SO-Glu činil 15 % (Sepai, 1993). Ačkoliv uvedené údaje lze jen těžko vzájemně korektně porovnávat, tak po shrnutí všech těchto údajů se zdá, že velmi významná část aduktů SO v globinu připadá na adukty s jinými aminokyselinami, zejména s His a v menší míře i s Lys (Kaur, 1989; Hemminki, 1986). To je v souladu s pozorováními učiněnými v mých studiích (Jágr, 2005a, 2005b, 2006b a 2006c). Proto byla v této práci největší pozornost věnována právě těmto aduktům. Za zmínku zde stojí i to, že v sérovém albuminu byla naprostá většina (76,4 %) přítomných aduktů SO tvořena adukty SO-Cys (Rappaport, 1993). Tak vysoký relativní obsah cysteinových aduktů se dá vysvětlit mnohem vyšším obsahem cysteinu v Alb ve srovnání s globinem.

5.4. Vývoj metody SPE vhodné k obohacení proteinového hydrolyzátu o adukty SO

Analytická metoda zmíněná v předchozí kapitole byla vhodná jen ke stanovení aduktů SO v takovém materiálu, který jich obsahoval dostatečné množství (např. v

lidském globinu inkubovaném *in vitro* se 100-násobným molárním nadbytkem SO dosahovala hladina těchto aduktů úrovně jednotek až desítek $\mu\text{mol/g}$ globinu).

Laboratorní zvířata i lidé (typicky pracovníci průmyslových provozů) jsou ale *in vivo* exponováni takovému množství styrenu a SO, že výsledné hladiny vytvořených aduktů SO jsou poměrně nízké (řádově nmol-pmol/g globinu). Takto nízké hladiny leží na hranici citlivosti většiny současných běžných analytických metod a přístrojů. Proto bylo nutno vypracovat mnohem citlivější analytickou metodu, aby se dala tato metoda použít i ke stanovení aduktů SO v praxi u reálných vzorků.

Jako vhodné řešení ke zvýšení citlivosti analytické metody se jevil zařazení dalšího kroku do dosavadního analytického postupu. Tento krok by vycházel z využití prekoncentrace aduktů SO na SPE kolonkách. Díky tomu by se relativní obsah těchto aduktů ve vzorcích mnohonásobně zvýšil, takže by se tímto způsobem dala stanovit i mnohem menší, až stopová množství aduktů SO v biologickém materiálu a současně by došlo k eliminaci nežádoucích nadbytečných volných aminokyselin.

V dalších kapitolách je popsán celý postup vývoje příslušné SPE metody, s počátky v hledání SPE kolonek naplněných vhodným sorbentem, po optimalizaci extrakčního postupu, až po konečné využití této metody ke stanovení aduktů SO v SO-modifikovaném lidském globinu.

Princip vývoje vhodného postupu extrakce na SPE kolonkách byl založen na rozdílné polaritě aduktů SO ve srovnání s ostatními aminokyselinami. Adukty styren-7,8-oxidu s aminokyselinami cysteinem, histidinem a lysinem se vyznačují relativně nižší polaritou ve srovnání s většinou ostatních aminokyselin přítomných v proteinech. Tyto adukty obsahují ve své molekule aromatické jádro. Při HPLC analýze těchto aduktů na kolonkách s nepolárními fázemi se ukázalo, že adukty SO jsou poměrně silně vázány na stacionární fázi kolony, zatímco naprostá většina ostatních aminokyselin (kromě některých aromatických aminokyselin, jako Phe a Trp) na nepolární stacionární fázi zachycována není. Předpokládal jsem, že tyto vlastnosti charakteristické pro adukty SO by se daly využít ve prospěch jejich separace od ostatních aminokyselin. Z praktického hlediska se k tomu účelu hodí extrakce na SPE kolonkách mnohem více, než zdoluhavá a drahá preparativní HPLC.

Při extrakci aduktů SO na SPE kolonkách by došlo k selektivnímu zachycení aduktů na nepolárním sorbentu, zatímco naprostá většina ostatních aminokyselin by na tomto sorbentu zachycena nebyla. Takto zachycené adukty by pak byly ze SPE kolonek vymyty elučním činidlem a poté zakoncentrovány do velmi malého objemu.

Tímto způsobem by došlo k mnohonásobnému zakoncentrování aduktů, takže jejich původně relativně velmi nízký obsah v hydrolyzátu by stoupl na vyšší hodnoty, které by se daly dostupnými analytickými přístroji snáze stanovit.

5.4.1. Výběr nejvhodnějšího sorbentu

V prvním kroku bylo nutno vyzkoušet SPE kolonky nabízené různými výrobci, které jsou dostupné na trhu. SPE kolonky se liší zejména druhem sorbentu, dále se mohou lišit průměrem částic sorbentu, množstvím sorbentu přítomného v jedné kolonce a objemem kolonky. Největší vliv na chemismus separace má především druh sorbentu.

Na začátku experimentování s SPE kolonkami tedy bylo nutno najít takový SPE sorbent, který by byl vhodný k extrakci aduktů SO. Přehled vyzkoušených různých typů SPE sorbentů je uveden v tabulce 5.

Účinnost extrakce aduktů na SPE kolonkách byla testována na modelovém hydrolyzátu aminokyselin a aduktů („MH“), která simulovala skutečné složení hydrolyzátu globinu. Takto vytvořená směs má oproti skutečnému hydrolyzátu tu výhodu, že ji lze kdykoliv přesně reprodukovat v libovolném množství namícháním ze standardních roztoků a její složení nezávisí na podmínkách hydrolyzy. Je známo, že v lidském i zvířecím globinu se sice vyskytuje všech dvacet základních proteinogenních aminokyselin, zato ale každá v různém množství. V lidském globinu jsou nejhojněji zastoupeny tyto aminokyseliny: Val, Ala, Leu, Ser, Thr, Asp, Glu, His a Lys, které jsem proto všechny zahrnul do „MH“. K těmto aminokyselinám, které se vyznačují celou škálou možných chemických vlastností (jsou mezi nimi alifatické, kyselé i zásadité aminokyseliny), jsem do „MH“ přidal i aromatické aminokyseliny, jako je Phe, Tyr a Trp, které jsou v globinu sice méně zastoupené, ale mají chemické vlastnosti podobné aduktům styren-7,8-oxidu. Množství ostatních aminokyselin je v globinu prakticky zanedbatelné a proto tyto aminokyseliny nebyly brány v úvahu a do „MH“ zahrnuty nebyly. Složení „MH“ je popsáno v experimentální části práce.

Poté bylo přistoupeno k vlastnímu testování SPE kolonek. Přesný postup testování je uveden v experimentální sekci. V tabulce 10 jsou uvedeny výsledky testování výtěžků extrakce jednotlivých regioizomerů aduktů SO přítomných v modelové směsi „MH“ na různých SPE sorbentech. Plochy píků výše zmíněných aduktů, které byly korigovány na plochu píku vnitřního standardu (norleucin), jsou uvedeny v % a jsou mírou množství aduktu zachyceného na SPE kolonce a posléze uvolněného při eluci

„elučním činidlem“. Plochy píků získané analýzou kontrolních vzorků jsou zde dány jako 100 %.

Z tabulky 10 je patrné, že na deseti z celkem třinácti testovaných kolonkách nedocházelo k významné retenci aduktů SO a výtěžek extrakce byl tedy velmi nízký a naprosto nevyhovující (výtěžky byly nižší než 4,5 %). Aduktů SO se na sorbentech těchto kolonek nezachycovaly, nebo jen velmi málo a tudíž byly z těchto kolonek velmi rychle pouhou vodou vymývány. Pouze tři kolonky, jmenovitě Strata-X a Strata SDB-L od fy. Phenomenex a Oasis-HLB od fy. Waters, prokázaly u aduktů SO výbornou retenční schopnost (výtěžky min. 45 %, ale i více). Sorbent těchto kolonek měl navíc tu výhodnou vlastnost, že naprostá většina ostatních aminokyselin (zde reprezentovaná alaninem), na něm zachycována nebyla. Kromě aduktů SO byla na těchto kolonkách pozorována mírná retence jen u dvou aromatických aminokyselin a to u fenylalaninu a tryptofanu.

Tabulka 10. Výtěžek aduktů SO a některých vybraných aminokyselin na testovaných SPE kolonkách (v %).

SPE kolonka	SO-Cys: <u>1</u>	SO-His: <u>8</u>	SO-Lys: <u>3</u>	Ala	Tyr	Phe	Trp
Strata C-18	3,5	4,2	4,5	< 0,1	< 0,1	1,3	2,5
Strata C-8	0,3	0,4	0,4	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,2
Strata Ph	0,5	1,6	1,7	0,2	0,3	0,5	0,9
Strata NH ₂	0,3	0,9	1,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Strata CN	0,2	< 0,1	0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Strata-X	53,4	67,2	83,6	0,5	1,1	5,8	23,5
Strata SDB-L	45,0	64,9	76,3	0,3	1,0	4,6	19,6
Oasis-HLB	51,2	66,9	78,3	0,4	1,2	5,2	24,1
Discovery DSC C-18	1,2	1,5	1,6	< 0,1	< 0,1	0,4	0,9
Discovery DSC C-8	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,1	< 0,1	< 0,2	< 0,2
Discovery DSC Ph	0,3	0,5	0,5	< 0,2	< 0,2	< 0,2	< 0,2
Discovery DSC NH ₂	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1
Discovery DSC CN	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1	< 0,1

V této fázi testování se předběžně ukázalo, že myšlenka obohacení hydrolyzátu o adukty SO na SPE kolonkách je proveditelná. Protože SPE kolonky se třemi sorbenty nejlepších vlastností vykazaly navzájem prakticky shodné extrakční schopnosti, byla další optimalizace postupu provedena jen na sorbentu Strata-X.

Konkurenční kolonky Oasis-HLB nebyly k dalšímu testování vybrány, protože byly cca o 25 % dražší. Kolonky Strata-SDB-L jsou zase považovány za předchozí generaci kolonek Strata-X.

5.4.2. Optimalizace metody SPE

Jako následný krok optimalizace extrakčního postupu bylo třeba dále prozkoumat vlastní průběh postupu extrakce a tento postup optimalizovat. Byl prostudován průběh vylučování aminokyselin a aduktů SO z kolonek Strata-X během jejich promývání vodou, dále byl zjištěn optimální objem vody vhodný pro promytí kolonek a optimální objem a koncentrace extrahovaného vzorku „MH“.

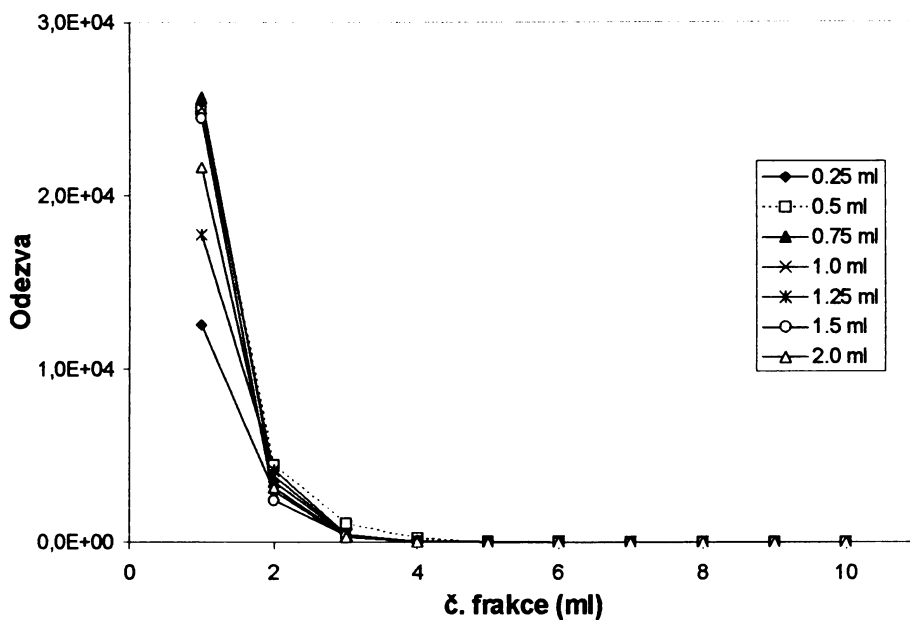
5.4.2.1. Studium průběhu extrakce a optimalizace objemu vzorku

Byl testován průběh vylučování vybraných aminokyselin a aduktů při promývání kolonek vodou. Výsledky tohoto testování jsou uvedeny na následujících obrázcích 14 až 19. Jednotlivé frakce, které jsou na obrázcích 14 až 19 označené čísly 1-7 odpovídají tomu, co zůstalo zachyceno na kolonce po promytí příslušným objemem vody (1-7 ml), a bylo z kolonky eluováno pomocí 3 ml „elučního činidla“. Frakce označené čísly 8-10 odpovídají tomu, co zůstalo zachyceno na kolonce po jejím promytí 7 ml vody následovaném promytím 1 až 3 ml „elučního činidla“ a nakonec bylo z kolonky eluováno pomocí 3 ml „elučního činidla“.

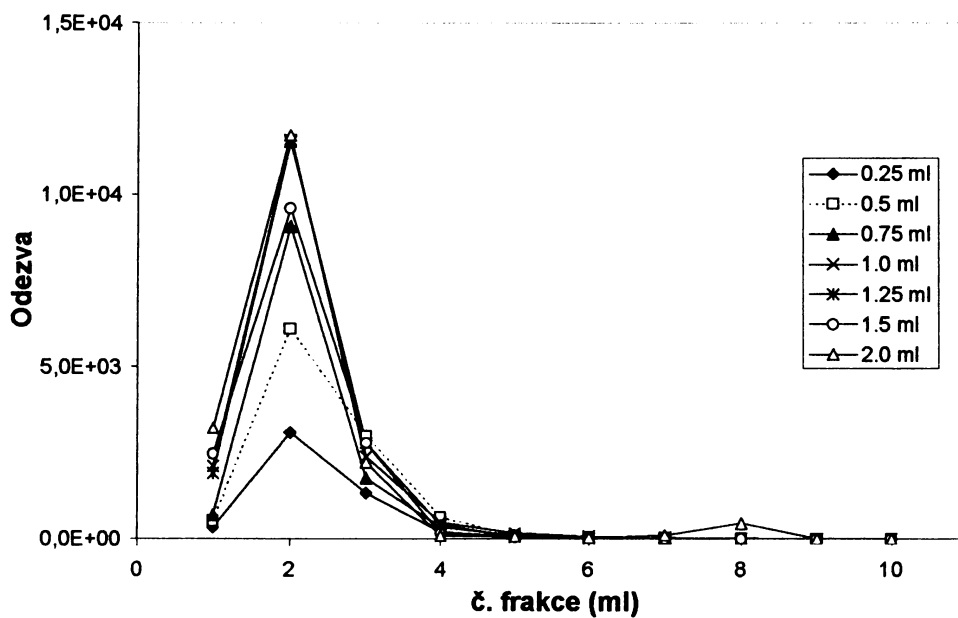
Legendy na obrázcích 14 až 19 znázorňují objem vzorku modelové směsi „MH“ o koncentraci 1 mg/ml, který byl před promýváním nanesen na SPE kolonku.

Na obrázcích 14-16 je zachycen průběh vylučování tří aromatických aminokyselin tyrosinu, fenylalaninu a tryptofanu. Z obrázků je zřejmé, že zatímco téměř všechen tyrosin ze vzorku opustí kolonku v prvních dvou frakcích, fenylalanin je ze stejné kolonky vymyt o něco málo později (má maximum vylučování ve frakci č. 2). Tryptofan je ze všech testovaných aminokyselin na sorbentu zachycován nejsilněji. Eluuje zejména ve frakcích č. 5-7. Ostatní, zde na obrázcích neuvedené aminokyseliny, jako jsou Ala, Leu, Val, Ser, Thr, Asp, Glu, His a Lys, jsou z kolonek vylučovány prakticky shodně jako Tyr, tedy opouští kolonku ve frakcích č. 1-2, tj. během prvních dvou mililitrů promývání kolonek vodou.

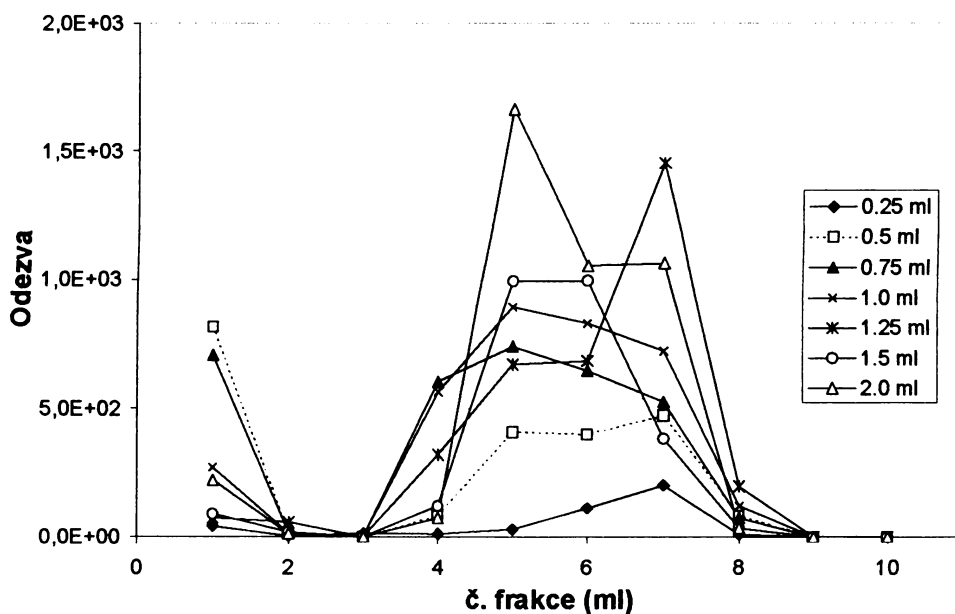
Obrázek 14. Průběh vylučování tyrosinu z SPE kolonek Strata X.



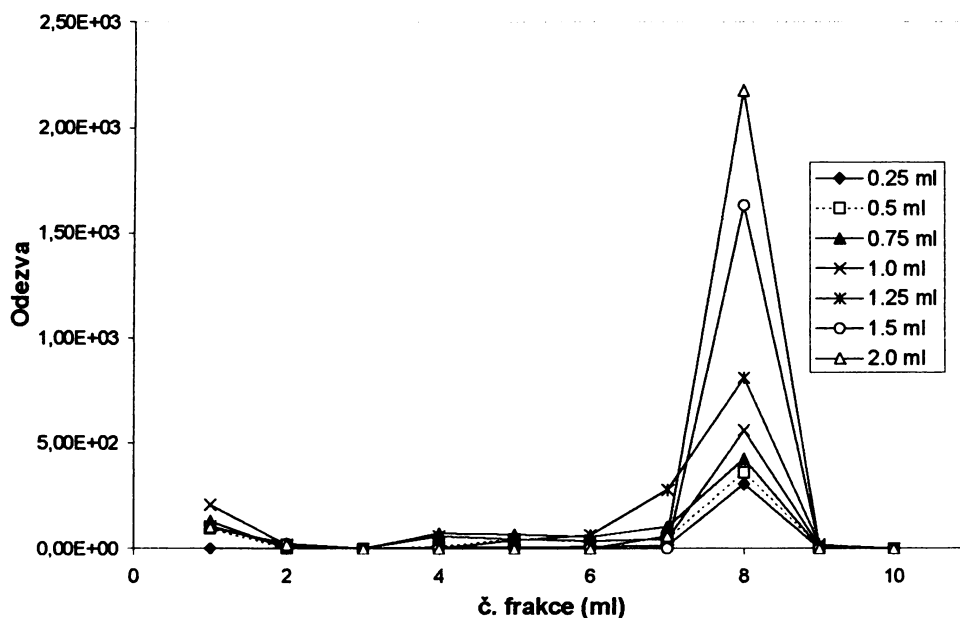
Obrázek 15. Průběh vylučování fenylalaninu z SPE kolonek Strata X.



Obrázek 16. Průběh vylučování tryptofanu z SPE kolonek Strata X.



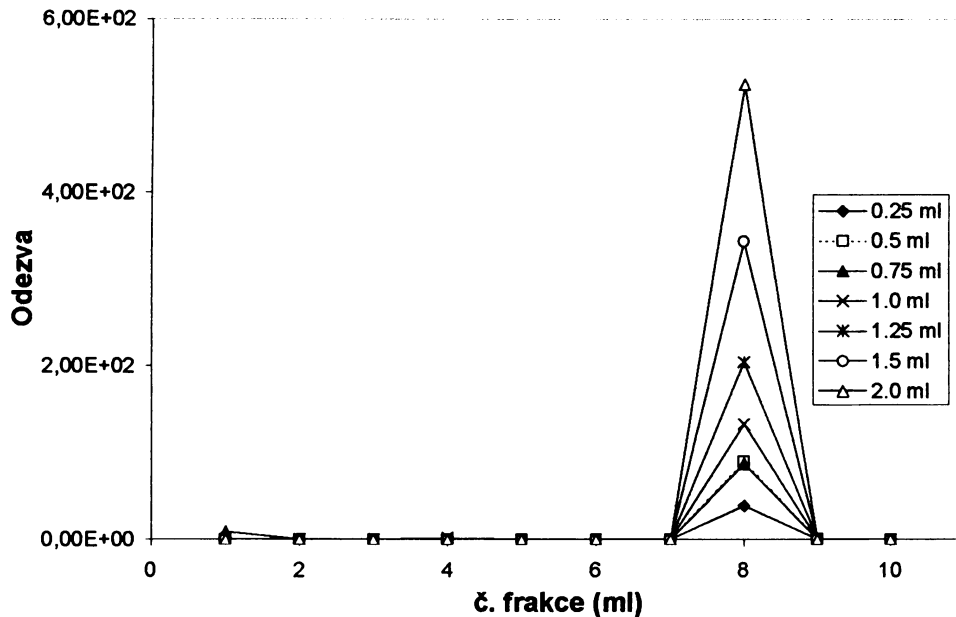
Obrázek 17. Průběh vylučování S-(21HPE)cysteinu z SPE kolonek Strata X.



Z průběhu vylučování tří vybraných regioizomerů reprezentujících adukty SO, které jsou uvedeny na obrázcích 17-19, je patrné, že tyto adukty jsou poměrně silně

vázány na použitý sorbent a tím i odolné vůči vymývání vodou. To je pozitivní a důležité zjištění pro to, aby mohlo zakoncentrování aduktů SO z hydrolyzátu na SPE kolonkách vůbec fungovat.

Obrázek 18. Průběh vylučování Nε-(21HPE)lysinu z SPE kolonek Strata X.



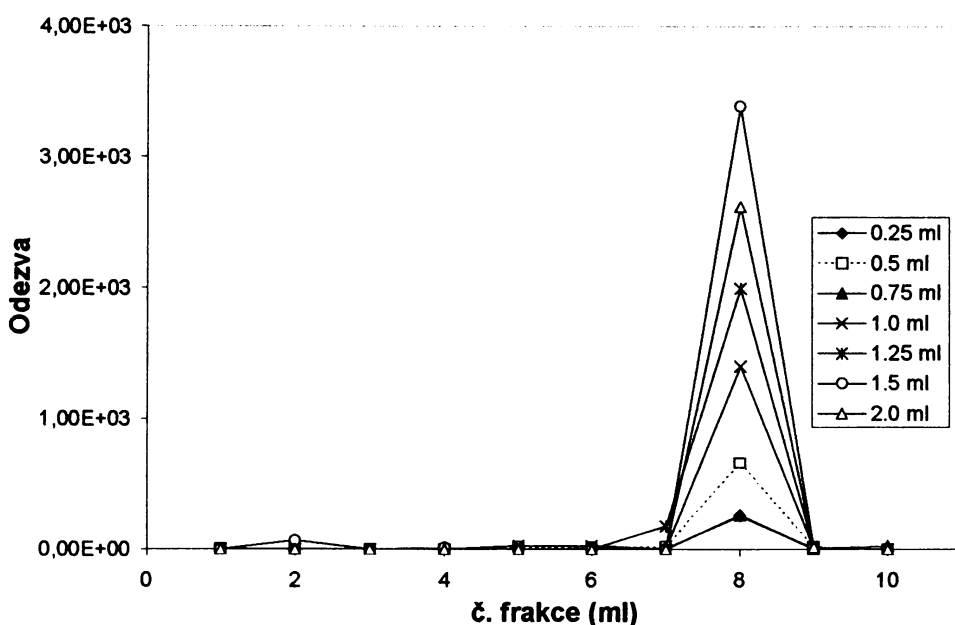
Regioizomery 3 a 8 jsou na sorbent vázány nejsilněji, neboť nejsou vodou z kolonek prakticky vůbec vymývány. Z kolonek se dají vymýt až „elučním činidlem“ (viz frakce č. 8-10).

Zato regioizomer 1 je na sorbent vázán o něco slaběji, začíná být z kolonky ve zjiitelném množství vymýván o něco dříve (cca od frakce č. 6), ale stále ještě později než tryptofan. Minoritní množství nezachyceného regioizomeru 1 bylo pozorováno i ve frakci č. 1. Zjistil jsem, že toto množství je v přímé proporci k objemu naneseného vzorku. Tento jev se dá zřejmě logicky vysvětlit tím, že pravděpodobně při vysokých použitých objemech a tím i při vyšším celkovém množství aminokyselin ve vzorku, dochází k nasycení vazebných míst sorbentu nadbytkem přítomných aminokyselin a aduktů a tím k jejich vzájemné kompetici o vazebná místa sorbentu. Tímto způsobem je dosaženo vazebných limitů sorbentu (výrobce udávaná maximální vazebná kapacita použitého sorbentu je cca 5-10 %, to

při hmotnosti 60 mg sorbentu v použitých kolonkách znamená, že je schopna navázat celkem maximálně 3 až 6 mg látky).

Při zkoumání průběhu vylučování vybraných aminokyselin a aduktů bylo zjištěno, že optimální objem vody potřebný pro promytí SPE kolonek o rozměrech 60 mg/3 ml leží někde v intervalu 3 až 7 ml vody. Promývání objemy menšími než 3 ml se ukazuje jako nedostačující k efektivnímu vymytí většiny alifatických aminokyselin.

Obrázek 19. Průběh vylučování N τ -(22HPE)histidinu z SPE kolonek Strata X.



5.4.2.2. Optimalizace objemu vody vhodného k promytí kolonek

V dalším kroku bylo zapotřebí zjistit, jaký je optimální objem vody (z intervalu 3-7 ml), vhodný k promytí kolonky. Při promývání kolonek vodou dochází k rychlému vymytí většiny alifatických a polárních aminokyselin, zatímco méně polární adukty SO zůstávají zachyceny na sorbentu. Tímto způsobem se lze tedy teoreticky zbavit většiny balastních aminokyselin a tak získat všechny adukty prakticky v původním množství a ve vysoké čistotě.

Nicméně tento předpoklad neplatí stoprocentně a při promývání SPE kolonek vodou může docházet i k částečnému uvolňování aduktů, i když v mnohem menší míře než k tomu dochází u aminokyselin. Proto bylo třeba najít co nejpříjemnější kompromis. Jako promývací činidlo byla testována voda v objemu od 3 do 7 ml. Po

promytí kolonek vodou jsem k eluci zachycených aduktů a ostatních látek použil vždy 3 ml „elučního činidla“. Toto množství bylo předem otestováno jako zcela dostačující k dosažení úplné eluce zachyceného materiálu z kolonek.

5.4.2.3. Optimalizace koncentrace aminokyselin ve vzorku

Bylo simulováno chování skutečného hydrolyzátu globinu během jeho extrakce na SPE kolonkách. Provádí-li se skutečná hydrolyza globinu, získá se takový roztok, ve kterém dosahuje celková koncentrace aminokyselin hodnoty cca 5,0-4,0 mg/ml.

U vzorků, jejichž testování bylo provedeno dle postupu popsaného v této a předchozí kapitole, byl stanoven procentuální výtěžek extrakce aromatických aminokyselin a aduktů SO jako poměr zachyceného množství aduktů vůči jeho množství v kontrolním vzorku (Tabulka 11 a 12).

Kontrolní vzorek měl stejné složení jako vzorek testovaný, ale na rozdíl od něho nebyl podroben extrakci na SPE kolonkách.

Z údajů uvedených v tabulce 11 je zřejmé, že s rostoucím objemem promytí kolonek vodou klesá množství zachycených aminokyselin. Tak po promytí kolonek 3 ml vody dojde k vymytí naprosté většiny (cca 99 %) Tyr, zatímco na kolonce zůstane stále zachyceno zhruba cca 10 % Phe a cca 33 % Trp.

Výtěžky prezentované v tabulce 12 lze považovat za dobré, zejména u regioizomeru 3 byl pozorován vynikající výtěžek, který byl vesměs vyšší než 90 %. U regioizomerů 1 a 8 bylo dosaženo o něco nižších výtěžků, což nemusí být v budoucích praktických aplikacích na závadu, jen s tím bude třeba počítat a danou ztrátu kompenzovat použitím vhodných vnitřních standardů.

Z tabulky 12 je též patrná mírná závislost výtěžků aduktů SO na objemu promývání. Pozoroval jsem mírné snížení výtěžku 1 se zvyšujícím se objemem vody použité k promytí kolonek, zatímco u silněji se vázajících regioizomerů 3 a 8 tato závislost z tabulky tolik patrná není.

Celkového nejvyššího výtěžku aduktů SO bylo dosaženo při promytí SPE kolonek 3 ml vody. Promývání kolonek většími objemy vody (více než 3 ml) tedy není kvůli způsobeným ztrátám na výtěžku aduktů SO příliš vhodné.

Tabulka 11. Stanovení výtěžku tyrosinu, fenylalaninu a tryptofanu na SPE Strata-X v závislosti na koncentraci a objemu vzorku a objemu vody použité k promytí.

Konc. vzorku (mg/ml)	Objem vzorku (ml)	Promytí (ml H ₂ O)	Výtěžek (%)		
			Tyr	Phe	Trp
1,0	1,0	3,0	1	6	23
1,0	1,0	5,0	2	3	17
1,0	1,0	7,0	1	7	4
1,0	2,0	3,0	1	6	17
1,0	2,0	5,0	0	1	13
1,0	2,0	7,0	0	1	4
1,0	3,0	3,0	0	3	24
1,0	3,0	5,0	0	1	12
1,0	3,0	7,0	0	1	3
1,0	4,0	3,0	0	2	12
1,0	4,0	5,0	0	1	9
1,0	4,0	7,0	0	0	1
2,0	0,5	3,0	4	11	18
2,0	0,5	5,0	2	6	17
2,0	0,5	7,0	1	4	12
2,0	1,0	3,0	3	8	17
2,0	1,0	5,0	1	3	21
2,0	1,0	7,0	0	1	10
2,0	1,5	3,0	1	7	29
2,0	1,5	5,0	0	2	24
2,0	1,5	7,0	0	1	7
2,0	2,0	3,0	1	4	29
2,0	2,0	5,0	0	2	22
2,0	2,0	7,0	0	1	9
2,0	2,5	3,0	1	4	23
2,0	2,5	5,0	0	1	14
2,0	2,5	7,0	0	1	5
4,0	0,25	3,0	3	6	20
4,0	0,25	5,0	3	3	12
4,0	0,25	7,0	1	1	5
4,0	0,5	3,0	3	7	22
4,0	0,5	5,0	4	2	15
4,0	0,5	7,0	0	1	6
4,0	0,75	3,0	4	6	15
4,0	0,75	5,0	1	1	22
4,0	0,75	7,0	0	1	9
4,0	1,0	3,0	2	6	37
4,0	1,0	5,0	1	2	23
4,0	1,0	7,0	0	1	12
4,0	1,25	3,0	1	4	35
4,0	1,25	5,0	0	2	14
4,0	1,25	7,0	0	0	5

Tabulka 12. Stanovení výtěžku regioizomerů aduktů 1, 3 a 8 na SPE Strata-X v závislosti na koncentraci a objemu vzorku a objemu vody použité k promytí.

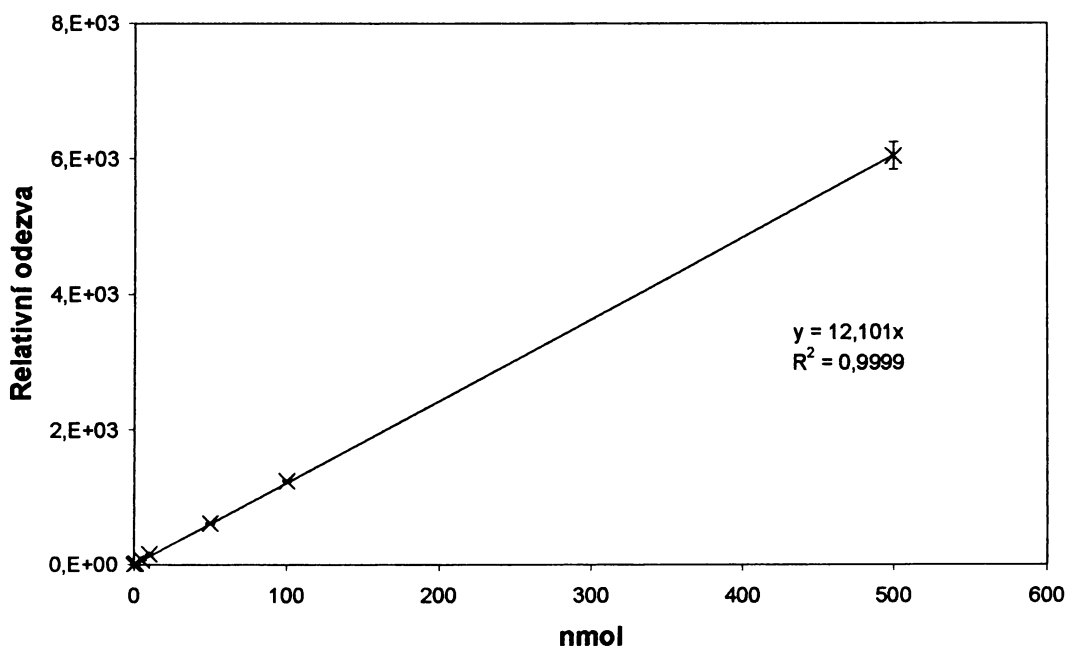
Konc. vzorku (mg/ml)	Objem vzorku (ml)	Promytí (ml H ₂ O)	Výtěžek		
			SO-Cys: <u>1</u>	SO-Lys: <u>3</u>	SO-His: <u>8</u>
1,0	1,0	3,0	43	98	93
1,0	1,0	5,0	32	85	59
1,0	1,0	7,0	20	86	49
1,0	2,0	3,0	39	86	71
1,0	2,0	5,0	49	93	39
1,0	2,0	7,0	28	85	64
1,0	3,0	3,0	53	90	83
1,0	3,0	5,0	55	85	75
1,0	3,0	7,0	17	83	85
1,0	4,0	3,0	25	88	93
1,0	4,0	5,0	32	84	77
1,0	4,0	7,0	18	85	73
2,0	0,5	3,0	26	92	61
2,0	0,5	5,0	24	104	87
2,0	0,5	7,0	32	98	64
2,0	1,0	3,0	30	99	85
2,0	1,0	5,0	41	92	56
2,0	1,0	7,0	43	96	85
2,0	1,5	3,0	51	93	91
2,0	1,5	5,0	59	98	83
2,0	1,5	7,0	43	82	43
2,0	2,0	3,0	61	96	70
2,0	2,0	5,0	50	88	64
2,0	2,0	7,0	49	92	47
2,0	2,5	3,0	60	80	25
2,0	2,5	5,0	51	82	49
2,0	2,5	7,0	40	80	50
4,0	0,25	3,0	40	30	22
4,0	0,25	5,0	34	26	10
4,0	0,25	7,0	30	20	12
4,0	0,5	3,0	42	66	22
4,0	0,5	5,0	37	77	24
4,0	0,5	7,0	38	19	14
4,0	0,75	3,0	56	69	17
4,0	0,75	5,0	55	74	21
4,0	0,75	7,0	47	66	22
4,0	1,0	3,0	60	88	49
4,0	1,0	5,0	62	88	45
4,0	1,0	7,0	55	89	48
4,0	1,25	3,0	80	108	74
4,0	1,25	5,0	58	84	63
4,0	1,25	7,0	54	76	35

V naměřených údajích nelze vypořádat významnou souvislost mezi výtěžkem aduktů a koncentrací aminokyselin ve vzorku „MH“. Dále jsem nepozoroval významný vliv objemu vzorku na výtěžky aduktů. Může to tedy znamenat, že buď tyto dva posledně uvedené parametry jsou méně kritické pro optimalizaci postupu nebo spíše, že jsem stále pracoval za podmínek optimálních pro použité kolonky.

5.4.3. Aplikace metody SPE na vzorky hydrolyzátu lidského globinu

Vyvinutý postup extrakce aduktů SO na SPE kolonkách popsáný v kapitole 5.4.2. bylo nutno následně ověřit na skutečném hydrolyzátu lidského globinu. Do enzymatického hydrolyzátu lidského kontrolního globinu bylo přidáno určité množství „standardního roztoku“ obsahujícího adukty SO (v rozmezí 0-500 nmol aduktu). Poté byla provedena extrakce těchto vzorků na SPE kolonkách Strata-X. Eluát byl zachycen, vysušen a pak byl do něho přidán vnitřní standard (norleucin). Po derivatizaci vzorků činidlem MTBSTFA byl obsah aduktů ve vzorku stanoven metodou GC-FID. Paralelně byly analyzovány samotné vzorky aduktů SO v rozmezí koncentrací 0-500 nmol, ze kterých byly sestaveny kalibrační křivky pro jednotlivé regioizomery aduktů SO (obrázky 20-22).

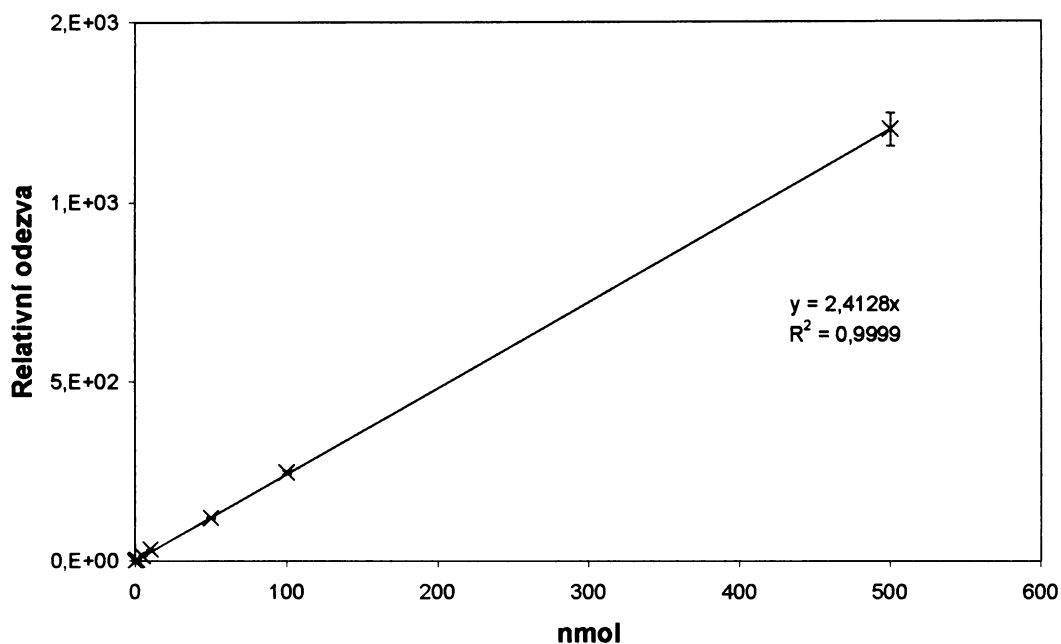
Obrázek 20. Kalibrační křivka pro S-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)cystein.



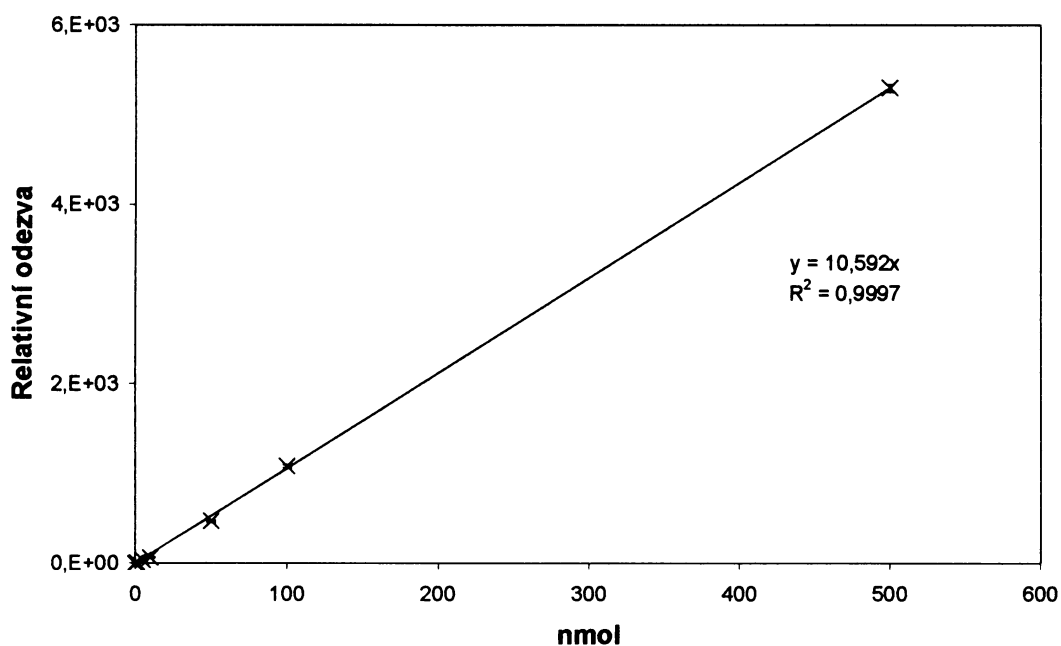
Všechny kalibrační křivky byly lineární, s korelačními koeficienty R^2 ležícími v intervalu 0,9997-0,9999. Relativní směrodatná odchylka (s_r) stanovení jednotlivých

kalibračních bodů byla menší než 1 % pro vzorky spikované 100 a 500 nmoly aduktů SO. Pro vzorky spikované 10 a 50 nmoly aduktů SO byla s_r menší než 2 %, zatímco pro vzorky spikované 1-5 nmoly aduktů SO byla s_r cca 1-10 %.

Obrázek 21. Kalibrační křivka pro Nε-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)lysin.



Obrázek 22. Kalibrační křivka pro Nτ-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)histidin.



Výtěžek extrakce aduktů SO ze vzorků hydrolyzátu SO-Gb byl stanoven pomocí těchto kalibračních křivek, přičemž výtěžek odpovídající 100 % byl vypočítán z plochy píků získaných analýzou samotných vzorků standardů aduktů SO, korigovaných na plochu píku vnitřního standardu, kterým byl norleucin (tabulka 13).

Tabulka 13. Výtěžek extrakce aduktů SO z hydrolyzátu lidského kontrolního globinu, spikovaného o adukty SO, na SPE kolonkách Strata-X.

Obsah aduktů ve vzorku (nmol/g)	Promytí (ml H ₂ O)	Výtěžek (%)		
		S-(21HPE)cystein	Nε-(21HPE)lysin	Nτ-(22HPE)histidin
500	3	55	99	71
500	5	33	95	75
500	7	26	98	69
100	3	57	98	75
100	5	31	87	66
100	7	24	104	67
50	3	55	89	72
50	5	36	99	67
50	7	23	98	67
10	3	53	86	75
10	5	38	92	69
10	7	30	98	76
5	3	53	86	71
5	5	38	92	65
5	7	30	102	86
1	3	58	89	66
1	5	39	94	78
1	7	27	97	65

Výtěžky extrakce jsou pro Nε-(21HPE)lysin velmi dobré, leží v rozmezí 86-104 %. O něco nižší výtěžky extrakce byly dosaženy u Nτ-(22HPE)histidinu (65-86 %). Méně uspokojivé jsou pozorované výtěžky pro S-(21HPE)cystein, které dosahovaly jen cca 23-58 %. U S-(21HPE)cysteinu byla navíc pozorována závislost výtěžku na objemu vody, kterým byla kolonka promyta. Čím vyšším objemem vody byla SPE kolonka promyta, tím nižší výtěžek S-(21HPE)cysteinu byl pozorován. Tento jev je pravděpodobně způsoben nedostatečnou retencí aduktů SO-Cys na sorbentu Strata-X

a částečným vymýváním aduktů SO-Cys vodou. Na druhou stranu byly regioizomery N τ -(22HPE)histidin a zejména N ϵ -(21HPE)lysin odolné vůči vymývání vodou, takže nedocházelo k jejich významným ztrátám.

Z výsledků testování uvedených v kapitolách 5.4.2. a 5.4.3. byl vypracován optimální postup extrakce hydrolyzátu globinu na SPE kolonkách Strata-X o velikosti 60 mg/3 ml, který nabývá následující podoby: kolonka je nejprve kondicionována 2 × 1 ml methanolu a posléze 2 × 1 ml vody. Poté je na ni nanesen 1 ml vzorku (např. hydrolyzátu proteinu) o koncentraci 5 mg/ml. Po adsorpci vzorku je kolonka promyta 3 ml vody, následně sušena po dobu 30 sekund za působení vakua a zachycené adukty SO jsou eluovány 3 ml „elučního činidla“ o složení: MeOH/acetonitril/0,1 % trifluoroctová kys., 45/45/10, v/v/v. Do sebraného eluátu je přidán vnitřní standard, vzorek je vysušen a po derivatizaci analyzován plynovou chromatografií (Jágr, 2007a).

Výše uvedený postup extrakce lze jednoduše modifikovat i pro práci s SPE kolonkami s vyšším množstvím sorbentu tak, že se zvýší objemy všech použitých činidel úměrně podle množství sorbentu přítomného v kolonce. Tak např. SPE kolonky Giga Tubes o velikosti 1 g/12 ml obsahují 1000 mg sorbentu, kterého mají tedy cca 16,6 × více než SPE kolonky o velikosti 60 mg/3 ml. Tudíž při práci s těmito kolonkami Giga Tubes byly použity objemy 16 × větší. Tyto kolonky tedy bylo nutno nejprve kondicionovat 2 × 16 ml methanolu a posléze 2 × 16 ml vody. Po nanesení 16 ml vzorku a jeho vsáknutí byly kolonky promyty 48 ml vody. Adukty byly následně eluovány 48 ml „elučního činidla“.

5.4.4. Stanovení aduktů SO v SO-modifikovaném lidském globinu metodou SPE-GC-FID

Vzhledem k nízkému obsahu aduktů SO ve vzorcích SO-Gb (*R*)-SO 0,625:1 a SO-Gb (*S*)-SO 0,625:1, bylo nutno provést extrakci aduktů SO z hydrolyzátu vzniklého rozkladem 80 mg vzorku. Extrakce aduktů SO byla provedena na co možná největších, komerčně dostupných SPE kolonkách. Použity byly SPE kolonky Strata-X Giga Tubes o velikosti 1 g/12 ml. Na těchto kolonkách byla provedena extrakce 16 ml enzymatického hydrolyzátu různých vzorků SO-Gb. Koncentrace aminokyselin v hydrolyzátu byla cca 5 mg/ml. Tyto vzorky nebyly spikovány „standardním roztokem“ obsahujícím adukty SO, ale adukty SO v nich byly přímo stanoveny metodou GC/FID. Stanovení aduktů SO ve vzorcích bylo provedeno s korekcí ploch

aduktů na plochu vnitřního standardu (norleucin) a s využitím kalibračních křivek zveřejněných v kapitole 5.4.3. Vypočítané hodnoty byly dále korigovány na průměrné výtěžky aduktů SO, zjištěné v předchozím oddíle. Počítalo se s průměrnými výtěžky S-(21HPE)cysteinu cca 50 %, Nε-(21HPE)lysinu cca 90 % a Nτ-(22HPE)histidinu cca 70 % (tabulka 13). Hladiny aduktů SO stanovené tímto způsobem ve vzorcích SO-Gb jsou uvedeny v tabulce 14 (Jágr, 2007b).

Tabulka 14. Hladina aduktů SO ve vzorcích globulinů inkubovaných s SO *in vitro*.

Vzorek globulinu	Hladina aduktů (μ mol/g globulinu)		
	S-(21HPE)cystein	Nε-(21HPE)lysin	Nτ-(22HPE)histidin
SO-Gb 100:1	10,5	34,7	135
SO-Gb 10:1	5,80	11,0	39,3
SO-Gb (R)-SO 0,625:1	0,59	0,85	1,98
SO-Gb (S)-SO 0,625:1	0,42	0,83	1,30

Hladiny aduktů SO ve vzorcích SO-Gb 100:1 a SO-Gb 10:1 již byly předtím stanoveny jinou metodou (GC/MS) s využitím deuterovaných standardů aduktů SO jako vnitřních standardů (kapitola 5.3.2., tabulka 9). Zajímavé je porovnání kvantitativních údajů uvedených v obou tabulkách, které byly získány dvěma na sobě nezávislými metodami. Hodnoty, získané na tomtéž materiálu, si jsou velmi podobné a navzájem se podporují, což svědčí o správnosti obou postupů. Metodou SPE-GC-FID byly navíc analyzovány vzorky globulinu inkubované *in vitro* s relativně nižším nadbytkem SO (vzorky SO-Gb (R)-SO 0,625:1 a SO-Gb (S)-SO 0,625:1). Zjištěné hladiny aduktů SO v tomto materiálu byly proto přirozeně nižší, zhruba na úrovni 0,4-2,0 μ mol/g globulinu. V globulinu exponovaném (R)-SO byl nalezen o něco vyšší obsah aduktů než v globulinu exponovaném (S)-SO.

Citlivost použité metody GC-FID byla cca 0,1 nmol aduktů SO na nástřik. Pokud by toto množství aduktů bylo vyizolováno ze 100 mg globulinu, pak by uvedená metoda byla schopna detekovat adukty SO v globulinu, kde by jejich hladina byla zhruba cca 1 nmol/g globulinu.

Předpokládám, že při nahrazení metody GC s FID detekcí mnohem citlivějšími analytickými technikami (GC/MS či LC/MS/MS) by došlo ke zlepšení citlivosti detekce o jeden až dva řády. V tomto případě by analytickým postupem využívajícím

spojení extrakce aduktů SO na SPE kolonkách s jejich následnou detekcí velmi citlivými hmotnostními technikami mohly být detekovány nebo stanoveny adukty SO v biologickém materiálu, kde by jejich obsah byl na úrovni cca 10-100 pmol/g globinu.

Pro srovnání Yeowell-O'Connell a spol. (1996a) stanovili v sérovém albuminu získaném od pracovníků profesionálně exponovaných parám styrenu metodou využívající Ra-Ni obsah S-(21HPE)cysteinu na úrovni 0,24-3,7 nmol/g sérového albuminu. Obsah S-(21HPE)cysteinu v globinu byl zjištěn na úrovni 0,03-0,16 nmol/g globinu. Obsah aduktů SO-Val zjištěný metodou MED ve studii Pauwelse a spol. (1996), který podával intraperitoneálně styren laboratorním myším v rozmezí 0 až 4,35 mmol/kg živé váhy byl cca <10 až 305 pmol/g Hb.

Hladina aduktů SO-His a SO-Lys u lidí exponovaných *in vivo* styrenu a SO dosud nebyla v žádné studii stanovena, ale díky vysoké afinitě histidinu vůči SO lze předpokládat, že bude mnohem vyšší než je hladina aduktů SO-Val zjišťovaná metodou modifikované Edmanovy degradace. Dá se spekulovat, že tato hladina bude zhruba na úrovni 10-1000 pmol/g globinu, kterou by výše navržená analytická metoda měla být schopna snadno a správně změřit.

5.5. Polyakrylamidová gelová elektroforéza

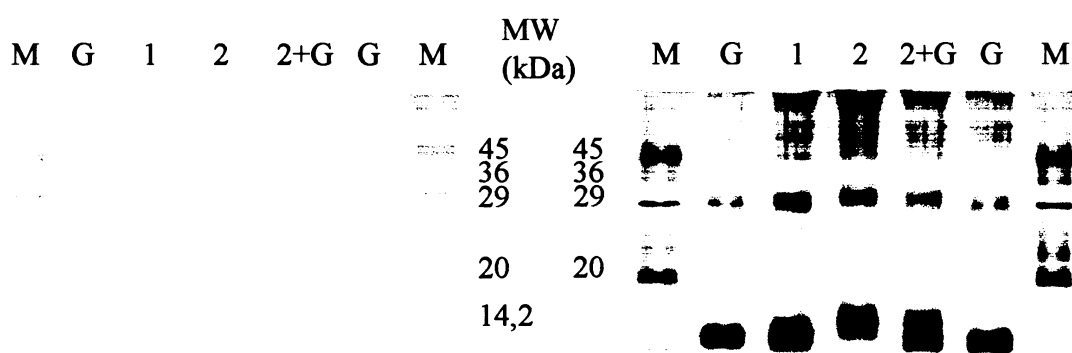
5.5.1. Využití SDS-PAGE k analýze SO-modifikovaného lidského globinu

Na počátku experimentální práce s elektroforézou na polyakrylamidových gelech byly vyzkoušeny tři různé modifikace provedení gelové elektroforézy: SDS-PAGE, nativní PAGE a kyselá PAGE. Nejlepších výsledků separace bylo dosaženo pomocí SDS-PAGE, kdy docházelo k dělení analyzovaných proteinů dle jejich M_r . Při optimalizaci metody SDS-PAGE bylo nutno najít takové složení dělicího gelu, aby v něm byly α a β řetězce lidského globinu vzájemně dobře separovány. Separační schopnost gelu závisí obecně na jeho hustotě a stupni zesíťování, obojí lze zjednodušeně vyjádřit „procentem“ gelu. Čím je vyšší „procento“ gelu, tím je sice separační schopnost gelu lepší, ale na druhou stranu zároveň klesá průchodnost gelu pro vysokomolekulární látky. Lidský globin a jeho α a β řetězce jsou relativně nízkomolekulární proteiny, a tudíž se k jejich separaci hodí gely s „procentem“ v rozmezí 12-20 %. V této práci bylo nejlepší separace dosaženo na 20 % dělicím gelu.

20 % dělicí gel byl použit k analýze vzorků lidských globinů inkubovaných *in vitro* s SO (SO-Gb 100:1 a SO-Gb 10:1). Dále byl tímto způsobem analyzován

kontrolní lidský globin a směs značkovacích standardů nízkomolekulárních proteinů. Byla vyzkoušena SDS-PAGE se dvěma různými navážkami analyzovaných proteinů 50 ng a 500 ng. Proteiny byly po skončení elektroforézy detekovány obarvením stříbrem. Výsledky analýz jsou prezentovány na obrázcích 23 a 24.

Obrázek 23 (vlevo) a 24 (vpravo): SDS-PAGE vzorků SO-Gb na 20 % dělicím gelu. Navážka proteinu v jednotlivých liniích činila: 50 ng (Obr 17) nebo 500ng (Obr. 18). Linie M, směs standardů nízkomolekulárních proteinů Sigma; G, kontrolní globin; 1, SO-Gb 10:1; 2, SO-Gb 100:1; 2+G, směs SO-Gb 100:1 a kontrolního globinu (1:1).



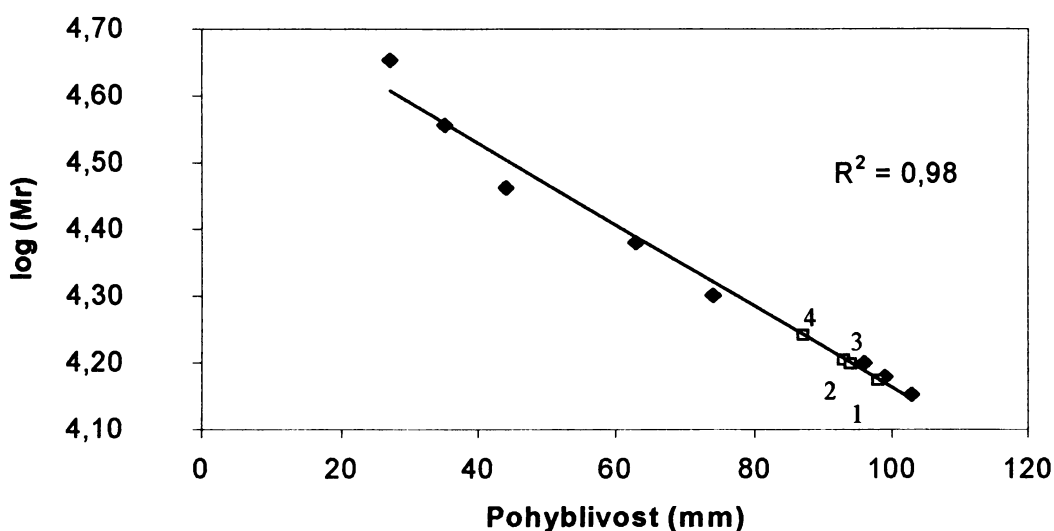
Na obrázku 23 je v linii G patrné rozštěpení kontrolního globinu na dva těsně u sebe položené proužky. Tyto proužky odpovídají jednotlivým α a β řetězcům globinu. Díky použití velmi citlivého barvení proteinů stříbrem bylo možno tyto řetězce zviditelnit. Použití desetkrát vyšší navážky sice způsobilo viditelné rozšíření proužků proteinu, ale zato byly v jednotlivých liniích patrné i proteiny méně zastoupené ve vzorku (obrázek 24). Na tomto obrázku je patrná přítomnost dalších čar při $M_r \sim 30000$, které jsou zřejmě tvořeny dimery α a β řetězců globinu. Navázání určitého počtu (n) molekul SO na globinový řetězec v principu způsobí zvýšení M_r výsledného proteinu o hodnotu $120 \times n$. To se následně projeví v SDS-PAGE snížením pohyblivosti takto modifikovaného proteinu. Proužky tvořené proteiny SO-Gb by tedy měly trochu zaostávat za proužkem kontrolního globinu. Skutečně jsem pozoroval dobře patrné snížení pohyblivosti proteinu SO-Gb 100:1 (obrázek 23 a 24, linie 2).

Snížení pohyblivosti proteinu SO-Gb 10:1 (obrázek 23, linie 1) bylo o něco menší, zřejmě díky menšímu množství navázaného SO na SO-Gb 10:1 ve srovnání s SO-Gb 100:1.

5.5.2. Stanovení M_r SO-modifikovaného lidského globinu

Ze závislosti pohyblivosti proteinu (vyjádřeném ураženou vzdáleností v mm) na logaritmu jeho relativní molekulové hmotnosti (M_r) v systému SDS-PAGE lze zjistit M_r tohoto proteinu (vztah [1]). Analýzou značkovacích standardů nízkomolekulárních proteinů (obrázek 23) byla získána kalibrační závislost, která byla využita ke zjištění M_r lidského globinu exponovaného *in vivo* racemickému SO (obrázek 25).

Obrázek 25: Vztah mezi mobilitou a logaritmem M_r standardů proteinů Sigma a kontrolním globinem s přesně definovanou M_r . Použité značkovací standardy jsou označené \blacklozenge . Vzorky proteinů SO-Gb jsou označené \square . 1- SO-Gb 10:1, α řetězec, 2- SO-Gb 10:1, β řetězec, 3- SO-Gb 100:1, čelo proužku, 4- SO-Gb 100:1, konec proužku.



SDS-PAGE lidského globinu, který byl inkubován se 100-násobným molárním nadbytkem SO (SO-Gb 100:1) poskytla jeden široký proužek (obrázek 23, linie 2). Po

dosazení pohyblivosti obou krajů proužku do závislosti znázorněné na obrázku 25 byla zjištěna M_r tohoto proteinu, která byla v rozmezí 16007 až 17414.

Když je na globinový řetězec kovalentně navázána jedna molekula SO, tak M_r řetězce stoupne o hodnotu cca 120 g/mol. Pozorovaná maximální hodnota M_r 17414 proteinu SO-Gb 100:1 tedy znamená, že na danou molekulu globinu bylo navázáno cca 19 molekul SO. Z toho lze vypočítat výslednou celkovou hladinu SO aduktů v SO-Gb 100:1, která tak činila cca 295 $\mu\text{mol/g}$ globinu. Tato hodnota, udávající celkový obsah aduktů SO, je ve výborném souladu s hodnotami uvedenými v tabulkách 9 a 14. Bohužel rozdíly v mobilitě mezi SO-Gb 10:1 a kontrolním globinem byly příliš malé na to, aby byly spolehlivě pozorovatelné (Jágr, 2002).

Závěrem lze říci, že metoda SDS-PAGE nezávisle potvrdila hodnoty hladin aduktů SO u vzorků SO-Gb 100:1 zjištěné metodami GC/MS a GC-FID. Zároveň to bylo dle mých znalostí poprvé, co byl učiněn pokus o SDS-PAGE analýzu SO-modifikovaného lidského globinu. Vzhledem k nízkým, prakticky až nepozorovatelným, rozdílům v pohyblivosti kontrolního globinu a SO-Gb 10:1, tedy globinu exponovaného stále dost vysokým hladinám SO, lze říci, že se SDS-PAGE nehodí k analýzám aduktů SO v globinech získaných z biologických materiálů, kde je hladina aduktů SO cca o 4-6 řádů nižší.

6. SHRNUÍ

V této dizertační práci byla poprvé byla popsána metoda syntézy regioizomerů aduktů SO-Cys, SO-His a SO-Lys. S-(1-Fenyl-2-hydroxyethyl)cystein a S-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)cystein byly připraveny přímou alkylací cysteinu optickými enantiomery (*R*)-SO nebo (*S*)-SO. Aduky SO s aminokyselinami histidinem a lysinem byly připraveny alkylací Na-Boc chráněných aminokyselin enantiomery (*R*)-SO nebo (*S*)-SO. Po odštěpení Na-Boc skupiny byly obdrženy adukty Nε-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)lysin a Nε-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)lysin, stejně jako Nπ-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)histidin, Nπ-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)histidin, Nτ-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)histidin a Nτ-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)histidin. Jednotlivé regioizomery byly ze směsí izolovány semi-preparativní HPLC a jejich struktura byla charakterizována metodami NMR. Podobným postupem byly dále připraveny deuterované analogy aduktů SO-Cys a SO-His, které byly využity jako vnitřní standardy v kvantitativních studiích.

Zkoumané adukty SO byly metodami GC/MS a LC/MS nalezeny v pronázových hydrolyzátech vzorků lidských globinů inkubovaných SO *in vitro*. V tomto materiálu byly detekovány všechny možné regioizomery aduktů SO-Cys, SO-Lys a SO-His. Jednotlivé adukty SO byly před analýzou plynovou chromatografií derivatizovány silylačním činidlem za vzniku TBDMS derivátů a jejich obsah ve vzorcích byl stanoven metodou GC/MS, která byla schopna separovat jednotlivé regioizomery aduktů SO. Metodou GC/MS bylo zjištěno, že nejvíce zastoupenými regioizomery aduktů SO ve vzorcích SO-Gb jsou: S-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)cystein, Nε-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)lysin a Nτ-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)histidin. Tyto adukty byly navrženy jako biomarkery vhodné k monitorování expozice lidí a laboratorních zvířat styrenu a SO. Metodou LC/MS bylo navíc možno studovat i jednotlivé diastereomery aduktů SO-Cys.

Dále byla vypracována metoda extrakce aduktů SO z hydrolyzátu lidského globinu na SPE kolonkách. Vyvinutá metoda dokázala úspěšně oddělit relativně méně polární adukty SO od ostatních alifatických a většiny aromatických aminokyselin. Tak bylo dosaženo obohacení hydrolyzátu o adukty SO cca o dva řády. Uvedená metoda byla použita ve spojení s plynovou chromatografií s plamenovým ionizačním detektorem ke stanovení obsahu aduktů SO ve vzorcích SO-modifikovaných lidských

globinů izolovaných z plné krve inkubované s enantiomery (*R*)-SO a (*S*)-SO. Obsah aduktů SO v těchto vzorcích se pohyboval v rozmezí cca 0,4-2,0 $\mu\text{mol/g}$ globinu.

Citlivost vyvinuté analytické metody by bylo možno ještě významně zvýšit nahrazením plamenového ionizačního detektoru mnohem citlivějším detektorem na bázi hmotnostní spektrometrie. Vyvinutá metoda bude v nejbližším čase použita k biologickému monitorování zvířat, kterým bude intraperitoneálně podáván styren-7,8-oxid. V případě úspěšného záchytu aduktů SO ve vzorcích získaných z laboratorních zvířat, bude metoda připravena k použití i v případě monitorování aduktů SO u lidí profesionálně exponovaných styrenu a styren-7,8-oxidu a tak bude možno stanovit korelaci mezi hladinou aduktů SO u lidí a mírou expozice. Hladinu aduktů SO-Cys, SO-His a SO-Lys v těchto vzorcích předpokládám na úrovni cca 10-1000 pmol/g globinu.

Část úsilí byla věnována i vypracování metody analýzy SO-modifikovaného lidského globinu polyakrylamidovou gelovou elektroforézou. Vzorky globinu byly separovány SDS-PAGE a bylo stanoveno množství SO navázaného na globinové řetězce.

7. SEZNAM LITERATURY

Al-Saleh S. S. M. (2002) The effect of *Echis carinatus* crude venom and purified protein fractions on carbohydrate metabolism in rats. *Cell Biochem. Function* 20, 1-10.

Alter B. P., Goff S. C., Efremov G. D., Gravely M. E., Huisman T. H. J. (1980) Globin chain electrophoresis: A new approach to the determination of the $G\gamma/A\gamma$ ratio in fetal haemoglobin and to studies of globin synthesis. *Br. J. Haematol.* 44, 527-534.

Badghisi H., Liebler D. C. (2002) Sequence mapping of epoxide adducts in human hemoglobin with LC-tandem MS and the Salsa algorithm. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 799-805.

Bailey E., Farmer P. B., Shuker D. E. G. (1987) Estimation of exposure to alkylating carcinogens by the GC-MS determination of adducts to hemoglobin and nucleic acid bases in urine. *Arch. Toxicol.* 60, 187-191.

Bailey E., Brooks A. G. F., Dollery C. T., Farmer P. B., Passingham B. J., Sleightholm M. A., Yates D. W. (1988) Hydroxyethyl-valine adduct formation in haemoglobin as a biological monitor of cigarette smoke intake. *Arch. Toxicol.* 62, 247-253.

Basile A., Ferranti P., Mamone G., Manco I., Pocsfalvi G., Malorni A., Acampora A., Sannolo N. (2002) Structural analysis of styrene oxide/hemoglobin adducts by mass spectrometry: identification of suitable biomarkers for human exposure evaluation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 871-878.

Becalski A., Lau B. P. Y., Lewis D., Seaman S. W., Hayward S., Sahagian M., Ramesh M., Leclerc Y. (2004) Acrylamide in french fries: influence of free amino acids and sugars. *J. Agric. Food Chem.* 52, 3801-3806.

Begemann P., Šrám R. J., Neumann H.-G. (2001) Hemoglobin adducts of epoxybutene in workers occupationally exposed to 1,3-butadiene. *Arch. Toxicol.* 74, 680-687.

Bergmark E., Belew M., Osterman-Golkar S. (1990) Separation and enrichment of alkylated globin chains as a means of improving the sensitivity of hemoglobin adduct measurements. *Acta Chem. Scand.* 44, 630-635.

Bergmark E., Calleman C. J., Costa L. G. (1991) Formation of hemoglobin adducts of acrylamide and its epoxide metabolite glycidamide in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 111, 352-363.

Bergmark E., Calleman C. J., He F., Costa L. G. (1993) Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 120, 45-54.

- Bergmark E. (1997) Hemoglobin adducts of acrylamide and acrylonitrile in laboratory workers, smokers and nonsmokers. *Chem. Res. Toxicol.* 10, 78-84.
- Biermann Ch. J., Kinoshita C. K., Marlett J. A., Steele R. D. (1986) Analysis of amino acids as tert.-butyldimethylsilyl derivatives by gas chromatography. *J. Chromatogr.* 357, 330-334.
- Birt J. E. E., Shuker D. E. G., Farmer P. B. (1998) Stable acetaldehyde-protein adducts as biomarkers of alcohol exposure. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 136-142.
- Bishop C., Surgenor D. M. (1964) The red blood cell. Academic Press, New York.
- Black R. M., Clarke R. J., Harrison J. M., Read R. W. (1997) Biological fate of sulphur mustard: identification of valine and histidine adducts in haemoglobin from casualties of sulphur mustard poisoning. *Xenobiotica* 27/5, 499-512.
- Bond J. A. (1989) Review of the toxicology of styrene. *Crit. Rev. Toxicol.* 19, 227-249.
- Boogaard P. J. (2002) Use of haemoglobin adducts in exposure monitoring and risk assessment. *J. Chromatogr.* 778/1-2, 309-322.
- Cahn R. S., Ingold C. K., Prelog V. (1966) Specification of molecular chirality. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 5, 385-415.
- Calleman C. J., Ehrenberg L., Jansson B., Osterman-Golkar S., Segerbäck D., Svensson K., Wachtmeister C. A. (1978) Monitoring and risk assessment by means of alkyl groups in hemoglobin in persons occupationally exposed to ethylene oxide. *J. Environ. Pathol. Toxicol.* 2, 427-442.
- Calleman C. J., Wachtmeister C. A. (1979) Synthesis of N^π- and N^τ-(2-hydroxyethyl)-L-histidines. *Acta Chem. Scand.* B33, 277-280.
- Calleman C. J., Bergmark E., Costa L. G. (1990) Acrylamide is metabolized to glycidamide in the rat: evidence from hemoglobin adduct formation. *Chem. Res. Toxicol.* 3, 406-412.
- Calleman C. J., Wu Y., He F., Tian G., Brgmark E., Zhang S., Deng H., Wang Y., Crofton K. M., Fennell T., Costa L. G. (1994) Relationships between biomarkers of exposure and neurological effects in a group of workers exposed to acrylamide. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 126, 361-371.
- Campbell J. R. (1983) The synthesis of N(τ)-(2-hydroxypropyl)histidine, N(τ)-(2-hydroxyethyl)histidine, and their deuteriated analogues. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I.* 1213-1217.
- Capacio B. R., Smith J. R., DeLion M. T., Anderson D. R., Graham J. S., Platoff G. E., Korte W. D. (2004) Monitoring sulfur mustard exposure by gas chromatography-mass spectrometry analysis of thiodiglycol cleaved from blood proteins. *J. Anal. Toxicol.* 28/5, 306-310.

- Coccini T., Maestri L., Robustelli della Cuna F. S., Bin L., Costa L. G., Manzo L. (1996) Urinary mercapturic acid diastereoisomers in rats subchronically exposed to styrene and ethanol. *Arch. Toxicol.* 70, 736-741.
- Dalton D. R., Dutta V. P., Jones D. C. (1968) Bromohydrin formation in dimethyl sulfoxide. *J. Am. Chem. Soc.* 90, 5498-5501.
- D'Aniello A., Petrucelli L., Gardner C., Fisher G. (1993) Improved method for hydrolyzing proteins and peptides without inducing racemization and for determining their true D-amino acid content. *Anal. Biochem.* 213, 290-295.
- Delbressine L. P. C., Van Bladeren P. J., Smeets F. L. M., Seutter-Berlage F. (1981) Stereoselective oxidation of styrene to styrene oxide in rats as measured by mercapturic acid excretion. *Xenobiotica* 11/9, 589-594.
- De Palma G., Manini P., Mozzoni P., Andreoli R., Bergamaschi E., Cavazzini S., Franchini I., Mutti A. (2001) Polymorphism of xenobiotic-metabolizing enzymes and excretion of styrene-specific mercapturic acids. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1393-1400.
- Dunn M. J. (1987) Two-dimensional gel electrophoresis of proteins. *J. Chromatogr.* 418, 145-185.
- Edler M., Jakubowski N., Linscheid M. (2005) Styrene oxide DNA adducts: quantitative determination using P-31 monitoring. *Anal. Bioanal. Chem.* 381/1, 205-211.
- Falk T. M., Villwock W., Renwranz L. (1998) Heterogeneity and subunit composition of the haemoglobins of five tilapiine species (Teleostei, Cichlidae) of the genera *Oreochromis* and *Sarotherodon*. *J. Comp. Physiol. B* 168, 9-16.
- Farmer P. B., Bailey E., Lamb J. H., Connors T. A. (1980) Approach to the quantitation of alkylated amino acids in haemoglobin by gas chromatography mass spectrometry. *Biomed. Mass Spectrom.* 7/1, 41-46.
- Farmer P. B., Gorf S. M., Bailey E. (1982) Determination of hydroxypropylhistidine in haemoglobin as a measure of exposure to propylene oxide using high resolution gas chromatography mass spectrometry. *Biomed. Mass Spectrom.* 9/2, 69-71.
- Farmer P. B., Bailey E., Gorf S. M., Törnqvist M., Osterman-Golkar S., Kautiainen A., Lewis-Enright D. P. (1986) Monitoring human exposure to ethylene oxide by the determination of haemoglobin adducts using gas chromatography-mass spectrometry. *Carcinogenesis* 7/4, 637-640.
- Farmer P. B., Bailey E., Naylor S., Anderson D., Brooks A., Cushnir J., Lamb J. H., Sepai O., Tang Y.-S. (1993) Identification of endogenous electrophiles by means of mass spectrometric determination of protein and DNA adducts. *Environ. Health Perspect.* 99, 19-24.

Farmer P. B., Cordero R., Autrup H. (1996) Monitoring human exposure to 2-hydroxyethylating carcinogens. *Environ. Health Perspect.* 104, 449-452.

Farmer P. B. (1999) Studies using specific biomarkers for human exposure assessment to exogenous and endogenous chemical agents. *Mutat. Res.* 428, 69-81.

Farmer P. B. (2004) DNA and protein adducts as markers of genotoxicity. *Toxicol. Lett.* 149, 3-9.

Fennell T. R., Sumner S. C., Walker V. E. (1992) A model for the formation and removal of hemoglobin adducts. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 1, 213-219.

Fennell T. R., Sumner S. C. J., Snyder R. W., Burgess J., Spicer R., Bridson W. E., Friedman M. A. (2005) Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicol. Sci.* 85/1, 447-459.

Fidder A., Noort D., De Jong A. L., Trap H. C., De Jong L. P. A., Benschop H. P. (1996) Monitoring of in vitro and in vivo exposure to sulphur mustard by GC/MS determination of the N-terminal valine adduct in haemoglobin after a modified Edman degradation. *Chem. Res. Toxicol.* 9, 788-792.

Fontanals N., Galià M., Marcé R. M., Borrull F. (2004) Solid-phase extraction of polar compounds with a hydrophilic copolymeric sorbent. *J. Chromatogr.* 1030, 63-68.

Fountoulakis M., Lahm W. M. (1998) Hydrolysis and amino acid composition analysis of proteins. *J. Chromatogr.* 826, 109-134.

Foureman G. L., Harris C., Guengerich P. F., Bend J. R. (1989) Stereoselectivity of styrene oxidation in microsomes and in purified cytochrome P-450 enzymes from rat liver. *J. Pharm. Exp. Therapeutics* 248, 492-497.

Frassanito R., Rossi M., Dragani L. K., Tallarico C., Longo A., Rotilio D. (1998) New and simple method for the analysis of the glutathione adduct of atrazine. *J. Chromatogr.* 795, 53-60.

Fred Ch., Kautiainen A., Athanassiadis I., Törnqvist M. (2004) Hemoglobin adduct levels in rat and mouse treated with 1,2:3,4-diepoxybutane. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 785-794.

Fustinoni S., Colosio C., Colombi A., Lastrucci L., Yeowell-O'Connell, Rappaport S. M. (1998) Albumin and hemoglobin adducts as biomarkers of exposure to styrene in fiberglass-reinforced-plastics workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 71, 35-41.

Gamerith G. (1983) Derivatization of amino acids to their N(O,S)-acyl alkyl esters for gas-liquid chromatographic determination. *J. Chromatogr.* 256, 326-330.

Ghittori S., Maestri L., Imbriani M., Capodaglio E., Cavalleri A. (1997) Urinary excretion of specific mercapturic acids in workers exposed to styrene. *Am. J. Ind. Med.* 31, 636-644.

Hagmar L., Törnqvist M., Nordander C., Rosen I., Bruze M., Kautiainen A., Magnusson A. L., Malmberg B., Aprea P., Granath F., Axmon A. (2001) Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scand. J. Work Environ. Health* 27, 219-226.

Hallier E., Goergens H. W., Karels H., Golka K. (1995) A note on individual differences in the urinary excretion of optical enantiomers of styrene metabolites and of styrene-derived mercapturic acids in humans. *Arch. Toxicol.* 69, 300-305.

Helleberg H. a Törnqvist M. (2000) A new approach for measuring protein adducts from benzo[a]pyrene diolepoxide by high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 1644-1653.

Hemminki K. (1983) Reactions of methylnitrosourea, epichlorohydrin, styrene oxide and acetoxyacetylaminofluorene with polyamino acids. *Carcinogenesis* 4/1, 1-3.

Hemminki K. (1986) Binding of styrene oxide to amino acids, human serum proteins and hemoglobin. *Arch. Toxicol. Suppl.* 9, 286-290.

Hennebrüder K., Angerer J. (2005) Determination of DMF modified DNA base N⁴-methylcarbamoylcytosine in human urine using off-line sample clean-up, two-dimensional LC and ESI-MS/MS detection. *J. Chromatogr.* 822, 124-132.

Hennion M.-C. (1999) Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J. Chromatogr.* 856, 3-54.

Herbert B., Galvani M., Hamdan M., Olivieri E., MacCarthy J., Pedersen S., Righetti P. G. (2001) Reduction and alkylation of proteins in preparation of two-dimensional map analysis: Why, when, and how? *Electrophoresis* 22, 2046-2057.

Hušek P. (1991) Rapid derivatization and gas chromatographic determination of amino acids. *J. Chromatogr.* 552, 289-299.

Hušek P. a Šimek P. (2006) Alkyl chloroformates in sample derivatization strategies for GC analysis. Review on a decade use of the reagents as esterifying agents. *Current Pharm. Analysis* 2, 23-43.

Chakrabarti S. K., Denniel C. (1996) S-[(1 and 2)]-phenyl-2-hydroxyethyl]-cysteine-induced cytotoxicity to rat renal proximal tubules. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 137, 285-294.

Chen Y.-L., Wang Ch.-J., Wu K.-Y. (2005) Analysis of N7-(benzo[a]pyrene-6-yl)guanine in urine using two-step solid-phase extraction and isotope dilution with liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 893-898.

Chiou S.-H., Wu S.-H. (1999) Evaluation of commonly used electrophoretic methods for the analysis of proteins and peptides and their application to biotechnology. *Analytica Chimica Acta* 383, 47-60.

Chiu Ch. S., Abushamaa A., Giese R. W. (1993) Chemical transformation/derivatization of O6-methyl- and O6-(hydroxyethyl) guanine for detection by GC-EC/MS. *Anal. Chem.* 65, 3071-3075.

Christakopoulos A., Bergmark E., Zorzec V., Norppa H., Mäki Paakkanen J., Osterman-Golkar S. (1993) Monitoring occupational exposure to styrene from hemoglobin adducts and metabolites in blood. *Scand. J. Work. Environ. Health* 19, 255-263.

International Agency for Research on Cancer (1997) Some industrial chemicals. *IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans*, Vol. 60, pp 233-320, IARC, Lyon, France.

Jain N. C. (1993) *Essentials of veterinary hematology*. Lea & Febiger, Philadelphia.

Johansson G., Ernstgård L., Gullstrand E., Löf A., Osterman-Golkar S., Williams C. C., Sumner S. C. J. (2000) Styrene oxide in blood, hemoglobin adducts, and urinary metabolites in human volunteers exposed to ¹³C₈-styrene vapors. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168, 36-49.

Kaur S., Hollander D., Haas R., Burlingame A. L. (1989) Characterization of structural xenobiotic modifications in proteins by high sensitivity tandem mass spectrometry. Human hemoglobin treated in vitro with styrene-7,8-oxide. *J. Biol. Chem.* 264/29, 16981-16984.

Kautiainen A., Törnqvist M. (1991) Monitoring exposure to simple epoxides and alkenes through gas chromatographic determination of hemoglobin adducts. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 63, 27-31.

Kautiainen A., Fred C., Rydberg P., Törnqvist M. (2000) A liquid chromatography tandem mass spectrometric method for *in vivo* dose monitoring of diepoxybutane, a metabolite of butadiene. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 14, 1848-1853.

Kessler W., Jiang X., Filser J. G. (1990) Direct determination of styrene-7,8-oxide in blood by gas chromatography with flame ionization detection. *J. Chromatogr.* 534, 67-75.

Korn M., Wodarz R., Schoknecht W., Weichardt H., Bayer H. (1984) Styrene metabolism in man: gas chromatographic separation of mandelic acid enantiomers in the urine of exposed persons. *Arch. Toxicol.* 55, 59-63.

Korn M., Wodarz R., Drysch K., Schoknecht W., Schmahl F. W. (1985) Stereometabolism of styrene in man: gas chromatographic determination of phenylethyleneglycol enantiomers and phenylethanol isomers in the urine of occupationally-exposed persons. *Arch. Toxicol.* 58, 110-114.

Korn M., Wodarz R., Drysch K., Schmahl F. W. (1987) Stereometabolism of styrene in man: urinary excretion of chiral styrene metabolites. *Arch. Toxicol.* 60, 86-88.

- Koskinen M., Plna K. (2000) Specific DNA adducts induced by some mono-substituted epoxides in vitro and in vivo. *Chem.-Biol. Interact.* 129/3, 209-229.
- Kostrhounová R., Hrdlička A., Sommer L. (2004) Stanovení fenolu a chlorfenolů ve směsích metodou HPLC po předchozím zkoncentrování na pevné hydrofóbní sorbenty. *Chem. Listy* 98, 33-38.
- Kristiansson M. H., Jönsson B. A. G., Lindh Ch. H. (2002) Mass spectrometric characterization of human hemoglobin adducts formed in vitro by hexahydrophthalic anhydride. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 562-569.
- Kumar R., Vodička P., Peltonen K., Hemminki K. (1997) 32P-postlabelling analysis of isomeric 7-alkylguanine adducts of styrene oxide. *Carcinogenesis* 18, 407-414.
- Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Landin H. H., Osterman-Golkar S., Zorzec V., Törnqvist M. (1996) Biomonitoring of epichlorohydrin by haemoglobin adducts. *Anal. Biochem.* 240, 1-6.
- Landin H. H., Segerbäck D., Damberg C., Osterman-Golkar S. (1999) Adducts with haemoglobin and with DNA in epichlorohydrin-exposed rats. *Chem.-Biol. Interact.* 117, 49-64.
- Lee K.-K., Liu P.-Ch., Chen Y.-L. (1999) Electrophoretic characterization of a novel cysteine protease produced by *Vibrio harveyi*. *Electrophoresis* 20, 3343-3346.
- Liao P.-Ch., Li Ch.-M., Hung Ch.-W., Chen S.-H. (2001) Quantitative detection of N(7)-(2-hydroxyethyl)guanine adducts in DNA using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 36, 336-343.
- Lie-Injo L. E., Solai A., Ganesan J. (1978) Globin chain separation by SDS polyacrylamide-gel electrophoresis – simple screening method for elongated hemoglobin chains. *J. Chromatogr.* 153/1, 161-165.
- Linhart I., Šmejkal J., Mládková I. (1998) Stereochemical aspects of styrene biotransformation. *Toxicol. Lett.* 94, 127-135.
- Linhart I., Gut I., Šmejkal J., Novák J. (2000) Biotransformation of styrene in mice. Stereochemical aspects. *Chem Res. Toxicol.* 13, 36-44.
- Linhart I. (2001) Stereochemistry of styrene biotransformation. *Drug Metab. Rev.* 33(3), 353-367.
- Lodish H., Baltimore D., Beck A., Zipursky L. S., Matsudaria P., Darnell J. (2001) *Molecular Cell Biology*, Scientific American Books, Inc., New York.
- Lopez M. F., Berggren K., Chernokalskaya E., Lazarev A., Robinson M., Patton W. F. (2000) A comparison of silver stain and SYPRO Ruby protein gel stain with respect to

protein detection in two-dimensional gels and identification by peptide mass profiling. *Electrophoresis* 21, 3673-3683.

Maestri L., Ghittori S., Imbriani M. (1996) Determination of urinary mercapturic acids of styrene in man by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Chromatogr.* 687, 387-394.

Maestri L., Imbriani M., Ghittori S., Capodaglio E., Gobba F., Cavalleri A. (1997) Excretion of N-acetyl-S-(1-phenyl-2-hydroxyethyl)-cysteine and N-acetyl-S-(2-phenyl-2-hydroxyethyl)-cysteine in workers exposed to styrene. *Sci. Tot. Environ.* 199, 13-22.

Mamone G., Malorni A., Scaloni A., Sannolo N., Basile A., Pocsfalvi G., Ferranti P. (1998) Structural analysis and quantitative evaluation of the modifications produced in human hemoglobin by methyl bromide using mass spectrometry and Edman degradation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12, 1783-1792.

Manini P., Buzio L., Andreoli R., Goldoni M., Bergamaschi E., Jakubowski M., Vodička P., Hirvonen A., Mutti A. (2003) Assessment of the biotransformation of the arene moiety of styrene in volunteers and occupationally exposed workers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189, 160-169.

Manini P., Andreoli R., Poli D., De Palma G., Mutti A., Niessen W. M. A. (2002) Liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry characterization of styrene metabolism in man and in rat. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 2239-2248.

Manini P., De Palma G., Andreoli R., Goldoni M., Mutti A. (2004) Determination of urinary styrene metabolites in the general Italian population by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 77, 433-436.

Matthews H. R., Rapoport H. (1973) Differentiation of 1,4- and 1,5-disubstituted imidazoles. *J. Am. Chem. Soc.* 95, 2297-2303.

Mawhinney T. P., Robinett R. S. R., Atalay A., Madson M. A. (1986) Analysis of amino acids as their tert.-butyldimethylsilyl derivatives by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 358, 231-242.

McDonald T. A., Yeowell-O'Connell K., Rappaport S. M. (1994) Comparison of protein adducts of benzene oxide and benzoquinone in the blood and bone marrow of rats and mice exposed to [$^{14}\text{C}/^{13}\text{C}_6$]benzene. *Cancer Research* 54, 4907-4914.

Miller R. R., Newhook R., Poole A. (1994) Styrene production, use, and human exposure. *Crit. Rev. Toxicol.* 24, S1-S10.

Miraglia N., Pocsfalvi G., Ferranti P., Basile A., Sannolo N., Acampora A., Soleo L., Palmieri F., Caira S., De Giulio B., Malorni A. (2001) Mass spectrometric identification of a candidate biomarker peptide from the *in vitro* interaction of epichlorohydrin with red blood cells. *J. Mass Spectrom.* 36, 47-57.

Moll T. S. a Elfarrá A. A. (1999) Characterization of the reactivity, regioselectivity, and stereoselectivity of the reactions of butadiene monoxide with valinamide and the N-terminal valine of mouse and rat hemoglobin. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 679-689.

Moller L., Zeisig M., Vodička P. (1993) Optimization of an HPLC method for analyses of ³²P-postlabeled DNA adducts. *Carcinogenesis* 14, 1343-1348.

Mowrer J., Törnqvist M., Jensen S., Ehrenberg L. (1986) Modified Edman degradation applied to hemoglobin for monitoring occupational exposure to alkylating agents. *Toxicol. Environ. Chemistry* 11, 215-231.

Mráz J., Šimek P. Chvalová D., Nohová H., Šmigolová P. (2004) Studies on the methyl isocyanate adducts with globin. *Chem.-Biol. Interact.* 148, 1-10.

Nakanishi T., Kishikawa M., Shimizu A., Hayashi A., Inoue F. (1995) Assignment of the ions in the electrospray ionization mass spectra of the tryptic digest of the non-derivatized globin, covering the whole sequence of α - and β -chains: a rapid diagnosis for haemoglobinopathy. *J. Mass Spectrom.* 30, 1663-1670.

Nakatsu K., Hugenroth S., Sheng L.-S., Horning E. C., Horning M. G. (1983) Metabolism of styrene oxide in the rat and guinea pig. *Drug Metab. Dispos.* 11/5, 463-470.

Negri S., Maestri L., Andreoli R., Manini P., Mutti A., Imbriani M. (2006) Mercapturic acids of styrene in man: compatibility of the other results obtained by LC/MS/MS and by HPLC-fluorimeter, and stability of samples under different storage conditions. *Toxicol. Lett.* 162, 225-233.

Noort D., Hulst A. G., Trap H. C., De Jong L. P. A., Benschop H. P. (1997) Synthesis and mass spectrometric identification of the major amino acid adducts formed between sulphur mustard and haemoglobin in human blood. *Arch. Toxicol.* 71, 171-178.

Noort D., Fidler A., Benschop H. P., de Jong L. P. A., Smith J. R. (2004) Procedure for monitoring exposure to sulfur mustard based on modified Edman degradation of globin. *J. Anal. Toxicol.* 28/5, 311-315.

Nordqvist M. B., Löf A., Osterman-Golkar S., Wallés S. A. S. (1985) Covalent binding of styrene and styrene-7,8-oxide to plasma proteins, hemoglobin and DNA in the mouse. *Chem.-Biol. Interact.* 55, 63-73.

Novák J., Linhart I., Dvořáková H. (2004) Syntheses of 7-(2-hydroxy-1-phenylethyl)- and 7-(2-hydroxy-2-phenylethyl)guanine, DNA adducts derived from styrene 7,8-oxide. *Eur. J. Org. Chem.* 12, 2738-2746.

Ospina M., Vesper H. W., Licea-Perez H., Meyers T., Mi L., Myers G. (2005) LC/MS/MS method for the analysis of acrylamide and glycidamide hemoglobin adducts. *Advances in Exp. Medicine and Biology* 561, 97-107.

- Osterman-Golkar S., Ehrenberg D., Segerbäck D., Hällström I. (1976) Evaluation of genetic risk of alkylating agents. II. Haemoglobin as a dose monitor. *Mutat. Res.* 14, 1-10.
- Osterman-Golkar S., Farmer P. B., Segerbäck D., Bailey E., Calleman C. J., Svensson K., Ehrenberg L. (1983) Dosimetry of ethylene oxide in the rat by quantitation of alkylated histidine in hemoglobin. *Teratog. Carcinog. Mutagen.* 3, 395-405.
- Osterman-Golkar S., Bailey E., Farmer P. B., Gorf S. M., Lamb J. B. (1984) Monitoring exposure to propylene oxide through the determination of hemoglobin alkylation. *Scand. J. Work. Environ. Health* 10, 99-102.
- Osterman-Golkar S., Christakopoulos A., Zorzec V., Svensson K. (1995) Dosimetry of styrene 7,8-oxide in styrene and styrene oxide exposed mice and rats by quantification of haemoglobin adducts. *Chem.-Biol. Interact.* 95, 79-87.
- Osterman-Golkar S. M., Peltonen K., Anttinen-Klemetti T., Landin H. H., Zorzec V., Sorsa M. (1996) Haemoglobin adducts as biomarkers of occupational exposure to 1,3-butadiene. *Mutagenesis* 11, 145-149.
- Otteneder M., Eder L., Lutz W. K. (1999) ³²P-postlabelling analysis of DNA adducts of styrene 7,8-oxide at the O6-position of guanine. *Chem. Res. Toxicol.* 12, 93-99.
- Pagano D. A., Yagen B., Hernandez O., Bend J. R., Zeiger E. (1982) Mutagenicity of (R) and (S) styrene 7,8-oxide and the intermediary mercapturic acid metabolites formed from styrene 7,8-oxide. *Environ. Mutagen.* 4, 575-584.
- Pantarotto C., Fanelli R., Bidoli F., Morazzoni P., Salmona M., Szczawinska K. (1978) Arene oxides in styrene metabolism, a new perspectives in styrene toxicity. *Scand. J. Work Environ. Health* 4/2, 67-77.
- Patras G., Qiao G. G., Solomon D. H. (1999) On the mechanism of background silver staining during sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis* 20, 2039-2045.
- Paulsson B., Athanassiadis I., Rydberg P., Törnqvist M. (2003) Hemoglobin adducts from glycidamide: acetonization of hydrophilic groups for reproducible gas chromatography/tandem mass spectrometric analysis. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 1859-1865.
- Pauwels W., Vodička P., Severi M., Plná K., Veulemans H., Hemminki K. (1996) Adduct formation on DNA and haemoglobin in mice intraperitoneally administered with styrene. *Carcinogenesis* 17/12, 2673-2680.
- Pauwels W., Farmer P. B., Osterman-Golkar S., Severi M., Cordero R., Bailey E., Veulemans H. (1997) Ring test for the determination of N-terminal valine adducts of styrene 7,8-oxide with haemoglobin by the modified Edman degradation technique. *J. Chromatogr. B* 702, 77-83.

Pauwels W., Veulemans H. (1998) Comparison of ethylene, propylene and styrene-7,8-oxide in vitro adduct formation on N-terminal valine in human haemoglobin and on N-7-guanine on human DNA. *Mutat. Res.* 418, 21-33.

Pérez H. L., Cheong H.-K., Yang J. S., Osterman-Golkar S. (1999) Simultaneous analysis of hemoglobin adducts of acrylamide and glycidamide by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 274, 59-68.

Petreas M. X., Woodlee J., Becker C. E., Rappaport S. M. (1995) Retention of styrene following controlled exposure to constant and fluctuating air concentrations. *Int. Arch. Environ. Health* 67, 27-34.

Pfäffli P., Hesso A., Vainio H., Hyvönen M. (1981) 4-vinylphenol excretion suggestive of arene oxide formation in workers occupationally exposed to styrene. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 60, 85-90.

Phillips D. H., Farmer P. B. (1994) Evidence for DNA and protein binding by styrene and styrene oxide. *Crit. Rev. Toxicol.* 24 (S1), S35-S46.

Poirier M. C. a Weston A. (1996) Human DNA adduct measurements: state of the art. *Environ. Health Perspect.* 104/5, 883-893.

Rappaport S. M., Ting D., Jing Z., Yeowell-O'Connell K., Waidyanatha S., McDonald T. (1993) Application of Raney nickel to measure adducts of styrene oxide with hemoglobin and albumin. *Chem. Res. Toxicol.* 6, 238-244.

Rappaport S. M., Yeowell-O'Connell K., Bodell W., Yager J. W., Symanski E. (1996) An investigation of multiple biomarkers among workers exposed to styrene and styrene-7,8-oxide. *Cancer Res.* 56, 5410-5416.

Rappaport S. M., Yeowell-O'Connell K. (1999) Protein adducts as dosimeters of human exposure to styrene, styrene-7,8-oxide, and benzene. *Toxicol. Letters* 108, 117-126.

Raymackers J., Daniels A., De Brabandere V., Missiaen C., Dauwe M., Verhaert P., Vanmechelen E., Meheus L. (2000) Identification of two-dimensionally separated human cerebrospinal fluid proteins by N-terminal sequencing, matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry, nanoliquid chromatography-electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry, and tandem mass spectrometry. *Electrophoresis* 21, 2266-2283.

Rodríguez I., Llompарт M. P., Cela R. (2000) Solid-phase extraction of phenols. *J. Chromatogr.* 885, 291-304.

Rydberg P., Magnusson A. L., Zorzec V., Granath F., Törnqvist M. (1996) Adducts to N-terminal valines in haemoglobin from butadiene metabolites. *Chem. Biol. Interact.* 101, 193-205.

Rydberg P., Lüning B., Wachtmeister A., Eriksson L., Törnqvist M. (2002) Applicability of a modified Edman procedure for measurement of protein adducts:

mechanisms of formation and degradation of phenylthiohydantoins. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 570-581.

Sabbioni G., Skipper P. L., Buchi G., Tannenbaum S. R. (1987) Isolation and characterization of the major serum albumin adduct formed by aflatoxin B1 in vitro in rats. *Carcinogenesis*, 8, 819-824.

Sabbioni G., Schütze D. (1998) Hemoglobin binding of bicyclic aromatic amines. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 471-483.

Sabbioni G., Hartley R., Schneider S. (2001) Synthesis of adducts with amino acids as potential dosimeters for the biomonitoring of humans exposed to toluenediisocyanate. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1573-1583.

Sepai O., Anderson D., Street B., Bird J., Farmer P. B., Bailey E. (1993) Monitoring of exposure to styrene oxide by GC-MS analysis of phenylhydroxyethyl esters in hemoglobin. *Arch. Toxicol.* 67, 28-33.

Seutter-Berlage F., Delbressine L. P. C., Smeets F. L. M., Ketelaars H. C. J. (1978) Identification of 3-sulfur containing urinary metabolites of styrene in rat. *Xenobiotica* 8, 413-418.

Severi M., Pauwels W., Van Hummelen P., Roosels D., Kirsch-Volders M., Veulemans H. (1994) Urinary mandelic acid and hemoglobin adducts in fiberglass-reinforced plastics workers exposed to styrene. *Scand. J. Work. Environ. Health* 20, 451-458.

Schettgen T., Broding H. Ch., Angerer J., Drexler H. (2002) Hemoglobin adducts of ethylene oxide, propylene oxide, acrylonitrile and acrylamide-biomarkers in occupational and environmental medicine. *Toxicol. Letters* 134, 65-70.

Schrimpf S. P., Langen H., Gomes A. V., Wahlestedt C. (2001) A two-dimensional protein map of *Caenorhabditis elegans*. *Electrophoresis* 22, 1224-1232.

Siethoff Ch., Feldmann I., Jakibowski N., Linscheid M. (1999) Quantitative determination of DNA adducts using liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry and liquid chromatography/high-resolution inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 34, 421-426.

Simpson J. T., Torok D. S., Girard J. E., Markey S. P. (1996) Analysis of amino acids in biological fluids by pentafluorobenzyl chloroformate derivatization and detection by electron capture negative ionization mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 233, 58-66.

Sumner S. C. J., Fennell T. R. (1994) Review of the metabolic fate of styrene. *Crit. Rev. Toxicol.* 24 (S1), S11-S33.

Sumner S. C. J., Williams C. C., Snyder R. W., Krol W. L., Asgharian B., Fennell T. R. (2003) Acrylamide: a comparison of metabolism and hemoglobin adducts in

rodents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure. *Toxicol. Sci.* 75, 260-270.

Tietz D. (1987) Gel electrophoresis of intact subcellular particles. *J. Chromatogr.* 418, 305-344.

Ting D., Smith M. T., Doane-Setzer P., Rappaport S. M. (1990) Analysis of styrene oxide – globin adducts based upon reaction with Raney nickel. *Carcinogenesis* 11/5, 755-760.

Törnqvist M., Mowrer J., Jensen S., Ehrenberg L. (1986) Monitoring of environmental cancer initiators through hemoglobin adducts by a modified Edman degradation method. *Anal. Biochem.* 154, 255-266.

Törnqvist M., Kautiainen A., Gatz R. N., Ehrenberg L. (1988) Haemoglobin adducts in animals exposed to gasoline and diesel exhaust: I. alkenes. *J. Appl. Toxicol.* 8, 159-170.

Törnqvist M., Fred C., Haglund J., Helleberg H., Paulsson B., Rydberg P. (2002) Protein adducts: quantitative and qualitative aspects of their formation, analysis and applications. *J. Chromatogr.* 778, 279-308.

Vodička P., Vodičková L., Hemminki K. (1993) ³²P-postlabelling of DNA adducts of styrene-exposed lamination workers. *Carcinogenesis* 14, 2059-2061.

Vodička P., Štětina R., Kumar R., Plna K., Hemminki K. (1996) 7-Alkylguanine adducts of styrene oxide determined by ³²P-postlabelling in DNA and human embryonal lung fibroblasts (HEL). *Carcinogenesis* 17, 801-808.

Vodička P., Tvrdík T., Osterman-Golkar S., Vodičková L., Peterková K., Souček P., Šarmanová J., Farmer P. B., Granath F., Lambert B., Hemminki K. (1999) An evaluation of styrene genotoxicity using several biomarkers in a 3-year follow-up study of hand-lamination workers. *Mutat. Res.* 445, 205-224.

Vodička P., Souček P., Bates A. D., Dušinská M., Šarmanová J., Zámečnicková M., Vodičková L., Koskinen M., de Zwart F. A., Natarajan A. T., Hemminki K. (2001) Association between genetic polymorphisms and biomarkers in styrene-exposed workers. *Mutat. Res.* 482, 91-105.

Vodička P., Koskinen M., Arand M., Oesch F., Hemminki K. (2002a) Spectrum of styrene-induced DNA adducts: the relationship to other biomarkers and prospects in human biomonitoring. *Mutat. Res.* 511, 239-254.

Vodička P., Štětina R., Koskinen M., Souček P., Vodičková L., Hlaváč P., Kuřicová M., Nečasová R., Hemminki K. (2002b) New aspects in the biomonitoring of occupational exposure to styrene. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 75, S75-S85.

Vodička P., Tuimala J., Štětina R., Kumar R., Manini P., Naccarati A., Maestri L., Vodičková L., Kuricová M., Järventaus H., Majvaldová Z., Hirvonen A., Imbriani M., Mutti A., Migliore L., Norppa H., Hemminki K. (2004) Cytogenetic markers, DNA

single-strand breaks, urinary metabolites, and DNA repair rates in styrene-exposed lamination workers. *Environ. Health Perspect.* 112, 867-871.

Vodička P., Koskinen M., Naccarati A., Oesch-Bartlomowicz B., Vodičková L., Hemminki K., Oesch F. (2006a) Styrene metabolism, genotoxicity, and potential carcinogenicity. *Drug Metab. Rev.* 38, 805-853.

Vodička P., Linhart I., Novák J., Koskinen M., Vodičková L., Hemminki K. (2006b) 7-Alkylguanine adduct levels in urine, lungs and liver of mice exposed to styrene by inhalation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 210, 1-8.

Voet D., Voet J. G. (1995) *Biochemie*, Victoria Publishing, Praha.

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

Walton M., Egner P., Scholl P. F., Walker J., Kensler T. W., Groopman J. D. (2001) Liquid chromatography electrospray-mass spectrometry of urinary aflatoxin biomarkers: characterization and application to dosimetry and chemoprevention in rats. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 919-926.

Watabe T., Isobe M., Sawakata T., Yoshikawa K., Yamada S., Takabatake E. (1978) Metabolism and mutagenicity of styrene. *Scand. J. Work Environ. Health* 4/2, 142-155.

Weigel S., Kallenborn R., Hühnerfuss H. (2004) Simultaneous solid-phase excretion of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) pH and their determination by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 1023, 183-195.

Wenker M. A. M., Kežić S., Monster A. C., de Wolff F. A. (2000) Metabolism of styrene-7,8-oxide in human liver in vitro: Interindividual variation and stereochemistry. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 169, 52-58.

Wenker M. A. M., Kežić S., Monster A. C., de Wolff F. A. (2001) Stereochemical metabolism of styrene in volunteers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 74, 359-365.

Wu K.-Y., Chiang S.-Y., Huang T.-H., Tseng Y.-S., Chen Y.-L., Kuo H.-W., Hsieh Ch.-L. (2004) Formation of N-(2-hydroxyethyl)valine in human hemoglobin - effect of lifestyle factors. *Mutat. Res.* 559, 73-82.

Yagen B., Hernandez O., Bend J. R., Cox R. H. (1981) Synthesis and relative stereochemistry of the four mercapturic acids derived from styrene oxide and N-acetyl cysteine. *Chem.-Biol. Interact.* 34, 57-67.

Yagen B., Foureman G. L., Ben-Zvi Z., Ryan A. J., Hernandez O., Cox R. H., Bend J. R. (1984) The metabolism and excretion of ¹⁴C-styrene oxide-glutathione adducts administered to the winter flounder *Pseudopleuronectes americanus*, a marine teleost. *Drug Metab. Dispos.* 12/4, 389-395.

Yan J. X., Wait R., Berkelman T., Harry R. A., Westbrook J. A., Wheeler C. H., Dunn M. J. (2000) A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000, 21, 3666-3672.

Yeowell-O'Connell K., Jing Z., Rappaport S. M. (1996a) Determination of albumin and hemoglobin adducts in workers exposed to styrene and styrene oxide. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5, 205-215.

Yeowell-O'Connell K., McDonald T., Rappaport S. M. (1996b) Analysis of hemoglobin adducts of benzene oxide by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Biochem.* 237, 49-55.

Yeowell-O'Connell K., Pauwels W., Severi M., Jiu Z., Walker M. R., Rappaport S. M., Veulemans H. (1997) Comparison of styrene-7,8-oxide adducts formed via reaction with cysteine, N-terminal valine and carboxylic acid residues in human, mouse and rat hemoglobin. *Chem.-Biol. Interact.* 106, 67-85.

8. SEZNAM PUBLIKACÍ

Jágr M. (2002) Methods for study of protein adducts with xenobiotics. *Studentská vědecká konference*. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha, Česká Republika.

Mráz J., Jágr M., Chvalová D., Šimek P., Nohová H., Šmigolová P. (2004) Investigation on the styrene oxide adducts with human globin as potential biomarkers of exposure to styrene. *Proceedings of the Sixth International Symposium on Biological Monitoring in Occupational and Environmental Health*, 122-123, Heidelberg, Německo.

Jágr M. (2005a) Methods for Monitoring of Styrene Exposure. 2. *studentská vědecká konference*. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova, Praha, Česká Republika.

Jágr M., Mráz J., Ctibor K., Stránský V., Pospíšil M. (2005b) Preparation and characterization of styrene oxide adducts with amino acids in human globin. *Biomed. Papers* 149/1, 82-86.

Jágr M., Mráz J., Stránský V. (2006a) Analysis of styrene oxide adducts with amino acids in human globin. *Proceedings of the 11-th Interdisciplinary Slovak and Czech Toxicology Conference* 32, Trenčianské Teplice, Slovensko.

Jágr M., Mráz J., Ctibor K., Stránský V., Pospíšil M. (2006b) Preparation and characterization of styrene oxide adducts with amino acids in human globin. *Chem. Listy* 100, 387.

Jágr M., Mráz J., Stránský V. (2006c) Identification and analysis of styrene oxide adducts with amino acids in human globin. *Toxicol. Letters* 164S, 256.

Jágr M., Mráz J., Stránský V. (2007a) Vývoj metody pro stanovení aduktů styren oxidu v lidském globinu. *Chem. Listy* 101, 441.

Jágr M., Mráz J., Linhart I., Stránský V., Pospíšil M. (2007b) Synthesis and characterization of Styrene Oxide Adducts with Cysteine, Histidine, and Lysine in Human Globin. *Chem. Res. Toxicol.* 20/10, 1442-1452.

9. SEZNAM ZKRATEK

ACN	acetonitril
Alb	albumin
APT	z angl. Attached proton test
APS	persíran amonný
Bis	methylen-bis-akrylamid
Boc	<i>tert</i> -butoxykarbonyl
BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
2D	dvojdimenzionální
DMF	N,N-dimethylformamid
DMSO	dimethylsulfoxid
ECF	ethylchlormravenčan
EO	ethylenoxid
EO-His	adukty ethylenoxidu s histidinem
EO-Val	adukty ethylenoxidu s valinem
ESI	elektrosprejová ionizace
Gb	globin
GC	plynová chromatografie
GC-FID	plynová chromatografie s plamenovým ionizačním detektorem
GC/MS	plynová chromatografie - hmotnostní spektrometrie
Hb	hemoglobin
HFB	heptafluorbutanol
HMBC	z angl. Heteronucleat multiple bond correlation
HMQC	z angl. Heteronuclear multiple quantum coherence
21HPE	1-fenyl-2-hydroxyethyl
22HPE	2-fenyl-2-hydroxyethyl
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HPLC-UV	HPLC s UV spektrofotometrickým detektorem
iBuCF	isobutylchlormravenčan
LC/MS	kapalinová chromatografie – hmotnostní spektrometrie
LC/MS/MS	kapalinová chromatografie – tandemová hmotnostní spektrometrie
MA	mandlová kyselina

MED	modifikovaná Edmanova degradace
MH	modelový hydrolyzát
M_r	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
MTBSTFA	<i>N-terc</i> -butyldimethylsilyl- <i>N</i> -methyl-trifluoracetamid
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAGE	polyakrylamidová gelová elektroforéza
1-PE	1-fenylethanol
2-PE	2-fenylethanol
PGA	fenylglyoxylová kyselina
PHEMA1	<i>N</i> α -acetyl- <i>S</i> -(1-fenyl-2-hydroxyethyl)cystein
PHEMA2	<i>N</i> α -acetyl- <i>S</i> -(2-fenyl-2-hydroxyethyl)cystein
PO	propylenoxid
PO-Val	adukty propylenoxidu s valinem
Ra-Ni	Raneyův nikl
R_f	retardační faktor
SDS	dodecylsírán sodný
SDS-PAGE	PAGE s přidavkem dodecylsírany sodného
SG	styrenglykol
SIM	selektivní monitorování iontů
S_N1	monomolekulární nukleofilní substituce
S_N2	bimolekulární nukleofilní substituce
SO	styren-7,8-oxid
SO-Asp	adukty styren-7,8-oxidu s asparagovou kyselinou
SO-Cys	adukty styren-7,8-oxidu s cysteinem
SO-Cys- <i>d8</i>	adukty styren-7,8-oxidu- <i>d8</i> s cysteinem
SO- <i>d8</i>	styren-7,8-oxid- <i>d8</i>
SO-Gb	SO-modifikovaný lidský globin
SO-Glu	adukty styren-7,8-oxidu s glutamovou kyselinou
SO-His	adukty styren-7,8-oxidu s histidinem
SO-His- <i>d8</i>	adukty styren-7,8-oxidu- <i>d8</i> s histidinem
SO-Lys	adukty styren-7,8-oxidu s lysinem
SO-Val	adukty styren-7,8-oxidu s valinem
SPE	extrakce tuhou fází

TBDMS	<i>tert</i> -butyldimethylsilyl
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin
TFA	trifluoroctová kyselina
TIC	celkový iontový proud
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TMCS	trimethylchlorsilan
TMS	trimethylsilyl
TOF	průletový analyzátor
Tris	tris(hydroxyethyl)aminomethan
UV	ultrafialový
4-VP	4-vinylfenol