

6. SHRnutí

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. Adukty SO s aminokyselinami histidinem a lysinem byly připraveny alkylací N α -Boc chráněných aminokyselin enantiomery (*R*)-SO nebo (*S*)-SO. Po odštěpení N α -Boc skupiny byly obdrženy adukty N ϵ -(1-fenyl-2-hydroxyethyl)lysin a N ϵ -(2-fenyl-2-hydroxyethyl)lysin, stejně jako N π -(1-fenyl-2-hydroxyethyl)histidin, N π -(2-fenyl-2-hydroxyethyl)histidin, N τ -(1-fenyl-2-hydroxyethyl)histidin a N τ -(2-fenyl-2-hydroxyethyl)histidin. Jednotlivé regioizomery byly ze směsi 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 globulinů 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, N ϵ -(1-fenyl-2-hydroxyethyl)lysin a N τ -(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 globulinu 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.