

Vylučování N7 guaninových a N3 adeninových DNA aduktů
myší močí po inhalaci styrenových par
Excretion of urinary N7 guanine and N3 adenine DNA adducts in
mice after inhalation of styrene

Rigorózní práce

Praha 2010

Mgr. Petr Mikeš

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto rigorózní práci vypracoval samostatně, a že jsem všechny použité prameny řádně citoval.

V Praze dne 21. září 2010

Mgr. Petr Mikeš

Obsah

1 ÚVOD	4
1.1. Styren a jeho využití	4
1.2. Vstup do organismu a zdroje expozice	4
1.3. Biotransformace	4
1.4. Adukty styren-7,8-oxidu s proteiny	6
1.5. Adukty styren-7,8-oxidu s DNA	8
1.5.1. Stanovení DNA aduktů styrenoxidu <i>in vivo</i>	10
2 CÍL PRÁCE	10
3 VÝSLEDKY	11
3.1. N3 adeninové adukty	11
3.2. N7 guaninové adukty	13
4 DISKUSE	16
5 ZÁVĚR	17
6 LITERATURA	18
7 PŘÍLOHA	20

Seznam zkratk

SO	styren-7,8-oxid
SO-Val	adukt styren oxidu na valin
SO-Cys	adukt styren oxidu na cystein
IARC	International Agency for Research on Cancer
ABS	kopolymer acetonitril, butadien, styren
N7 α G	7-(2-hydroxy-1-fenylethyl)guanin
N7 β G	7-(2-hydroxy-2-fenylethyl)guanin
N3 α A	3-(2-hydroxy-1-fenylethyl)adenin
N3 β A	3-(2-hydroxy-2-fenylethyl)adenin,
GSH	glutathion

1 ÚVOD

1.1. Styren a jeho využití

Styren, jehož synonyma jsou ethenylbenzen, vinylbenzen, fenylethylen, má přidělené registrační číslo Chemical Abstracts CAS 100-42-5. Jedná se o bezbarvou kapalinu s tenzí par 867 kPa při 25 °C a bodem varu 145,2 °C. Je velmi málo rozpustný ve vodě (0,3 g.l⁻¹).

Styren je považován za látku mírně až středně toxickou pro člověka a laboratorní zvířata. Po stránce zdravotního dopadu na člověka je nejvýznamnější jeho genotoxicita. U lidí vystavených profesně styrenu byl nalezen zvýšený počet různých typů chromosomových aberací, DNA zlomů, genových mutací aj. Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny IARC (International Agency for Research on Cancer) zařadila styren do skupiny 2 B – možný karcinogen pro lidi¹.

Styren je důležitou chemikálií s ročním objemem výroby okolo 15 milionů tun². Hlavním využitím je výroba polystyrenu, výroba kopolymerů (ABS, styren-butadienová pryž, styren-divinylbenzen) a výroba nenasycených polyesterových pryskyřic. Tyto produkty nacházejí uplatnění ve stavebnictví, gumárenství, v automobilovém průmyslu, při výrobě lodí, nebo potravinových a dalších obalů.

1.2. Vstup do organismu a zdroje expozice

Hlavní bránou vstupu styrenu do organismu jsou dýchací cesty. Údaje o efektivitě zadržení styrenu v lidských plicích se liší, ale vždy je uváděn údaj vyšší než jedna polovina vdechnutého styrenu^{3,4}. Řádově nižší je dermální či orální cesta. Vstup styrenu do organismu je rychlý a je následován širokou distribucí po celém těle. Bylo prokázáno, že nejdelší retencí styrenu v organismu se vyznačuje tuková tkáň^{5,6}.

Expozici člověka styrenu z pohledu velikosti dávky lze rozdělit do dvou základních skupin. První je expozice profesní, jejíž intenzita je výrazně vyšší, než je expozice skupiny neprofesní, tedy běžné populace. Velkoprovozovny vyrábějící syntetické kaučuky, gumy, náterové hmoty a obalový materiál probíhají v uzavřených systémech bez lidské přítomnosti. Zatímco v provozovnách na výrobu laminátových polystyrenových pryskyřic, kde je styren rozpouštědlem i monomerem, dochází k významným expozicím pracovníků. Na těchto pracovištích dosahují koncentrace styrenu v ovzduší několika stovek mg.m⁻³. V této souvislosti je vhodné uvést legislativu ČR opírající se o Nařízení vlády č. 178/2001, ve kterém je pro styren v pracovním ovzduší stanoven nejvyšší přípustný expoziční limit 100 mg.m⁻³ a nejvyšší přípustná krátkodobá koncentrace NPK-P 400 mg.m⁻³.

Běžná populace je rovněž vystavena styrenu, nejvýznamnější expozice jsou zjištěny u aktivních kuřáků. Dalšími nezanedbatelnými zdroji připadajícími v úvahu jsou výfukové plyny motorových vozidel a pyrolýzní procesy při nedokonalém spalování^{5,6}. Nízká expozice styrenu může být také způsobena používáním potravy zabalené v polystyrénovém obalu. Expozice styrenu z pitné vody je zanedbatelná⁵.

1.3. Biotransformace

Prvním a hlavním krokem biotransformace je oxidace dvojně vazby styrenu na epoxidovou skupinu. K tomuto kroku dochází v játrech pomocí cytochromu P450(CYP), jedná se o terminální oxidoreduktasy monoxygenasového systému. Takto je přeměněno na styren oxid více než 95 % absorbované dávky styrenu v organismu⁷.

Hlavní metabolickou cestou je vznik styren-7,8-oxidu (SO). Reaktivita této látky je

o dva řády vyšší než původního styrenu⁸. Samotný SO, vzhledem k prokázaným karcinogenním a mutagenním účinkům, je dle klasifikace IARC zařazen do skupiny 2A, tedy pravděpodobný lidský karcinogen¹.

V molekule SO se vyskytuje chirální uhlík, což vede k existenci dvou enantiomerních forem *R* a *S*. Vznik obou enantiomerů byl potvrzen *in vivo*. Pomocí Amesova testu bylo zjištěno, že mutagenita vůči bakterii *Salmonella typhimurium* je vyšší u *R*-SO⁹.

SO jako silně reaktivní látka je dále majoritně hydrolyticky metabolizována za přítomnosti epoxidhydrólasy na styren glykol. Styren glykol je pomocí dehydrogenasy přeměněn na kyselinu mandlovou případně až na kyselinu fenylglyoxylovou.

SO je ovšem také částečně unášen krví do organismu, kde podléhá dalším reakcím.

Obrázek 1. poskytuje stručný přehled hlavních metabolických cest styrenu a styrenoxidu včetně vyznačení nejvýznamnější cest pomocí zesílených šipek. Velké množství dávky styrenu do lidského těla (90 %) je přeměněno na mandlovou a fenylglyoxylovou kyselinu. Tyto metabolity jsou z organismu vyloučeny močí. Biologické expoziční testy, sledující dávku styrenu, jsou založeny na stanovení, těchto dvou kyselin pomocí metody HPLC s UV detekcí¹⁰⁻¹². Minoritní produkty transformace styrenu (hippurová kyselina a fenylaceturová kyselina) jsou také nalézány v moči.

Stanovení kyseliny mandlové a kyseliny fenylglyoxylové v moči má však svoje úskalí, a to krátký biologický poločas vylučování těchto látek (řádově hodiny). Z této skutečnosti vyplývá, že pomocí tohoto vyšetření nelze stanovit dlouhodobé kumulativní vystavení organismu styrenu, ale ani jednorázovou expozici s odstupem času větším jak 24 hodin.

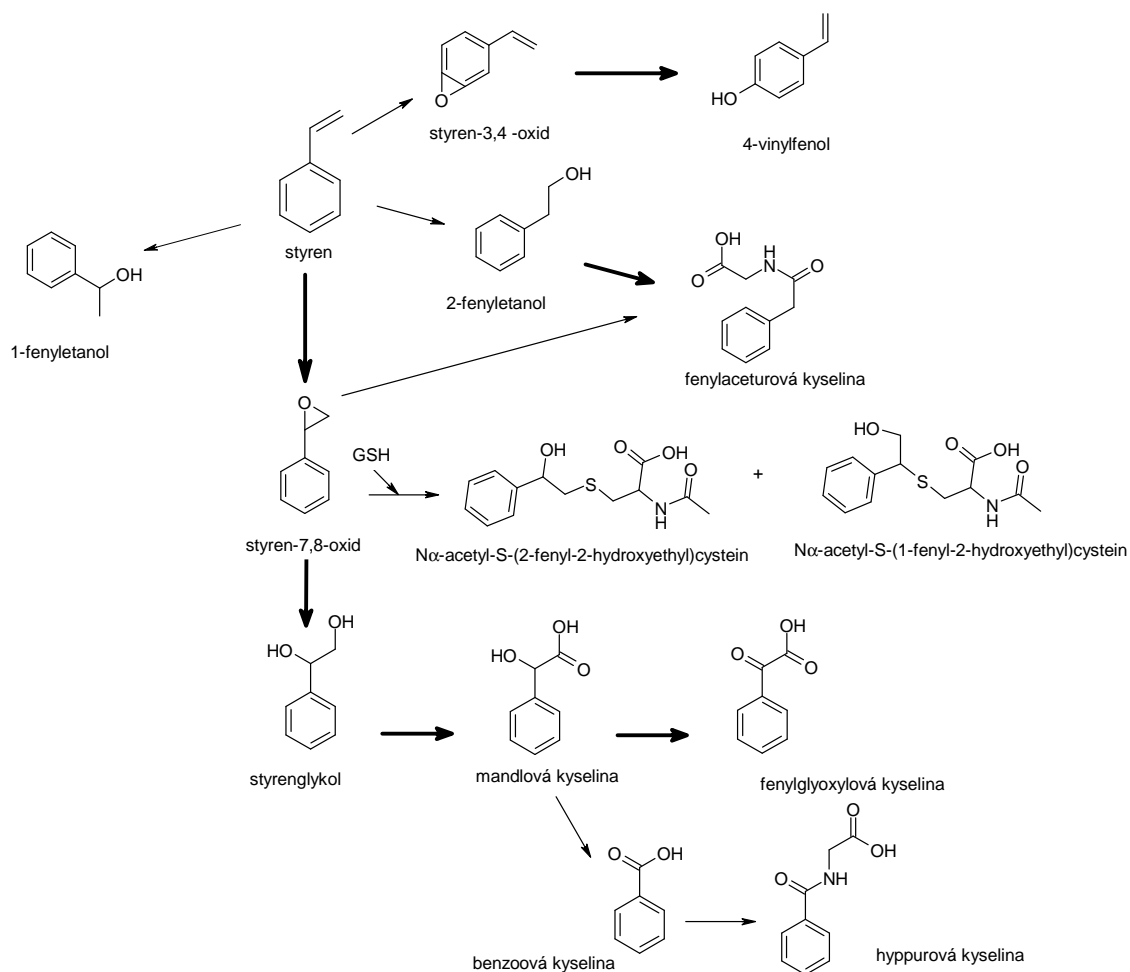
Další minoritní metabolickou cestou SO je jeho reakce s glutathionem, katalyzovaná glutathion-S-transferasami v jaterních buňkách. Takto vzniklé S-konjugáty glutathionu jsou dále přeměněny na merkapturové kyseliny. Byl pozorován vznik dvou regioisomerů, prvním je N-acetyl-S-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)cystein (PHEMA 1) a druhým je N-acetyl-S-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)cystein (PHEMA 2). Pro dokončení výčtu minoritních metabolických cest je nutné uvést i tvorbu styrenoxidu přímo na aromatickém jádře, tedy vznik styren-3,4-oxidu. Ten je vylučován z organismu ve formě 4-vinylfenolu^{13,14,15}.

Při expozičních experimentech se zvířaty je nutné mít na paměti, že metabolismus styrenu je díky enzymatické výbavě rozdílný u lidí a u pokusných hlodavců. Na metabolismu styren-7,8-oxidu se u lidí podílí hlavně isoenzymy CYP2B6, CYP2C8 a CYP2E2, zatímco u potkana převažuje isoenzym CYP2C11/6¹⁶.

U potkana vzniká z 80 % absorbovaného styrenu kyselina mandlová a kyselina fenylglyoxylová a asi dalších 10 % je přeměněno na kyseliny merkapturové^{12,17,18}. U lidí je 95 % styrenu přeměněno na kyselinu mandlovou a kyselinu fenylglyoxylovou, množství kyseliny merkapturové představují pouhé 1 %^{19,20} absorbovaného styrenu.

Hlavní cesty biotransformace styrenu zprostředkovávají enzymy ze skupiny cytochromu P450, epoxidhydrólasy, glutathiontransferasy, u řady jednotlivých isoenzymů byl navíc popsán genetický polymorfismus. Z čehož lze odvodit různou rychlost jednotlivých metabolických reakcí. Následkem je individuální vnímavost k účinkům expozice styrenu.

Z výše zmíněných faktů vyplývá, že je mnoho důvodů, proč se zabývat adukty styren-7,8-oxidu na biomakromolekuly, a to zejména na aminokyseliny obsažené v proteinech či na báze v DNA.



Obr.1 Metabolické cesty styrenu a jeho hlavního metabolitu styren -7,8- oxidu²¹

1.4. Aduktý styren-7,8-oxidu s proteiny

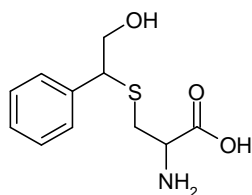
Již v polovině sedmdesátých let minulého století byly provedeny první studie, využívající pro biologické expoziční testy proteinové adukty²². Původně bylo cílem studovat adukty s DNA, ale nakonec byly z detekčních důvodů použity adukty s proteiny, konkrétně s hemoglobinem. V dalších letech bylo prokázáno, že adukty mutagenních látek jsou pozorovány jak na proteinech, tak na DNA. Korelace mezi oběma typy aduktů je velmi dobrá a vzhledem k vysoké koncentraci hemoglobinu v krvi je množství těchto aduktů často mnohem vyšší. Koncentrace hemoglobinu v lidské krvi se pohybuje okolo 150 g.l^{-1} a průměrná životnost erytrocytů je 126 dní u člověka, 60 dní u potkana a 40 dní u myši²³. Druhým nejvíce rozšířeným krevním proteinem je albumin, jehož koncentrace se uvádí v rozmezí $32 - 45 \text{ g.l}^{-1}$ krevní plazmy. Průměrná životnost albuminu je výrazně nižší, životnost lidského se pohybuje okolo 20 dnů, potkaní klesá na 2,5 dne a nejnižší je životnost myšního albuminu, a to necelé 2 dny. Dlouhá doba života erythrocytů se jeví jako cesta pro biologické monitorování dlouhodobých expozic.

SO se ve výše zmíněných proteinech váže obecně na nukleofilní vazebná místa. Jedná se o α -aminoskupinu N-koncové aminokyseliny, o valin v případě globinu, thiolovou skupinu v cysteinu a o dusíky imidazolového kruhu v histidinu²⁴⁻²⁶. Možnými místy styren oxidového ataku je také hydroxylová skupina serinu a ϵ -amino skupina lysinu²¹.

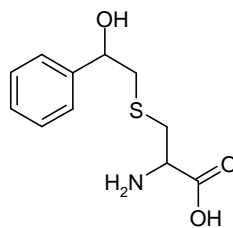
Při testování aduktů na hemoglobin se začíná odstraněním hemu s následným štěpením globinů na jednotlivé aminokyseliny. Bylo zjištěno, že až na výjimky je doba životnosti aduktů na aminokyseliny delší než životnost samotného hemoglobinu. Navíc u hemoglobinu nedochází k selektivnímu enzymatickému odbourávání na rozdíl od DNA, kde reparačním mechanismem jsou báze s adukty z DNA odštěpovány. Tedy sledování globinových aduktů lze použít pro sledování dlouhodobé a kumulativní expozice styrenu. Mezi metody používané pro stanovení aduktů patří v první řadě modifikovaná Edmanova degradace. Principem je odbourávání N-koncové aminokyseliny v případě globinu se jedná o valin za pomoci arylisokyanátů či arylisothiokyanátů v mírně alkalickém prostředí. Po odštěpení je látka převedena na cyklickou formu a selektivně extrahována s následnou detekcí pomocí GC-MS v negativním módu chemické ionizace^{27,28}. Poměr N-koncového SO-Val aduktu k celkovému množství styrenoxidových aduktů na hemoglobin byl stanoven na 3 %²⁹. Tato metoda se do dnešní doby potýká s nevýhodou malého výtěžku, což komplikuje kvantitativní stanovení.

Pokud se styrenoxid naváže na síru obsaženou v cysteinu, lze jej použitím Raneyova niklu uvolnit ve formě 1-fenylethanolu a 2-fenylethanolu, které jsou po extrakci stanoveny metodou plynové chromatografie³⁰. Při měření vzorků profesně exponovaných lidí byla zjištěna dobrá korelace mezi koncentrací aduktů SO-Cys v sérovém albuminu a velikostí expozice styrenu. Nevýhodou této metody je nenalezení podobné korelace u hemoglobinu a navíc zvýšeným obsahem obou fenylethanolů při použití Raneyova niklu ve srovnání s kontrolní neexponované skupinou^{31,32}.

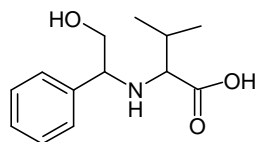
Novější metodou je fragmentace hemoglobinu vystaveného styrenoxidu pomocí enzymu trypsinu *in vitro* a vzniklé štěpy jsou analyzovány pomocí LC-MS. Bylo zjištěno, že nejvíce aduktů bylo na β -His 143 a α -His 20. Dále v pořadí byl cysteinový adukt β -Cys 93³³. Při vyšší koncentraci styren oxidu byly adukty nalezeny také na β -His 77, β -His 97, α Val 1 a β -Val 1¹⁰. Návazné studie se zabývaly navýšením poměru styrenoxidu k hemoglobinu a sledovaly, jaké aminokyseliny jsou nejčastěji atakovány. Z těchto studií plyne, že při nízkých koncentracích styrenoxidu jsou primárním cílem ataku histidin, následován cysteinem, a teprve pak přichází na řadu N-koncový valin. Přehled nejčastěji nalezených aduktů na aminokyseliny je uveden na obrázku č.2. Při experimentech s nadbytkem styrenoxidu ještě vyšším než v předchozí studii se objevily navíc adukty na lysin²⁴.



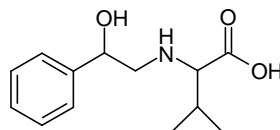
S-(1-fenyl-2-hydroxyethyl)cystein



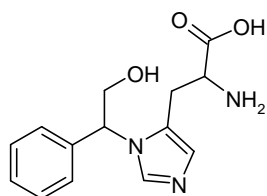
S-(2-fenyl-2-hydroxyethyl)cystein



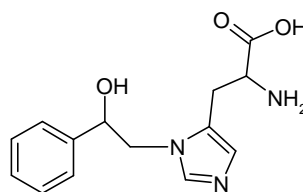
N α -(1-fenyl-2-hydroxyethyl)valin



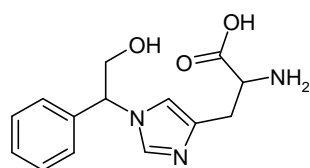
N α -(2-fenyl-2-hydroxyethyl)valin



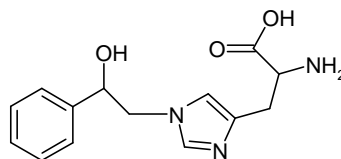
N π -(1-fenyl-2-hydroxyethyl)histidin



N π -(2-fenyl-2-hydroxyethyl)histidin



N τ -(1-fenyl-2-hydroxyethyl)histidin



N τ -(2-fenyl-2-hydroxyethyl)histidin

Obr.2 Přehled nejčastěji nalezených aduktů styren-7,8-oxidu na aminokyseliny

1.5. Aduky styren-7,8-oxidu s DNA

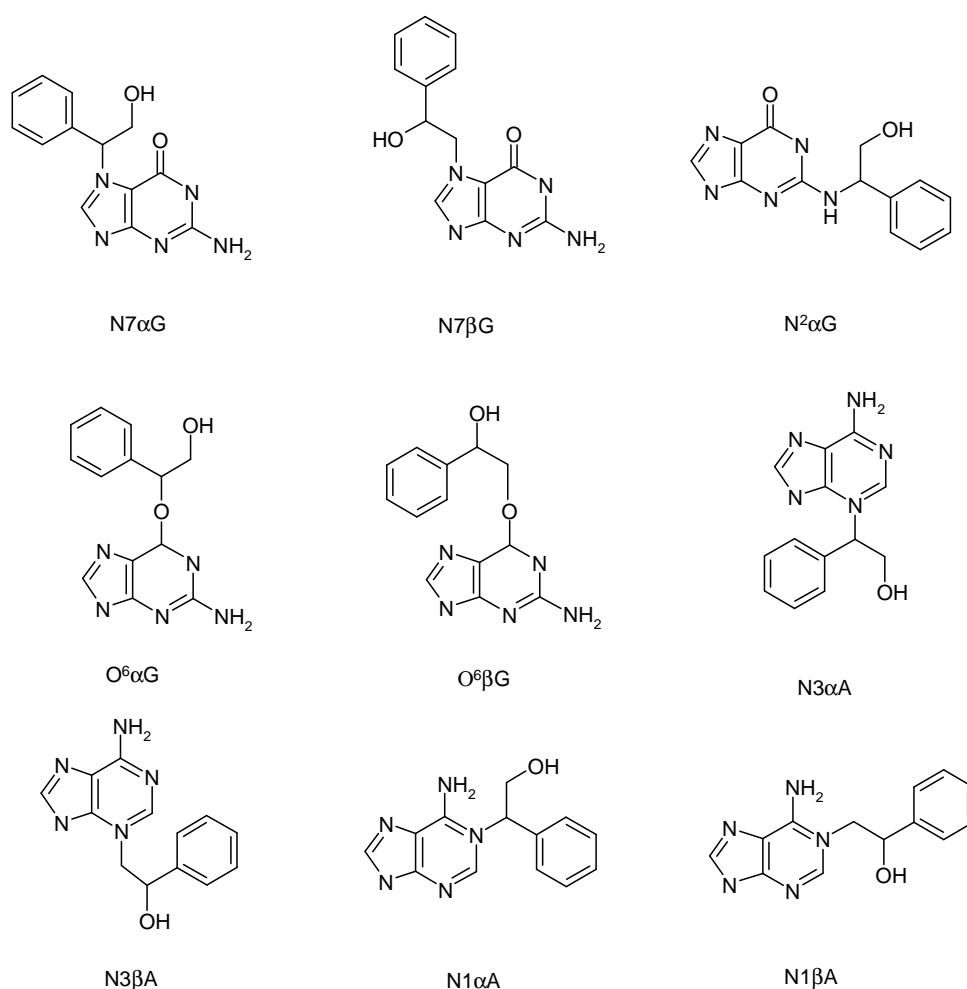
Obecně platí, že četnost výskytu aduktů na DNA je přímým měřítkem biologického účinku potenciálního karcinogenu. Vzniklá změna v struktuře báze DNA může vést ke změně sekundární struktury DNA, ke zlomům ve vlákně dvoušroubovice, k mutaci nebo chromosomálnímu přeskupení. V případě, že před DNA replikací nedojde k opravě, může tato změna vést k chybnému přiřazení komplementární báze. To se ve svém konečném důsledku může promítnout v syntéze modifikovaného proteinu. Mutace v protoonkogenu či tumor potlačujícím genu může způsobit klonování buněčné populace s neřízenou proliferací. Důkazy o vztahu mezi DNA adukty a rakovinou přehledně shrnul ve své práci Poirier³⁴. Detekované DNA adukty v moči jsou biologickým ukazatelem efektivní dávky, reflektující tu část primárně vzniklých aduktů, která byla spontánně nebo působením opravných mechanismů odštěpena z molekuly DNA a vyloučena z těla ledvinami do moči³⁵.

Styren oxid se váže na nukleofilní místa v DNA podobně jako na ostatní biomolekuly. Obecně nejvíce napadanou složkou DNA je guanin následován adeninem³⁶. Z *in vitro* testů plyne, že se tvoří hlavně adukty styrenoxidu v následujících místech guaninu N-7, N² a O⁶. Z toho adukty v pozici N7 představují 93 %. U adeninu je převažujícím místem N3³⁷ následován N1, jak popisuje Koskinen³⁸. U všech

zmíněných aduktů je styrenoxid navázán přes α uhlík epoxidové skupiny. Adukt s β pozicí epoxidové skupiny byl pozorován u všech výše uvedených aduktů kromě N^2 guaninového aduktu. Struktury *in vitro* nalezených purinových aduktů včetně zkratk 7-(2-hydroxy-1-fenylethyl)guanin ($N7\alpha G$); 7-(2-hydroxy-2-fenylethyl)guanin ($N7\beta G$); 2N-(2-hydroxy-1-fenylethyl)guanin ($N^2\alpha G$); 6O-(2-hydroxy-1-fenylethyl)guanin ($O^6\alpha G$); 6O-(2-hydroxy-2-fenylethyl)guanin ($O^6\beta G$); 3-(2-hydroxy-1-fenylethyl)adenin ($N3\alpha A$) and 3-(2-hydroxy-2-fenylethyl)adenin ($N3\beta A$), 1-(2-hydroxy-1-fenylethyl)adenin ($N1\alpha A$) and 1-(2-hydroxy-2-fenylethyl)adenin ($N1\beta A$) jsou uvedeny na obr. 3

$N1$ adeninový adukt posléze podléhá buď Dimrothovu přesmyku za vzniku $N6$ -SO-adeninu nebo se deaminuje za vzniku $N1$ -styrenoxidu hypoxanthinu³⁹.

Navázáním styrenoxidu na puriny dochází ke vzniku pozitivního náboje na imidazolovém kruhu, což usnadní hydrolýzu vedoucí k uvolnění aduktů - depurinaci.



Obr.3 Struktury *in vitro* nalezených purinových aduktů

Působením styrenoxidu jsou napadány také pyrimidinové báze, *in vitro* byly nalezeny adukty s cytosinem v pozicích $N3$, O^2 , N^4 , a v případě uracilu a thyminu je místem ataku dusík $N3$ ³⁸.

1.5.1. Stanovení DNA aduktů styrenoxidu *in vivo*

V roce 2006 byl poprvé publikován článek s nálezem N7-SO-guaninové aduktů v moči po expozici styrenu *in vivo*⁴⁰. Autoři se zabývali sledováním N7-SO-guaninových aduktů v plicích - orgánu vstupu styrenu do organismu, v játrech - místu, kde dochází ke vzniku SO a následné biotrasformaci a v moči, do níž se očekávala exkrece sledovaných aduktů. Důvodem pro sledování N7-SO-guaninových aduktů byly literární údaje, ze kterých plyne, že při *in vitro* testech představují N7-SO-guaninové adukty 93 % veškerých alkylací na DNA³⁶. Při zaměření se na část věnovanou aduktům SO nalezených v moči, lze experiment a jeho výsledky shrnout následovně.

NMRI myši byly vystaveny styrenu po dobu tří týdnů o dvou koncentračních hladinách (750 a 1500 mg.m⁻³) a kontrolní skupině bez expozice styrenu. Styrenovým parám byly myši vystaveny každý den po dobu 6 hodin v časovém intervalu tří týdnů bez přestávky. Vzorek směsné moči z šesti či sedmi zvířat byl sbírán každý den po ukončení expozice až do začátku následující expozice. Ke vzorku této směsné moči byl přidán vnitřní standard (β N9-SO-guanin) a tato směs byla okyselena na pH 2. Následovala dvojnásobná extrakce octanem ethylnatým. Hodnota pH vodné vrstvy po odpaření zbytků octanu ethylnatého byla pomocí amoniaku upravena na pH 6,2 - 6,4 a vzorek byl nanesen na SPE kolonku Discovery DSC-18. Po promytí vodou následovala eluce 60% metanolem, případně doplněná vymytím pomocí čistého methanolu. Po zakoncentrování vzorku na vakuové odparce byl koncentrát nastříknut do kapalinového chromatografu s reversní fází C18 a jako detektor byl využit hmotnostní detektor s ionizací pomocí elektrospreje v SRM modu.

Nalezené guaninové adukty představovaly celkově $1,0 \cdot 10^{-5}$ % absorbované dávky styrenu. Poměr mezi α a β isomerem N7-SO-guaninových aduktů byl u nižší koncentrační hladiny inhalovaného vzduchu 32 : 68 a u vyšší koncentrační úrovně to bylo 41 : 59. Byla potvrzena korelace mezi celkovou absorbovanou dávkou styrenu a celkovou exkrecí N7-SO guaninových aduktů do moče.

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo potvrzení nálezu N7-SO-guaninových aduktů v myší moči po expozici styrenu a vyvinutí metody pro stanovení N3-SO-adeninových aduktů a jejich potenciální stanovení v moči exponovaných zvířat.

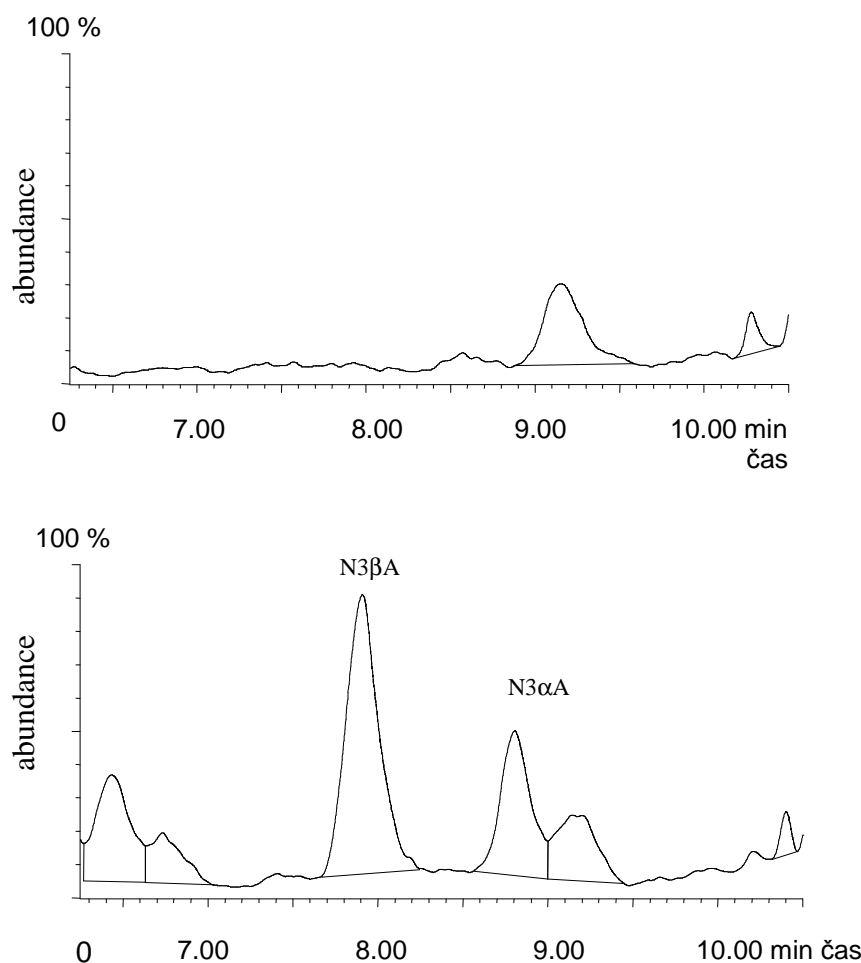
Experimentální podmínky, výčet použitého materiálu a popis přípravy vzorků a HPLC/MS/MS metody jsou uvedeny v Příloze.

Pro upřesnění uspořádání experimentu je vhodné dodat, že byl proveden na pěti skupinách zvířat o počtu šesti jedinců. Klec označená číslem 1 byla kontrolní. Moče z této klece byly využity pro jednotlivé kroky validace metody a pro kalibraci a blank při samotném měření. Klece s označením 2 a 5 byly vystaveny koncentracím styrenu 600 mg.m⁻³ a klece 3 a 4 dvojnásobné koncentraci tedy 1200 mg.m⁻³. Jelikož se neočekávaly významné rozdíly v koncentracích v období mezi třetím až desátým dnem expozice, byly vzorky pospojovány z dnů 3 - 4, 5 - 7 a 8 - 10. Vzhledem k poločasů života N7-SO-guaninových aduktů a výsledkům práce autorů z roku 2006⁴⁰, byla sbírána moč pouze jeden den po ukončení expozice.

3 VÝSLEDKY

3.1. N3 adeninové adukty

Pro snížení matricového efektu a přečištění biologického materiálu bylo vyvinuto několik kroků. Prvním krokem bylo vysrážení přirozených složek moče pomocí silného okyselení trichloroctovou kyselinou. Následovala centrifugace a bylo ověřeno, že sledované analyty zůstávají v supernatantu. Po upravení pH supernatantu na hodnotu 10,5, bylo přistoupeno k druhému čistícímu kroku - extrakci na pevné fázi s použitím extrakční kolonky HLB. Při uvedeném pH byly oba adukty dokonale zachyceny. Kolonka byla promyta 20% methanolem v 1% hydrogenuhličitanu sodném, za těchto podmínek nedocházelo k vymytí sledovaných analytů. Následovala eluce analytů směsí acetonitril : methanol v poměru 7 : 3. Eluát byl odpařen do sucha pod proudem inertního plynu. Po rekonstrukci v startovacím složení mobilní fáze byl vzorek injektován do LC-MS. Kalibrace metody byla provedena přidáním standardů ke směsnému vzorku neexponované moče v rozsahu 0,01 - 2 ng.ml⁻¹ moče. Její linearita v uvedeném rozpětí splňovala požadavek na korelační koeficient $R^2 > 0,99$. Při zohlednění poměru velikosti odezvy na koncentrační jednotku se jako optimální jevílo šestinásobné zakoncentrování vzorku (vztaženo k původnímu vzorku moči). Rozdělení α a β aduktu nebylo jednoduché a vyžadovalo velmi plochý gradient (nárůst organické fáze 1 % za minutu), který musel zároveň umožnit separaci interferujícího píku od píku N3 α A. Chromatogramy blanku a exponované moče jsou uvedeny na obrázku 4.



Obr.4 Chromatogramy přechodu 256>136, horní blank, spodní exponovaný vzorek. Retenční čas N3 β A byl 7,91 min a u N3 α A byl retenční čas 8,80 min.

Po nalezení tohoto optima, byly touto metodou zanalyzovány vzorky myší moči po expozici styrenu. Výsledky získané ze směsné moči šesti zvířat jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka č. 1 Koncentrace a množství vyloučených adeninových aduktů

Den pokusu	Číslo klece	Styren konc. [mg.m ⁻³]	Koncentrace [ng.ml ⁻¹]		Vylučování [ng.kg ⁻¹ .den ⁻¹]			Vylučování [pmol.kg ⁻¹ .den ⁻¹]		
			N3βA	N3αA	N3βA	N3αA	N3βA+N3αA	N3βA	N3αA	N3βA+N3αA
1	2	600	0,14	0,04	34,6	9,1	43,7	135,1	35,6	132,9
	5	600	0,09	0,03	18,6	5,8	24,4	72,6	22,6	
2	2	600	0,16	0,05	33,5	10,7	44,2	130,9	41,7	135,1
	5	600	0,08	0,03	17,8	7,2	25,0	69,4	28,3	
3-4	2	600	0,05	0,02	10,5	3,6	14,1	40,8	14,2	41,9
	5	600	0,02	0,01	4,4	2,9	7,4	17,2	11,5	
5-7	2	600	0,07	0,02	13,9	5,0	18,9	54,3	19,4	68,0
	5	600	0,06	0,02	11,2	4,7	15,9	43,9	18,3	
8-10	2	600	0,08	0,03	16,0	5,5	21,6	62,7	21,7	72,8
	5	600	0,05	0,03	10,3	5,4	15,7	40,3	20,9	
11	2	600	ND	ND						
	5	600	ND	ND						
1	3	1200	0,11	0,03	19,1	6,2	25,3	74,6	24,2	265,0
	4	1200	0,40	0,15	81,1	29,2	110,3	317,1	114,1	
2	3	1200	0,33	0,10	91,3	26,8	118,1	356,8	104,7	303,9
	4	1200	0,09	0,07	21,2	16,2	37,4	82,9	63,3	
3-4	3	1200	0,14	0,07	29,3	13,7	43,0	114,3	53,6	151,6
	4	1200	0,10	0,05	22,5	12,1	34,6	87,9	47,4	
5-7	3	1200	0,15	0,06	31,8	13,2	45,0	124,4	51,5	176,5
	4	1200	0,18	0,07	32,2	13,2	45,4	125,7	51,6	
8-10	3	1200	0,11	0,05	25,7	11,8	37,5	100,4	46,0	145,3
	4	1200	0,11	0,05	24,9	12,0	36,9	97,3	46,8	
11	3	1200	ND	ND						
	4	1200	ND	ND						

ND- pod mez detekce

Z hodnot uvedených v tabulce 1 byl stanoven průměrný poměr mezi N3αA a N3βA adukty, zvláště pro nižší a zvláště pro vyšší koncentraci, hodnoty byly 27 : 73 a 29 : 71. Byly tedy vždy ve prospěch β adeninového aduktu. Dalším důležitým poznatkem je fakt, že již první den po skončení expozice styrenu došlo k poklesu koncentrací analytů v moči pod mez detekce.

Byl proveden výpočet celkového denního absorbovaného množství styrenu do organismu pokusných zvířat. Pro výpočet byly použity následující údaje – efektivita zadržky styrenu v myších plicích *R* je rovna 55 % vdechované dávky, ventilace je 25 ml.min⁻¹ u 25 g myši⁴¹. Prostým převodem na kilogram zvířete získáme ventilaci odpovídající hypotetickému zvířeti o hmotnosti jednoho kg ve výši jednoho l.min⁻¹. Zvířata byla po dobu 6 hodin vystavena koncentraci styrenu buď 600 mg.m⁻³, což odpovídá 0,6 mg.l⁻¹ a nebo 1200 mg.m⁻³, po převodu 1,2 mg.l⁻¹.

Výpočet dávky styrenu na kilogram zvířete:

$$D = R \cdot V^* \cdot c \cdot t$$

R – účinnost retence

V^* - objem vdechovaného vzduchu za jednotku času na jednotku tělesné hmotnosti zvířete [$\text{l} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$]

c - koncentrace v ovzduší [$\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$]

t – čas expozice [min]

Pomocí výše uvedeného vztahu byla stanovena denní dávka styrenu u nižší koncentrace na 119 mg kg^{-1} , tedy $1,14 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ a u vyšší byla dvojnásobná, $238 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, neboli $2,28 \text{ mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$.

Z celkové dávky styrenu do organismu a z množství aduktů vyloučených organismem do moče bylo stanoveno procento, které odpovídá přeměně na jednotlivé adukty v organismu viz tabulka č. 2

Tabulka č. 2 Dávka styrenu kumulativní nálezy vyloučených purinových aduktů

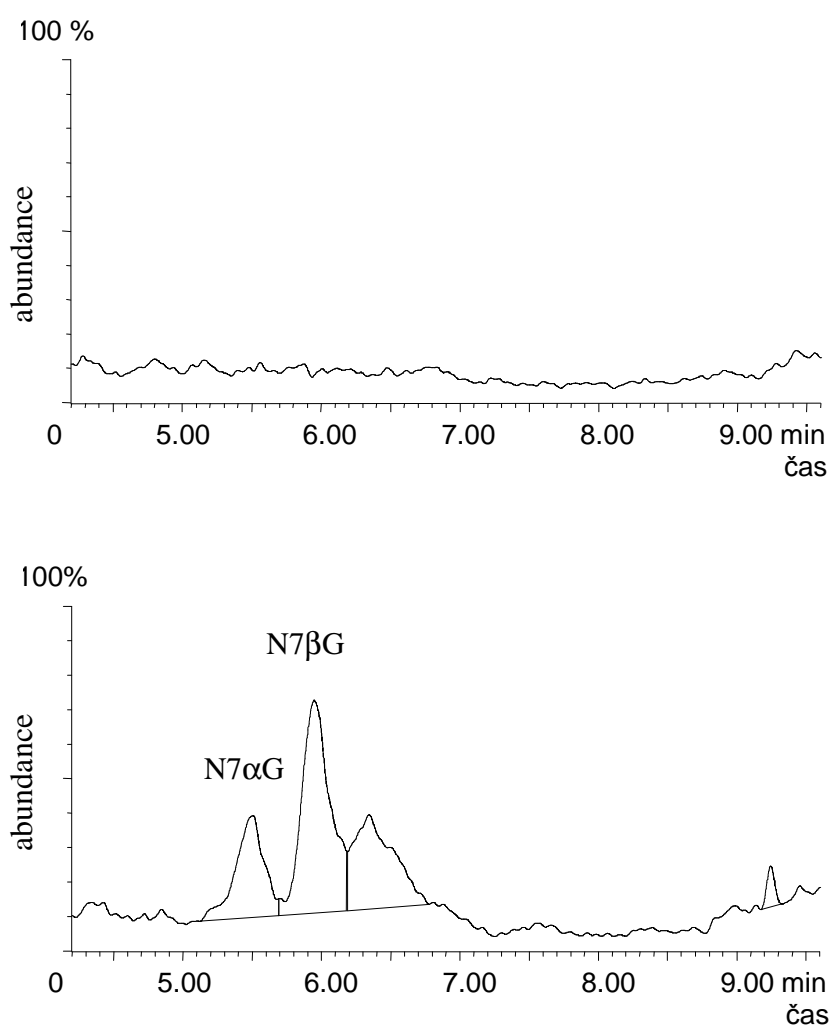
Koncentrace styrenu [$\text{mg} \cdot \text{m}^{-3}$]	Den expozice	Dávka styrenu [$\text{mmol} \cdot \text{kg}^{-1}$]	Vyloučené adeninové adukty		Vyloučené guaninové adukty	
			[$\text{pmol} \cdot \text{kg}^{-1}$]	% dávky	[$\text{pmol} \cdot \text{kg}^{-1}$]	% dávky
600	1	1,14	133	$1,17 \cdot 10^{-5}$	113	$9,91 \cdot 10^{-6}$
	2	2,28	268	$1,18 \cdot 10^{-5}$	304	$1,33 \cdot 10^{-5}$
	4	4,56	352	$7,72 \cdot 10^{-6}$	668	$1,46 \cdot 10^{-5}$
	7	7,98	556	$6,97 \cdot 10^{-6}$	1123	$1,41 \cdot 10^{-5}$
	10	11,40	775	$6,80 \cdot 10^{-6}$	1607	$1,41 \cdot 10^{-5}$
	11	11,40	775	$6,80 \cdot 10^{-6}$	1671	$1,47 \cdot 10^{-5}$
1200	1	2,28	265	$1,16 \cdot 10^{-5}$	311	$1,36 \cdot 10^{-5}$
	2	4,56	569	$1,25 \cdot 10^{-5}$	792	$1,74 \cdot 10^{-5}$
	4	9,12	873	$9,57 \cdot 10^{-6}$	1484	$1,63 \cdot 10^{-5}$
	7	15,96	1404	$8,80 \cdot 10^{-6}$	2252	$1,41 \cdot 10^{-5}$
	10	22,80	1839	$8,07 \cdot 10^{-6}$	3104	$1,36 \cdot 10^{-5}$
	11	22,80	1839	$8,07 \cdot 10^{-6}$	3253	$1,43 \cdot 10^{-5}$

Z výše uvedené tabulky je patrná dávková závislost mezi vstupem styrenu do organismu a jeho vylučováním v podobě adeninových aduktů. Procento dávky přeměněné na adeninové adukty je u obou koncentračních hladin podobné.

3.2. N7 guaninové adukty

U N7 guaninových aduktů nebylo možné nalézt podmínky pro dostatečný záchyt a efektivní eluci, při použití stejného sorbentu jako u adeninových aduktů. Z tohoto důvodu byla pro přečištění použita separace na SPE kolonce s typem sorbentu C18 podobně jako u práce autorů Vodička a spol⁴⁰. Vzorek byl okyselen pomocí mravenčí kyseliny a nanesen na kolonku Sep-Pak Vac tC18. Kolonka byla předem promyta 2% mravenčí kyselinou. Při tomto uspořádání byly oba adukty dostatečně zachyceny. Následovaly dvě promytí, první 2% roztokem mravenčí kyseliny ve vodě a druhý 10% methanolem ve vodě s 2% mravenčí kyseliny. Eluce guaninových aduktů byla provedena 22% methanolem okyseleným 2% mravenčí kyselinou. Poté byl vzorek odpařen do sucha a posléze rozpuštěn v 25% methanolu. Kalibrace byla provedena

přidáním standardů do směsného vzorku kontrolní moče v rozsahu $0,05 - 5 \text{ ng.ml}^{-1}$ moče pro $\text{N7}\beta\text{G}$ a $0,08 - 5 \text{ ng.ml}^{-1}$ moče pro $\text{N7}\alpha\text{G}$. Linearita v tomto rozsahu splňovala požadavek na korelační koeficient $R^2 > 0,99$. Meze detekce byly stanoveny v případě $\text{N7}\beta\text{G}$ ve výši $0,02 \text{ ng.ml}^{-1}$ a $0,03 \text{ ng.ml}^{-1}$ v případě $\text{N7}\alpha\text{G}$. Chromatogram blanku a exponované moče včetně chromatografických podmínek je uveden na obrázku 5. Celkové zakoncentrování vzorku bylo nevhodnější dvojnásobné. Rozdělení α a β aduktů bylo komplikované a nedocházelo k němu i při použití velmi málo strmých gradientů, proto bylo rozdělení provedeno za isokratických podmínek. V exponovaných vzorcích se za píkem $\text{N7}\beta\text{G}$ vyskytla neznámá interference, která u kontrolních močí nebyla pozorována. Struktura této látky nebyla zjištěna. Výsledky naměřené u N7 guaninových aduktů jsou uvedeny v tabulce č.3



Obr.5 Chromatogramy přechodu $272>152$, horní blank, spodní exponovaný vzorek. Retenční čas $\text{N7}\alpha\text{G}$ byl 5,51 min a v případě $\text{N7}\alpha\text{A}$ byl retenční čas 5,95 min.

Z hodnot uvedených v tabulce č.3 byl stanoven průměrný poměr N7αG : N7βG aduktu, opět zvlášť pro každou koncentraci, zjištěné průměrné poměry jsou 51 : 49 pro 600 mg.m⁻³ a 47 : 53 pro 1200 mg.m⁻³.

Po skončení expozice styrenem byl zaznamenán pokles nálezů přibližně na poloviční hodnotu předchozího dne. I u guaninových aduktů byl proveden stejný výpočet pro zjištění procenta celkové dávky styrenu, které bylo přeměněno na jednotlivé adukty a vyloučeno organismem do moče viz tabulka č. 2.

Z tabulky 2. stejně jako v případě adeninových aduktů lze vyčíst dávkovou závislost mezi vstupem styrenu do organismu a jeho vylučováním v podobě guaninových aduktů. Procento dávky přeměněné na guaninové adukty je pro obě testované expozice téměř totožné.

Tabulka č. 3 Koncentrace a množství vyloučených guaninových aduktů

Den pokusu	Číslo klece	Styren konc. [mg.m ⁻³]	Koncentrace [ng.ml ⁻¹]		Vylučování [ng.kg ⁻¹ .den ⁻¹]			Vylučování [pmol.kg ⁻¹ .den ⁻¹]		
			N7αG	N7βG	N7αG	N7βG	N7αG+N7βG	N7αG	N7βG	N7αG+N7βG
1	2	600	0,03*	0,08	7,2	19,2	26,4	26,5	70,6	113,1
	5	600	0,07*	0,10	14,5	20,6	35,1	53,2	75,9	
2	2	600	0,11	0,16	23,5	34,1	57,6	86,3	125,5	190,6
	5	600	0,10	0,11	21,9	24,1	46,1	80,7	88,7	
3-4	2	600	0,09	0,11	19,2	23,5	42,7	70,6	86,3	182,2
	5	600	0,13	0,10	31,9	24,5	56,4	117,2	90,2	
5-7	2	600	0,11	0,10	22,8	20,7	43,5	83,9	76,2	155,1
	5	600	0,11	0,09	22,5	18,4	40,8	82,6	67,6	
8-10	2	600	0,11	0,10	21,0	19,1	40,1	77,3	70,3	157,7
	5	600	0,13	0,10	25,8	19,9	45,7	94,9	73,0	
11	2	600	0,04*	0,05	7,8	9,0	16,8	28,7	33,1	63,80
	5	600	0,04*	0,06	6,9	11,0	17,9	25,3	40,5	
1	3	1200	0,11	0,21	20,0	38,2	58,2	73,6	140,4	310,6
	4	1200	0,20	0,35	40,3	70,5	110,7	148,1	259,2	
2	3	1200	0,15	0,33	41,9	92,1	134,0	154,0	338,9	481,4
	4	1200	0,28	0,28	63,9	63,9	127,8	235,0	235,0	
3-4	3	1200	0,16	0,22	32,7	45,0	77,7	120,4	165,5	345,5
	4	1200	0,24	0,25	54,0	56,2	110,2	198,5	206,7	
5-7	3	1200	0,15	0,17	32,9	37,3	70,2	121,1	137,2	255,4
	4	1200	0,19	0,19	34,3	34,3	68,7	126,3	126,3	
8-10	3	1200	0,13	0,13	31,2	31,2	62,4	114,8	114,8	283,3
	4	1200	0,21	0,18	49,3	42,3	91,6	181,5	155,5	
11	3	1200	0,09	0,09	20,1	20,5	40,7	73,9	75,6	149,4
	4	1200	0,10	0,09	21,1	19,5	40,6	77,7	71,6	

* výsledky se nacházejí mezi mezí detekce a mezí stanovitelnosti a jsou zatíženy závažnou chybou

4 DISKUSE

Nalezené hodnoty vyloučených guaninových aduktů vztažených na dávku styrenu v této studii byly od 1,0 až $1,7 \cdot 10^{-5}$ %, jsou srovnatelné s výsledky dříve publikovanými⁴⁰. Ve zmiňované studii byly uvedeny hodnoty vztažené na dávku v rozmezí od 0,8 až $3,1 \cdot 10^{-5}$ % ovšem s tím, že nejvyšší hodnoty byly zjištěny v kumulovaných vzorcích z prvního a druhého dne expozice. V obou studiích je patrný nárůst hodnot na začátku. Vynechají-li se první dva dny expozice, kdy si zvířata postupně zvykají na přítomnost par styrenu v ovzduší, dostáváme rozmezí hodnot 1,4 až $1,6 \cdot 10^{-5}$ % v této studii a 0,8 až $1,6 \cdot 10^{-5}$ % ve srovnávané studii. Tedy zlepšení již dobré shody.

V této práci byly poprvé *in vivo* nalezeny adeninové adukty v moči po expozici parám styrenu. Výše nálezů adeninových aduktů byla překvapivě vysoká a převýšila očekávání opírající se o výsledky *in vivo* testů³⁷. Při srovnání celkového množství guaninových a adeninových aduktů vztažených na kilogram váhy zvířete, tvořily adeninové adukty z obou expozic více než 50 % množství guaninových aduktů, přičemž při vyšší expozici bylo dosaženo hodnot přesahujících 56 %.

Možným vysvětlením zvýšeného množství adeninových aduktů vzhledem k guaninovým aduktům je rozdílná reaktivita SO *in vivo* a v *in vitro* testech. Navíc guaninové adukty po odštěpení z DNA mohou být dále metabolizovány ve větší míře než adeninové.

Při hodnocení časového průběhu množství nalezených aduktů je zřejmé, že k jejich tvorbě docházelo od prvního dne expozice s tím, že maximum bylo dosaženo druhý den, pak nastala stabilizace hladin aduktů. V prvních dvou dnech byly pozorovány zvýšené hodnoty směrodatných odchylek vylučovaného množství vztaženého na kilogram u obou aduktů. Toto mohlo být způsobeno několika faktory. Rozdílnou individuální reakcí na vyšší koncentraci styrenu. Byla pozorována velká variabilita v pohybové aktivitě pokusných zvířat, která byla u všech zvířat první den výrazně nižší než po zbylé dny experimentu. Fyzická aktivita silně ovlivňuje množství inhalovaného vzduchu, a tím i absorbovanou dávku. Navíc schopnost adaptace jednotlivých zvířat na expozici a jejich různá metabolická aktivita může vést k velkým interindividuálním rozdílům v metabolismu i ve vylučování DNA aduktů. Tyto faktory by bylo možné omezit opakovanou expozicí stejných zvířat po dostatečné rekonvalescenci po předchozím pokusu a interindividuální rozdíly lze snížit navýšením počtu zvířat ve skupině.

Poměr α a β aduktů adeninu byl v měřených vzorcích relativně stálý a průměrná hodnota pro obě expozice byla 28 : 72. Tento poměr je v relativní shodě s *in vitro* experimentem, kde byl poměr stanoven na 34 : 66³⁷.

U guaninových aduktů byl v této studii vzájemný poměr mnohem méně stabilní jak v rámci výsledků z jednotlivých expozic, tak při vzájemném srovnání obou expozic. Tento jev byl pozorován také u výsledků studie autorů z roku 2006⁴⁰. Jelikož *in vitro* testy byly prováděny při vysokých koncentracích styrenoxidu, je vhodné porovnat pouze výsledky s nejvyšší dávkou, tedy α : β v případě *in vitro* bylo 44 : 56³⁷, u *in vivo* studie z roku 2006 autoři uvedli poměr 41 : 59 a v této studii byl průměrný poměr aduktů roven 47 : 53.

Rychlejší pokles koncentračních hladin u adeninových aduktů než u guaninových aduktů po skončení expozice je zcela v souladu s literárně udávanými poločasy života

získaných při *in vitro* testech. Nejkratší je u N3 α A okolo 10 hodin u N3 β A se pohybuje okolo 20 hodin. Zatímco poločasy života u obou guaninových aduktů jsou přes 50 hodin³⁶. Zároveň žádný kumulativní efekt u žádného druhu aduktů nebyl pozorován.

5 ZÁVĚR

V moči myší vystavených parám styrenu byly nalezeny již dříve publikované N7 guaninové adukty a také nově nalezené N3 adeninové adukty. Při porovnání stanoveného množství N7 guaninových a N3 adeninových aduktů bylo zjištěno výrazně vyšší množství N3 adeninových aduktů, než se očekávalo na základě dat z *in vitro* experimentů.

Pokusem *in vivo* byla potvrzena rychlá depurinace N3 adeninových a N7 guaninových aduktů. Oba typy aduktů se rychle vylučovaly močí, takže jejich rychlý pokles byl prokázán během prvního dne po skončení expozice. Zároveň během desetidenní expozice nedocházelo k jejich kumulaci. Pro biologické monitorování z toho vyplývá, že mohou sloužit pouze jako indikátory krátkodobé expozice styrenu.

V případě, že se u lidí tvoří podobné množství sledovaných aduktů obou bází jako je tomu u myší a podaří-li se ještě zvýšit citlivost metody, bude možné tyto adukty využít k biologickému monitorování expozice styrenu. Stanovení těchto aduktů u jednotlivých lidí by bylo přímým měřítkem, jak byly poškozeny základní kameny genetické výbavy, tedy indikátorem efektivní dávky styrenu, které byl daný jedinec vystaven.

6 LITERATURA

1. International Agency for Research on Cancer: IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. 60, 233, IARC, Lyon 1997.
2. Denis H. James William M. Castor, "Styrene" in Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
3. Petreas M. X., Woodlee J., Becker C. E., Rappaport S. M.: *Int. Arch. Environ. Health* 67, 27 (1995).
4. Johansson G., Ernstgård L., Gullstrand E., Löf A., Osterman-Golkar S., Williams C. C., Sumner S. C. J.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168, 36 (2000).
5. Guidelines for drinking-water quality, 2nd ed. Vol.2. Health criteria and other supporting information. World Health Organization, Geneva, 1996.
6. Environmental Health Criteria 26: Styrene. Published by World Health Organization, 1983.
7. Bond J. A.: *Crit. Rev. Toxicol.* 19, 227 (1989).
8. Yeowell-O'Connell K., Jing Z., Rappaport S. M.: *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 5, 205 (1996).
9. Pagano D. A., Yagen B., Hernandez O., Bend J. R., Zeiger E.: *Environ. Mutagen.* 4, 575 (1982).
10. Manini P., Andreoli R., Poli D., De Palma G., Mutti A., Niessen W. M. A.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 16, 2239 (2002).
11. Negri S., Maestri L., Andreoli R., Manini P., Mutti A., Imbriani M.: *Toxicol. Lett.* 162, 225 (2006).
12. Maestri L., Imbriani M., Ghittori S., Capodaglio E., Gobba F., Cavalleri A.: *Sci. Tot. Environ.* 199, 13 (1997).
13. Pantarotto C., Fanelli R., Bidoli F., Morazzoni P., Salmona M., Szczawinska K.: *Scand. J. Work Environ. Health* 4, 67 (1978).
14. Manini P., Buzio L., Andreoli R., Goldoni M., Bergamaschi E., Jakubowski M., Vodička P., Hirvonen A., Mutti A.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189, 160 (2003).
15. Linhart I., Mráz J., Scharff J., Krouželka J., Dušková Š., Nohová H., Vodičková L.: *Chem. Res. Toxicol.*, 23, 251 (2010).
16. Vodička P., Koskinen M., Naccarati A., Oesch-Bartlomowicz B., Vodičková L., Hemminki K., Leech F.: *Drug Metab. Rev.* 38, 805 (2006).
17. Seutter-Berlage F., Delbressine L. P. C., Smeets F. L.M., Ketelaars H. C. J.: *Xenobiotica* 8, 413 (1978).
18. Nakatsu K., Hugenroth S., Sheng L.-S., Horning E. C., Horning M. G.: *Drug Metab. Dispos.* 11, 463 (1983).
19. De Palma G., Manini P., Mozzoni P., Andreoli R., Bergamaschi E., Cavazzini S., Franchini I., Mutti A.: *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1393 (2001).
20. Coccini T., Maestri L., Robustelli della Cuna F. S., Bin L., Costa L. G., Manzo L.: *Arch. Toxicol.* 70, 736 (1996).
21. Jágr M., Pacáková V., Petříček M.: *Chem. Listy* 103, 902 (2009).
22. Osterman-Golkar S., Ehrenberg D., Segerbäck D., Hällström I.: *Mutat. Res.* 14, 1 (1976).
23. Bishop C., Surgenor D. M.: *The Red Blood Cell*. Academic Press, New York 1964.
24. Jágr M., Mráz J., Linhart I., Stránský V., Pospíšil M.: *Chem. Res. Toxicol.* 20, 1442 (2007).
25. Hemminki K.: *Arch. Toxicol. Suppl.* 9, 286 (1986).

26. Pauwels W., Veulemans H.: *Mutat. Res.* 418, 21 (1998).
27. Törnqvist M., Mowrer J., Jensen S., Ehrenberg L.: *Anal. Biochem.* 154, 255 (1986).
28. Pauwels W., Farmer P. B., Osterman-Golkar S., Severi M., Cordero R., Bailey E., Veulemans H.: *J. Chromatogr. B* 702, 77 (1997).
29. Nordqvist M. B., Löf A., Osterman-Golkar S., Wales S. A. S.: *Chem.-Biol. Interact.* 55, 63 (1985).
30. Ting D., Smith M. T., Doane-Setzer P., Rappaport S. M.: *Carcinogenesis* 11, 755 (1990).
31. Rappaport S. M., Yeowell-O'Connell K.: *Toxicol.Lett.* 108, 117 (1999).
32. Fustinoni S., Colosio C., Colombi A., Lastrucci L., Yeowell-O'Connell, Rappaport S. M.: *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 71, 35 (1998).
33. Kaur S., Hollander D., Haas R., Burlingame A. L.: *J. Biol. Chem.* 264, 16981 (1989).
34. Poirier M.C.: *Nat. Rev., Cancer* 4, 630 (2004).
35. Timbrell J.A.: *Toxicology* 129, 1 (1998).
36. Hemminki K., Koskinen M., Rajaniemi H., Zhao C.: *Regul. Toxicol. Pharm.* 32, 264 (2000).
37. Koskinen M., Vodicka P., Hemminki K.: *Chem. Biol. Interact.* 124, 13 (2000).
38. Koskinen M., Plna K.: *Chem. Biol. Interact.* 129, 209 (2000).
39. Barlow T., Takeshita J., Dipple A.: *Chem. Res. Toxicol.* 11, 838 (1998).
40. Vodička P. E., Linhart I., Novák J., Koskinen M., Vodičková L., Hemminki K.: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 210, 1 (2006).
41. Arms A. D., Travis C. C.: Reference physiological parameters in pharmacokinetic modeling. US Environmental Protection Agency, Washington, DC, Report No. EPA/600/6-88/004. 1988.

7 PŘÍLOHA

Toxicology Letters 184, 33 (2009).

Excretion of urinary N7 guanine and N3 adenine DNA adducts in mice
after inhalation of styrene

Petr Mikeš, Marek Kořínek, Igor Linhart, Jan Krouželka, Emil Frantík, Ludmila
Vodičková, Lenka Neufussová