

Univerzita Karlova
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové
Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy

Sledování oxidačního stresu HPLC metodami

Diplomová práce

Tereza Kalíšková

Vedoucí práce: PharmDr. Nela Váňová Ph.D.

V Hradci Králové 2022

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně (pod vedením konzultanta). Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 15. 5. 2022

Tereza Kalíšková

.....

ABSTRAKT

Reaktivní formy kyslíku a dusíku mají v organismech svou fyziologickou úlohu, ale jejich nadměrná tvorba poškozuje buňky a může vyústit v řadu onemocnění. Interakcí reaktivních forem kyslíku a dusíku s biomolekulami dochází k jejich poškození. Poškozené molekuly lipidů, proteinů i DNA poté slouží jako biomarkery oxidačního stresu a umožňují jeho hodnocení. Oxidační stres může být vyvolán také vnějšími faktory například léčivy, ten se poté může projevit jako nežádoucí a toxické účinky. Pro sledování bezpečnosti léčiv je tedy důležité sledovat schopnost léčiva vyvolat oxidační stres. Pro stanovení malondialdehydu z buněčné pelety jako biomarkeru lipoperoxidace byla vyvinuta metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Největší pozornost byla věnována optimalizaci úpravy vzorku pomocí deproteinace, derivatizace a extrakce na tuhou fázi. Metoda byla validována s přijatelnou specifitou, přesností, precizností výtěžnosti i matricovými efekty a vyhovuje tak požadavkům Evropské lékové agentury na validaci bioanalytických metod. Metodou lze stanovit intracelulární malondialdehyd v rozmezí koncentrací 0,1–2 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Metoda byla úspěšně použita na analýzu biologických vzorků z *in vitro* experimentu, kde bylo hodnoceno množství malondialdehydu v HepG2 buňkách vystavených reaktivátorům acetylcholinesterasy K048, K074, K075 a K203. Cílem experimentu bylo najít spojitosti mezi strukturou reaktivátorů a jejich schopností indukovat oxidační stres. Dále jsme se pokusily upravit metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií pro stanovení poškození DNA, aby bylo možno současně stanovit i marker poškození proteinů 3-nitrotyrosin. Zaměřily jsme se hlavně na úpravu vzorku pomocí extrakce na tuhou fázi, která byla původně vyvinuta pouze pro extrakci 2-deoxyguanosinu a 8-oxo-2-deoxyguanosinu.

Klíčová slova: oxidační stres, malondialdehyd, 3-nitrotyrosin, 8-oxo-2-deoxyguanosin, extrakce na tuhou fázi, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, reaktivátory acetylcholinesterázy.

ABSTRACT

Reactive oxygen and nitrogen species have a physiological role in the organism, but their extensive production can damage cells and result in many diseases. By interaction of biomolecules with reactive oxygen and nitrogen species are biomolecules damaged. Damaged lipid, protein and DNA molecules then serve as biomarkers of oxidative stress and allow its evaluation. Oxidative stress can be caused by external factors such as drugs and then it may occur as adverse and toxic effects. It is important to monitor a drug's ability to induce oxidative stress to monitor drug safety. A high-performance liquid chromatography method coupled with tandem mass spectrometry has been developed to determine malondialdehyde from the cell pellet as a biomarker of lipoperoxidation. The greatest emphasis was given to the optimization of sample preparation by deproteination, derivatization and solid-phase extraction. The method was validated with acceptable specificity, accuracy, precision, recovery and matrix effect. The method complies with the requirements of the European Medicines Agency for the validation of bioanalytical methods. The method can determine intracellular malondialdehyde in the concentration range 0,1–2 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. This method was successfully applied to the analysis of biological samples from *in vitro* experiment, where the levels of malondialdehyde in HepG2 cells exposed to acetylcholinesterase reactivators K048, K074, K075 and K203 were evaluated. The aim of the experiment was to find relationship between the structures of reactivators and their ability to induce oxidative stress. We also tried to modify the high-performance liquid chromatography method coupled with tandem mass spectrometry for the determination DNA damage so that it was possible to determine the protein damage marker 3-nitrotyrosine simultaneously. We focused mainly on the sample preparation by solid-phase extraction which was originally developed only for 2-deoxyguanosine and 8-oxo-2-deoxyguanosine.

Keywords: oxidative stress, malondialdehyde, 3-nitrotyrosine, 8-oxo-2-deoxyguanosine, solid-phase extraction, high-performance liquid chromatography, mass spectrometry, acetylcholinesterase reactivators.

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych velmi poděkovat PharmDr. Nele Váňové Ph.D, za odborné vedení, cenné rady, laskavost a trpělivost při zpracování této diplomové práce. Dále děkuji rodině a příteli za neustálou podporu a dlouholetou trpělivost, kterou se mnou měli po celou dobu studia.

Tato diplomová práce vznikla za podpory projektu SVV 260 547.

OBSAH

Čestné prohlášení	2
Abstrakt.....	3
Abstract.....	4
Poděkování.....	5
Obsah	6
Seznam používaných symbolů a zkratk	9
Seznam obrázků.....	12
Seznam tabulek.....	14
1 Teoretická část	15
1.1 Oxidační stres	15
1.1.1 Volné radikály.....	15
1.1.2 Antioxidanty	16
1.1.3 Biomarkery oxidačního stresu	17
1.1.4 Poškození Lipidů	18
1.1.5 Poškození proteinů.....	19
1.1.6 Poškození DNA	20
1.1.7 Metody stanovení BOS.....	20
1.1.8 Oxidační stres a jeho role ve studiu toxicity léčiv	21
1.2 Oximové reaktivátory acetylcholinesterasy.....	22
1.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	23
1.3.1 Základní separační módy	23
1.3.2 Části chromatografu.....	24
1.3.3 Detektory HPLC	25
1.4 Metody úpravy vzorku.....	27
1.5 Validace	31
1.5.1 Selektivita	31
1.5.2 Přenos analytu mezi analýzami (carry-over)	31
1.5.3 Spodní kvantifikační limit (LLOQ)	31

1.5.4 Linearita	31
1.5.5 Přesnost	32
1.5.6 Preciznost	32
1.5.7 Matricový efekt (ME)	32
1.5.8 Výtěžnost (REC)	33
2 Cíl práce	34
3 Experimentální část	35
3.1 Materiál a instrumentace	35
3.2 Příprava roztoků a vzorků pro analýzu MDA	36
3.2.1 Roztoky pro optimalizaci úpravy vzorku při analýze MDA	36
3.2.2 Zpracování buněčné pelety	37
3.2.3 Finální postup pro úprava vzorku při stanovení MDA	38
3.2.4 Příprava standardů pro kvantifikaci MDA validaci metody	38
3.3 LC-MS/MS podmínky pro stanovení MDA	40
3.4 Stanovení intracelulárního proteinu metodou dle Bradfordové	41
3.5 Vzorky pro analýzu MDA v HepG2 buňkách pro <i>in vitro</i> testování toxicity oximových reaktivátorů AChE	42
3.6 Příprava roztoků a vzorků pro analýzu 3-NT, 2dG a 8o2dG	42
3.6.1 Roztoky pro optimalizaci SPE úpravy vzorku při analýze 3-NT, 2dG a 8o2dG ...	42
3.6.2 Původní metoda úpravy vzorku	43
3.6.3 Příprava vzorků pro optimalizaci SPE extrakce analytů z plazmy	43
3.7 LC-MS/MS podmínky pro stanovení 3-NT, 2dG a 8o2dG	45
4 Výsledky práce	46
4.1 Optimalizace metody stanovení MDA	46
4.1.1 Precipitace	46
4.1.2 Derivatizace	46
4.1.3 SPE promytí	47
4.1.4 Rekonstituce	47
4.2 Kontrola čistoty IS	47
4.3 Validace	49

4.4 Analýza MDA v HepG2 buňkách pro <i>in vitro</i> testování toxicity oximových reaktivátorů	53
4.5 Optimalizace metody stanovení 3-NT, 2dG a 8o2dG.....	55
5 Diskuze	60
6 závěr.....	65
Seznam použité literatury	66

SEZNAM POUŽÍVANÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

[¹³ C ₉]3-NT	3-nitro-L-tyrosin- ¹³ C ₉
[¹⁵ N ₅]8o2dG	8-oxo-2-deoxyguanosin- ¹⁵ N ₅
2dG	2-deoxyguanosin
3-NT	3-nitrotyrosin
8o2dG	8-oxo-2-deoxyguanosin
A _x	plocha píku látky x
AA	kyselina octová
ACN	acetonitril
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
AChEi	inhibitor acetylcholinesterasy
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
BOS	biomarkery oxidačního stresu
BSA	hovězí sérový albumin
CV	variační koeficient
CYP P450	cytochrom P450
d ² -MDA	deuterovaný malondialdehyd
d ² -TEP	deuterovaný 1,1,3,3-tetraetoxypropan
DCFH-DA	fluorescenční sonda 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát
DHE	fluorescenční sonda dihydroethidium
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (kultivační medium)
DNP	2,4-dinitrofenylhydrazin
EMA	Evropská léková agentura (EU)
FDA	Úřad pro kontrolu léčiv a potravin (USA)
ESI	ionizace elektrosprejem
FA	kyselina mravenčí
GSH	rekukovaná forma glutathionu
GSSG	oxidovaná forma glutathionu
HClO	kyselina chlorná
HepG2	buňky lidského hepatocelulárního karcinomu
H ₂ O ₂	peroxid vodíku

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IC ₅₀	koncentrace látky způsobující 50% inhibici
IS	vnitřní standard
IT	iontová past
LC-MS	spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny
LLOQ	spodní limit kvantifikace
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace
MDA	malondialdehyd
ME	matricový efekt
MeOH	methanol
MF	mobilní fáze
MK	mastná kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
MTT	kolorimetrickým stanovení buněčné viability
<i>m/z</i>	hmotnost/náboj
NaOH	hydroxid sodný
NAPQI	N-acetyl- <i>p</i> -benzochinonimin
NO•	oxid dusnatý radikál
NPC	chromatografie na normálních fázích
NP-SH	non-proteinový thiol
NP-SS-NP	non-proteinový disulfid
O ₂ • ⁻	superoxidový radikál
•OH	hydroxylový radikál
OONO ⁻	peroxynitrit
PBS	solný fosfátový pufr
PP	proteinová precipitace
Q	kvadrupól
QC	kontrola kvality
QqQ	trojtýkvadrupól
R	korelační koeficient
REC	výtěžnost (recovery)
RO•	alkoxylový radikál
ROO•	alkylperoxylový radikál

RONS	reaktivní formy kyslíku a dusíku
RPC	chromatografie na reverzních fázích
RPM	otáčky za minutu
RSD	relativní směrodatná odchylka
SD	směrodatná odchylka
SF	stacionární fáze
SPE	extrakce na pevnou fázi
SRM	monitorování vybraných reakcí
TBARS	substance reagující s kyselinou thiobarbiturovou
<i>t</i> -BOOH	<i>tert</i> -butylhydroperoxid
TCA	kyselina trichloroctová
TFA	kyselina trifluoroctová
UHPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie za zvýšeného tlaku
ULOQ	horní limit kvantifikace
UV	ultrafialová oblast spektra elektromagnetického záření
VIS	viditelná oblast spektra elektromagnetického záření

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek č. 1 Lipoperoxidace mastné kyseliny volným radikálem.....	18
Obrázek č. 2 Nitrace tyrosinu za vzniku 3-nitrotyrosinu	19
Obrázek č. 3 Oxidace guaninu za vzniku 8-oxo-2'-deoxyguanosinu	20
Obrázek č. 4 Schéma HPLC systému.....	25
Obrázek č. 5 Derivatizace malondialdehydu 2,4-dinitrofenylhydrazínem.....	28
Obrázek č. 6 Mainfold pro extrakci na tuhé fázi (SPE)	29
Obrázek č. 7 Postup extrakce na tuhé fázi (SPE)	30
Obrázek č. 8 Přímý nástřik zderivatizovaného koncentrovaného IS do MS systému za účelem hodnocení čistoty nasyntetizovaného d ² -malondialdehydu	48
Obrázek č. 9 Chromatogram analýzy roztoku IS o koncentraci 10 μmol·dm ⁻³ za finálních chromatografických podmínek	48
Obrázek č. 10 Kalibrační přímka vážená 1/x stanovení MDA v HepG2	50
Obrázek č. 11 Chromatogramy analýzy standardu MDA	51
Obrázek č. 12 Chromatogramy analýzy 70% MeOH při hodnocení selektivity.....	51
Obrázek č. 13 Chromatogramy analýzy PBS při hodnocení selektivity	52
Obrázek č. 14 Hladiny MDA nalezené v HepG2 buňkách po 1, 4 a 24 hodinách expozice K048, K074, K075 a K203 v koncentraci odpovídající jejich hodnotě IC ₅₀ ...	55
Obrázek č. 15 Chromatogram standardů o koncentraci 5 ng·ml ⁻¹ ve 20% MeOH při analýze 2dG, 8o2dG a 3-NT	56
Obrázek č. 16 Chromatografy při použití MF, 20% MeOH, 50% MeOH a 50% ACN jako rekonstitučních činidel v objemu 200 μl.....	57
Obrázek č. 17 Chromatografy bez precipitace a po přidání precipitace ACN a TFA 35%.....	58
Obrázek č. 18 Obecný vzorec monokvarterního oximu	60
Obrázek č. 19 Obecný vzorec biskvarterního oximu	60

Obrázek č. 20 Chemické struktury oximových reaktivátorů acetylcholinesterasy: methoxim (MMB-4), asoxim (HI-6), obidoxim (LuH-6), trimedoxim (TMB-4) a pralidoxim (2-PAM)	61
Obrázek č. 21 Chemické struktury oximových reaktivátorů acetylcholinesterasy K048, K074, K075 a K203	62
Obrázek č. 22 Analýza buněčné smrti pomocí mikrokapilární průtokové cytometrie..	63
Obrázek č. 23 Změny v intracelulárních hladinách ROS/RNS měřených DCFH-DA sondou po 1, 4 a 24 hodinách inkubace s K048, K074, K075, K203 v koncentraci odpovídající jejich hodnotě IC_{50}	63
Obrázek č. 24 Množství NP-SH a NP-SS-NP nalezené v HepG2 buňkách po 1, 4 a 24 hodinách expozice K048, K074, K075, K203 v koncentraci odpovídající jejich hodnotě IC_{50}	64

SEZNAM TABULEK

Tabulka č. 1 Přehled reaktivních forem kyslíku a dusíku	16
Tabulka č. 2 Přehled nejvýznamnějších antioxidantů	17
Tabulka č. 3 Příprava kalibračních roztoků standardů MDA.....	38
Tabulka č. 4 Příprava kalibrační řady pro stanovení intracelulárního proteinu	41
Tabulka č. 5 IC ₅₀ zkoušených oximů	42
Tabulka č. 6 Parametry iontového zdroje při analýze 3-NT, 2dG a 8o2dG	45
Tabulka č. 7 Vypočítané validační parametry pro jednotlivé koncentrační hladiny	49
Tabulka č. 8 Množství intracelulárního proteinu v homogenátu HepG2 buněk vystavených oximům v časových intervalech 1, 4 a 24 hodin.....	53
Tabulka č. 9 Koncentrace MDA vztažená na množství intracelulárního proteinu v HepG2 buňkách vystavených oximům po dobu 1, 4 a 24 hodin	54
Tabulka č. 10 Odezvy analytů při použití MF, 20% MeOH, 50% MeOH a 50% ACN jako rekonstitučních činidel v objemu 200 µl.....	56
Tabulka č. 11 Odezvy analytů bez precipitace a při použití precipitace ACN a TFA 35%.....	58
Tabulka č. 12 Odezvy analytů při provedení precipitace pomocí ACN a MeOH a rekonstituci 0,1% FA nebo 0,5% FA	59
Tabulka č. 13 Výtěžnost při použití precipitace ACN, MeOH a původní metody.	59

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Oxidační stres

Oxidační stres je nerovnováha v živém organismu, kde převažuje tvorba volných radikálů nad jejich eliminací pomocí antioxidačních systémů. Jeho důsledkem je zvýšené poškození biomolekul. (Sies, 1986)

1.1.1 Volné radikály

Volné radikály jsou atomy nebo molekuly obsahující nepárový elektron ve valenční vrstvě. Může se jednat jak o neutrální molekuly, tak anionty či kationty. Volné radikály mohou vzniknout přijetím (redukcí) či ztrátou (oxidací) elektronu, nebo energeticky náročnějším homolytickým štěpením. Jelikož je nepárový elektron energeticky méně stabilní než párový, je radikál velmi reaktivní. Nejčastěji volný radikál vytrhne elektron z jiné molekuly – z radikálu se stává stabilnější částice a z napadené molekuly radikál, který pak dále reaguje a probíhá řetězová reakce. Tato řetězová reakce může být ukončena, když se sekají dva volné radikály a spárují své nepárové elektrony nebo reakcí s molekulou jejíž radikál je stabilní. (Racek,2003; Stratil & Kubáň, 2018)

U živých organismů se hlavně setkáváme s volnými radikály kyslíku, nejčastěji se vyskytují superoxidový radikál ($O_2^{\bullet-}$), hydroxylový radikál ($\bullet OH$), alkoxylový radikál (RO^{\bullet}), alkylperoxylový radikál (ROO^{\bullet}). Další častý volný radikál, obsahující dusík, představuje oxid dusnatý (NO^{\bullet}). Některé látky neobsahují nepárový elektron (nejsou volnými radikály), ale jsou spojené s jejich metabolismem. Nejvýznamnější zástupci jsou peroxid vodíku (H_2O_2), kyselina chlorná ($HClO$) a peroxyinitrit ($OONO^{\bullet}$). Společně se označují jako reaktivní formy kyslíku a dusíku (RONS – reactive oxygen and nitrogen species). Přehled RONS shrnuje tabulka č. 1. (Racek,2003; Weidinger & Kozlov, 2015)

RONS mají v lidském těle svou fyziologickou úlohu, organismus poškozují, pokud jejich tvorba není dostatečně neutralizována antioxidačním systémem nebo pokud je překročena antioxidační kapacita organismu. Jedno z hlavních míst fyziologické tvorby RONS je v dýchacím řetězci v mitochondriích. V dýchacím řetězci dochází k postupné redukci O_2 na H_2O . Volné radikály, které za normálních podmínek vznikají, jsou ale většinou vázány na enzymatický aparát dýchacího řetězce a nezpůsobují závažné poškození biomolekul. Dále jsou volné radikály (zejména $O_2^{\bullet-}$, H_2O_2 , $\bullet OH$, $HClO$)

nástrojem fagocytujících buněk pro zneškodnění patogenů a mrtvých buněk. RONS v nízkých koncentracích slouží jako signální molekuly (NO) nebo podporují správnou funkci štítné žlázy (H₂O₂). V poslední řadě se mohou také podílet na detoxikaci xenobiotik při hydroxylačních reakcích a také při biosyntéze cholesterolu a žlučových kyselin. (Štípek, 2000; Valko *et al.*, 2007)

Na druhou stranu přebytek volných radikálů organismus významně poškozuje a je považován za jednu z příčin řady onemocnění – ateroskleróza, diabetes mellitus, karcinomy, zánět a mnohá neurodegenerativní onemocnění (Parkinsonova nemoc, Alzheimerova choroba, roztroušená skleróza). (Štípek, 2000; Deavall *et al.*, 2012)

Tabulka č. 1 Přehled reaktivních forem kyslíku a dusíku.

Název	Vzorec	Vznik (zdroj)	Reakce
Superoxid	O ₂ ^{•-}	přijetím elektronu molekulou kyslíku O ₂ + e ⁻ → O ₂ ^{•-}	dismutace katalyzována superoxiddismutásou 2O ₂ ^{•-} + 2H ⁺ → H ₂ O ₂ + O ₂
Peroxid vodíku	H ₂ O ₂	dismutace 2O ₂ ^{•-} + 2H ⁺ → H ₂ O ₂ + O ₂	Fentonova reakce H ₂ O ₂ + Fe ²⁺ → •OH + Fe ³⁺ + OH ⁻ a reakce katalyzována katalázou 2H ₂ O ₂ → H ₂ O + O ₂
Hydroxylový radikál	•OH	dýchací řetězec, fentonova reakce, homolytické štěpení H ₂ O ₂ , H ₂ O	hydroxylace aminokyselin, nukleových kyselin, iniciace lipoperoxidace
Oxid dusnatý	NO [•]	z argininu pomocí NO-syntázy	signální molekula, vznik peroxynitritu
Peroxynitrit	ONOO ⁻	NO [•] + O ₂ ^{•-} → ONOO ⁻	nitrace proteinů, nukleových kyselin, lipoperoxidace

1.1.2 Antioxidanty

Účinky RONS vyvažují antioxidanty. Dělíme je na antioxidanty, které předcházejí vzniku RONS (transportní proteiny), zneškodňují vzniklé RONS (superoxydismutáza, kataláza, vitamin C a E, glutathion – GSH) nebo napravují poškozené biomolekuly (enzymy opravující poškozené DNA nebo proteiny). Dále můžeme rozdělit na extracelulární nebo intracelulární, rozpustné v tucích či ve vodě, podle mechanismu účinku. Neexistuje antioxidant, který by organismus dokázal komplexně ochránit. Mezi jednotlivými antioxidanty je důležitá jejich souhra a vyváženost. Přehled

nejvýznamnějších antioxidantů a stručný popis působení ukazuje tabulka č. 2. (Stratil & Kubáň, 2018; Štípek, 2000)

Tabulka č. 2 Přehled nejvýznamnějších antioxidantů (GSH – redukovaná forma glutathionu, GSSG oxidovaná forma glutathion).

Antioxidanty enzymatické	Působení
Superoxiddismutáza	Katalyzuje rozklad superoxidu na peroxid vodíku a molekulární kyslík.
Kataláza	Katalyzuje rozklad peroxidu vodíku na vodu a molekulární kyslík
Gluthathionperoxidáza	Katalyzuje rozklad peroxidů za účasti GSH $ROOH + 2GSH \rightarrow GSSG + H_2O + ROH$
GSSG reduktáza	Umožňuje regeneraci GSH z oxidované formy na redukovanou $GSSG \rightarrow 2GSH$
Antioxidanty neenzymatické	Působení
Transferin	transportní protein pro železo,
Ferritin	Zásobní protein vázající železo
Ceruloplazmin	Transportní protein pro měď, oxidace železa
Chaperony	Oprava konformace proteinů, urychlení degradace poškozených proteinů
Vitamín C	Hydrofilní antioxidant, redukuje O_2^{\bullet} , $\bullet OH$, regeneruje tokoferolový radikál
Vitamín E	Lipofilní antioxidant, který je schopen přerušit řetězovou reakci lipoperoxidace. Chrání membrány a lipoproteiny.
GSH	Tripeptid s thiolovou skupinou, oxidovaná forma je disulfid GSSG. Umožňuje regeneraci vitaminů C a E, brání -SH skupiny bílkovin.
Další neenzymatické antioxidanty	

Kyselina močová, bilirubin, karotenoidy, melatonin koenzym Q10

1.1.3 Biomarkery oxidačního stresu

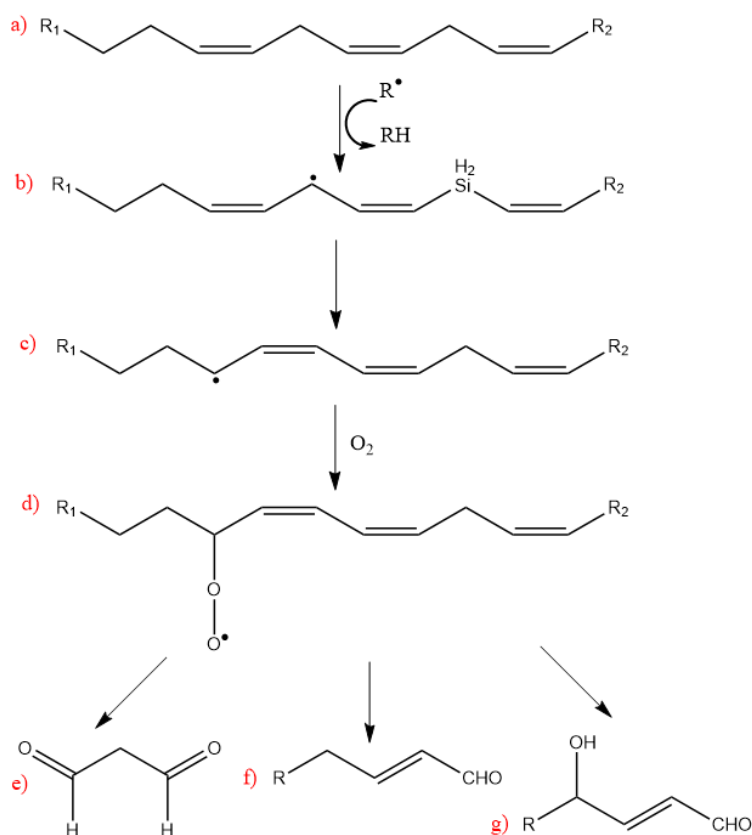
Biomarkery oxidačního stresu (BOS) jsou biomolekuly (např. proteiny, nukleové kyseliny, lipidy) poškozené oxidačním stresem. Jelikož jsou RONS velmi reaktivní a existují jen po krátkou dobu, je velmi obtížné je analyticky stanovit přímo z biologického materiálu. Proto se pro měření oxidačního stresu používají molekuly,

kteře oxidační stres poškodil, vyznačují se vyšší stabilitou při odběru a během zpracování biologického vzorku. (Frijhoff, 2015)

1.1.4 Poškození Lipidů

Lipoperoxidací bývají nejvíce poškozeny mastné kyseliny (MK) s velkým počtem dvojných vazeb. Iniciovat lipoperoxidaci může $\bullet\text{OH}$, $\text{RO}\bullet$, $\text{ROO}\bullet$. Mechanismus lipoperoxidace je uveden na obrázku č. 1.

Účinkem volného radikálu dojde v polynenasycené MK (a) k vytržením atomu vodíku z methylenové skupiny vzniká uhlíkový radikál (b). Následně dojde k přesmyku dvojně vazby a vzniká konjugovaný dien (c), který snadno reaguje s kyslíkem za vzniku peroxylového radikálu (d). Ten je schopen napadnout další MK a sám se přeměňuje na hydroperoxid ROOH. Spouští se tak řetězová reakce, při které vzniká řada produktů a meziproduktů. Hydroperoxydy se cyklizují a mohou se štěpit za vzniku alkanů a aldehydů např. malondialdehydu (MDA) (e), alkenalů (f) a 4-hydroxyalkenalů (g).



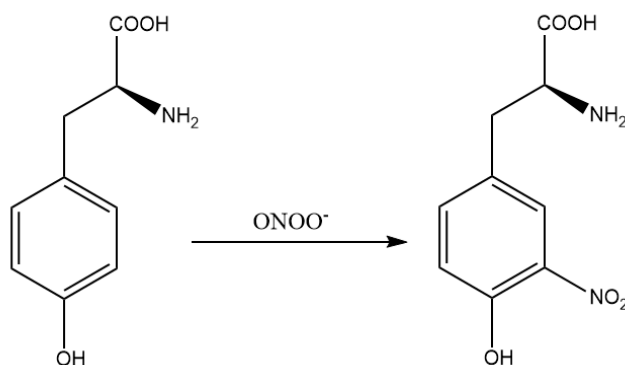
Obrázek č. 1 Lipoperoxidace mastné kyseliny volným radikálem. a) polynenasycená mastná kyselina, b) uhlíkový radikál mastné kyselin, c) radikál konjugovaného dienu, d) peroxylový radikál e) malondialdehyd, f) alkenal, g) hydroxyalkenal.

Jelikož jsou lipidy hlavní složkou biomembrán, jejich oxidací dochází ke změnám fluidity, propustnosti, inaktivaci membránových receptorů a enzymů a může vyústit v lýzu buněk. (Štípek, 2000; Ayala *et al.*, 2014)

MDA, jehož struktura je zobrazena na obrázku č. 1 (e), je jedním z konečných produktů lipoperoxidace a jeden z nepoužívanějších BOS při hodnocení oxidativního poškození lipidů. Sám o sobě má rovněž toxické účinky, protože může vytvářet adukty s nukleovými kyselinami a proteiny. (Deavall *et al.*, 2012)

1.1.5 Poškození proteinů

Oxidační poškození proteinů může způsobit rozpad peptidické vazby nebo konformační změny v molekule proteinu. Důsledky takového poškození jsou vážné a zahrnují ztrátu či změnu enzymatické, signální nebo transportní funkce. V případě změny transportní funkce u proteinů vázajících přechodné kovy může dojít k uvolnění kovu. Kov dále může katalyzovat Fentonovu reakci a přispět tak další tvorbě oxidačního stresu. RONS mohou buď přímo poškodit peptidickou vazbu nebo změnit postranní řetězec jednotlivých aminokyselin. $\bullet\text{OH}$ způsobuje hydroxylaci řady aminokyselin, OONO^\ominus zase způsobuje jejich nitraci. Příkladem poškození je nitrace tyrosinu na 3-nitrotyrosin (3-NT), jehož struktura a vznik je uvedena na obrázku č. 2. (Štípek, 2000)



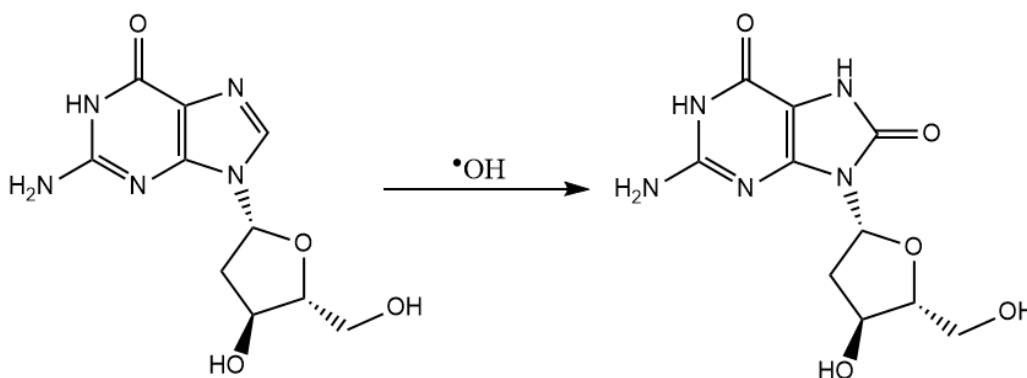
Obrázek č. 2 Nitrace tyrosinu peroxynitritem za vzniku 3-nitrotyrosinu.

Poškození proteinů může způsobit také MDA a další produkty vznikající při lipoperoxidaci. MDA působí zesíťování a agregaci proteinů. Aldehydy vznikající při lipoperoxidaci například 4-hydroxynonenal a 4-hydroxyhexenal se navazují na postranní řetězce lysinu, histidinu a cysteinu, tento proces se nazývá karbonylace proteinů. Poškozené proteiny jsou degradovány proteolytickými enzymy. (Hauck *et al.*, 2019; Dean *et al.* 1997)

1.1.6 Poškození DNA

Nukleové kyseliny jsou zásadní biomolekuly pro správné fungování živých organismů. Proto má jejich poškození oxidačním stresem vážné důsledky jako karcinogenezi, mutagenezi, apoptózu a stárnutí organismu. Příklady poškození jsou jednořetězcové nebo dvouřetězcové zlomy v DNA, oxidace bází, jejich nesprávné párování či tvorba křížových vazeb DNA s proteiny. (Štípek, 2000; Poulsen, 2005)

Reakce $\bullet\text{OH}$ s cukernou částí DNA vede k modifikaci cukru a přerušení DNA řetězce. Tento radikál také způsobuje různé oxidace purinových i pyrimidinových bází. Nevíce náchylný k oxidacím je guanin, proto je jeho oxidovaný nukleosid 8-oxo-2'-deoxyguanosin (8o2dG), znázorněný na obrázku č. 3, jedním z nejčastěji využívaných biomarkerů poškození DNA. (Cooke, 2003; Valavanidis *et al.*, 2009)



Obrázek č. 3 Oxidace guaninu hydroxylovým radikálem za vzniku 8-oxo-2'-deoxyguanosinu.

1.1.7 Metody stanovení BOS

Metody pro stanovení BOS musí být velmi citlivé (dosahovat nízkých detekčních limitů), kvůli nízkým fyziologickým koncentracím, a selektivní vůči dalším strukturně podobným endogenním látkám. Proto v dnešní době dominuje použití chromatografických metod ve spojení s hmotnostní spektrometrií (MS), která zároveň pro kvantifikaci umožňuje využití izotopicky značených standardů.

Stanovení MDA slouží k hodnocení intenzity lipoperoxidace. MDA lze stanovit spektrofotometricky, kdy po derivatizaci s kyselinou thiobarbiturovou (při 95 °C), vzniká červeně zbarvený derivát. S thiobarbiturovou kyselinou reagují i ostatní produkty lipoperoxidace, souhrně označované jako thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). Tuto metodu lze použít k celkovému hodnocení lipoperoxidace, ale nikoli jen k hodnocení MDA kvůli nízké selektivitě. Pro zvýšení selektivity je

možné použít chromatografii se spektrofotometrickou detekcí. Jako vhodnější a selektivnější derivatizační činidla pro chromatografii se používají například 2,4-dinitrofenylhydrazin (DNPH), 2,4-diaminonaftalen nebo pentafluorfenylhydrazin. Při těchto derivatizačních reakcích jsou použity mírnější reakční podmínky, tím pádem je i nižší riziko vzniku artefaktů. V současnosti se nejvíce využívá přístup chromatografie ve spojení s MS pro svou citlivost a selektivitu. (Tiskas, 2017)

MDA se v organismu vyskytuje ve volné formě, ale také vázaný na proteiny. Proto existují i dva přístupy k jeho stanovení. Při stanovení volného MDA vzorek podrobíme proteinové precipitaci (PP) a následně derivatizaci. Pokud chceme stanovit celkový MDA (vázaný + volný) je potřeba proteinově vázaný MDA uvolnit. K jeho uvolnění z proteinů se využívá alkalická hydrolyza, poté už pokračujeme v postupu jako u stanovení volného MDA (PP a derivatizace). (Mendonça, 2017)

Ke stanovení 3-NT a 8o2dG jsou využívány imunochemické metody jako ELISA založené na interakci mezi antigenem a protilátkou. V současné době jsou preferovány chromatografické metody nejčastěji ve spojení s MS. Chromatografické metody poskytují vysokou citlivost a selektivitu, která je zásadní vzhledem k značnému nepoměru mezi nepoškozenou a poškozenou formou biomolekul a jejich strukturní podobností. (Duncan, 2003; Himmelstein *et al.*, 2009)

1.1.8 Oxidační stres a jeho role ve studiu toxicity léčiv

Každé léčivo před schválením státními autoritami musí úspěšně projít preklinickým a klinickým hodnocením. Během hodnocení je testována účinnost ale také bezpečnost. Hodnotí se nežádoucí účinky, interakce, toxicita a další. Oxidační stres vyvolaný léčivem může přispívat k toxickým efektům krátkodobým i dlouhodobým jako například mutagenita, karcinogenita a orgánová toxicita. Hlavním zdrojem RONS je fáze metabolisme léčiva. Xenobiotika jsou většinou metabolizována pomocí cytochromu P450 (CYP P450), během tohoto procesu vznikají RONS. Metabolity jsou často chinonové povahy, mohou tak tvořit adukty s makromolekulami i antioxidanty, vyčerpávají například zásobu GSH. Důkazem je hepatotoxické léčivo Paracetamol, při překročení dávky se nestíhá metabolizovat glukuronidací a sulfatací. Zvýší se část paracetamolu, která je metabolizovaná pomocí CYP P450 na N-acetyl-para-benzochinonimin (NAPQI). Ten je inaktivován pomocí GSH, při vyčerpání zásob GSH je narušena buněčná homeostáza a iniciována buněčná smrt. (Banerjee & Ghosh, 2016)

Dalším příkladem může být léčivo doxorubicin, antineoplastikum s kardiotoxickým potenciálem. Doxorubicin má velkou afinitu k fosfolipidu cardiolipinu v mitochondriích kardiomyocytů. Metabolizací léčiva vznikají RONS a poškozují kardiomyocyt. Toxicita doxorubicinu se může akutně projevit jako tachykardie či hypotenze, chronicky se může vyznačit dilatací srdce. Na příkladech vidíme, že oxidační stres může být příčinou nežádoucích účinků léčiv, proto je vhodné mu při hodnocení bezpečnosti léčiv věnovat pozornost. (Deavall *et al.*, 2012)

1.2 Oximové reaktivátory acetylcholinesterasy

Acetylcholinesterasa (AChE) je enzym, který metabolizuje neurotransmitter acetylcholin (ACh) na cholin a acetát, a ukončuje tak jeho účinek. Látky inhibující AChE brání rozkladu ACh prodlužují tak jeho životnost a tím účinek. Reverzibilní inhibitory acetylcholinesterasy (ACHEi) lze terapeuticky využít u nemocí s nedostatkem ACh jako je Alzheimerova choroba (donepezil, rivastigmin a galantamin). Naopak ireverzibilní ACHEi se využívají jako pesticidy, insekticidy (parathion, mevinfos) a bojové látky (tabun, sarin, soman). (Michalovicz *et al.*, 2020)

Velkou skupinu ireverzibilních ACHEi tvoří organofosfáty. Organofosfáty jsou velmi lipofilní sloučeniny, proto snadno pronikají do těla i kůží. Jsou schopné překonat hematoencefalickou bariéru a strukturálně poškodit mozkovou tkáň. Příznaky intoxikace ireverzibilními ACHEi jsou salivace, lakrimace, mióza, pocení, zvýšení peristaltiky gastrointestinálního traktu, zvracení, bronchokonstrikce, bradykardie, arytmie, unik moči a stolice, křeče, svalové záškuby následně paralýza svalů (včetně dýchacích). (Worek *et al.*, 2016)

Organofosfáty mají větší afinitu k reaktivátorům AChE než k samotnému enzymu. Reaktivátory jsou tedy schopny rozštěpit vazbu mezi fosforem a enzymem. Musejí být však podány včas, před tzv. zestárnutím enzymu, poté už není možné vazbu rozštěpit a je nutná syntéza nového enzymu. Malý počet inhibovaných enzymů se může také spontánně reaktivovat. (Worek *et al.*, 2016; Chambers *et al.*, 2020)

Akutní terapie otrav se skládá z podání atropinu (antagonista muskarinových receptorů), diazepamem (proti křečím) a reaktivátoru. V současnosti je ke klinickému použití k dispozici pouze několik reaktivátorů AChE (např. asoxim, obidoxim nebo pralidoxim), avšak žádný z nich není univerzální vůči široké škále organofosfátových ACHEi. Proto je stále věnována velká pozornost syntéze nových širokospektrých

reaktivátorů. Strukturně se jedná o aldoximy, které ve své molekule obsahují nabitý kvarterní dusík obvykle v aromatickém kruhu. Existují oximy obsahující jeden či dva pyridinové kruhy – takové oximy označujeme jako monokvarterní a biskvarterní. (Chembers *et al.*, 2020)

U oximů je intenzivně zkoumána souvislost mezi strukturou a toxicitou. Proto je důležité se u nich zabývat hodnocením oxidačního stresu, který s toxicitou často souvisí. Strukturní znaky, které bývají hodnoceny jsou počet oximových skupin a jejich poloha na pyridinovém kruhu, délka spojovacího řetězce a jeho modifikace – vložení dvojně vazby nebo substituce kyslíku. (Můčková, 2018)

Oximy, které byly předmětem našeho experimentu, obsahují tyto strukturní znaky:

- dva pyridinové kruhy s kvarterním dusíkem,
- spojovací řetězec mezi dusíky tvoří čtyři uhlíky
- u K075 a K203 spojovací řetězec obsahuje dvojnou vazbu mezi C2 a C3
- oximy K203 a K074 obsahují dvě aldoximové skupiny v para poloze aromatických jader
- oximy K048 a K075 obsahují jednu aldoximovou a jednu amidickou skupinu v para poloze aromatických jader

Struktury námi hodnocených oximů jsou uvedeny v diskuzi na obrázku č. 21.

1.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC – high performance liquid chromatography) je separační analytická metoda. Využívá rozdělování analytu mezi dvě vzájemně nemísitelné fáze na základě rozdílné afinity. Jedna z těchto fází je kapalná (mobilní fáze – MF) druhá pevná (stacionární fáze – SF) principem separace je neustálé ustanovování rovnováhy mezi fázemi.

1.3.1 Základní separační módy

Chromatografie na normálních fázích (NPC) je mód, který jako SF používá polární sorbent (silikagel, silikagel modifikovaný kyano, diolovými nebo aminovými skupinami). Jako mobilní fáze jsou využívána nepolární organická rozpouštědla (heptan, toluen, chloroform). Tento separační mód byl sice první, ale dnes bývá

upozaďen. Je využívan hlavně pro polární či hydrofobní analyty a látky náchylné k hydrolyze.

Chromatografie na reverzních fázích (RPC) je opakem normálních fází. SF má nepolární charakter (modifikovaný silikagel – C8, C18, fenyl). MF je polárnější, většinou se jedná o směs organického rozpouštědla (methanol, acetonitril) s vodou, pro úpravu pH mohou být využity vhodné pufrы. Pořadí analytu je opačné než na normálních fázích, první se z kolony eluují polární látky, pak látky méně polární, které jsou více zadržovány SF. RFC je současně nejvíce využívaný separační mód.

1.3.2 Části chromatografu

Schéma chromatografu je znázorněno na obrázku č. 4. Přístroj se skládá z několika částí, první z nich jsou zásobníky MF. V případě izokratické eluce stačí jeden zásobník MF, při gradientové eluci tzn. proměnlivém složení MF je třeba minimálně dvou zásobníků a směšovače. MF je ze zásobníku nasávaná přes fritu, která zabraňuje vniku mechanických nečistot do systému.

Následně MF prochází degaserem, který zajišťuje její odplynění. Přítomnost plynů by způsobila nekontinuální tok MF, který může způsobit zvýšený šum a kolísání základní linie. Jedná se o hadičky s póry, které jsou propustné jen pro plyny, tyto hadičky jsou uloženy v prostoru se sníženým tlakem, který způsobí odstranění plynu z MF.

Další velmi důležitou částí jsou pumpy. Ty musejí být schopné zajistit kontinuální tok mobilní fáze, minimum pulzací a dostatečný tlak v systému.

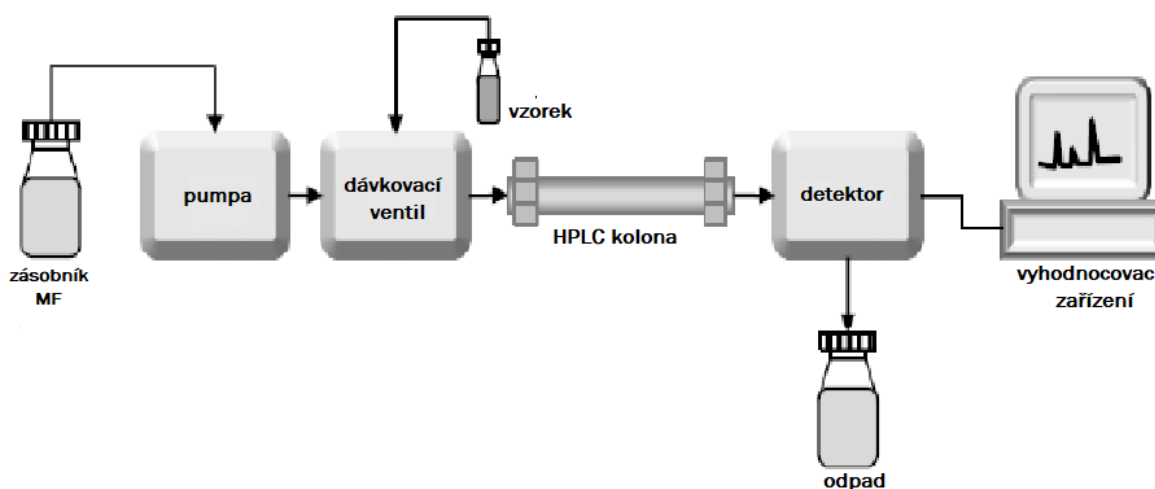
Nástřik vzorku lze provést manuálně, ale v současnosti je upřednostňován automatický nástřik pomocí autosampleru. Vzorky se naplní do vialek a vloží do zásobníku autosampleru. Odtud je vzorek nastříknut do dávkovací smyčky s 6-ti cestným otočným ventilem. V plnicí fázi MF prochází mimo dávkovací smyčku, po otočení ventilu je vzorek unášen MF na kolonu.

Chromatografická kolona je stěžejní částí systému, kde dochází k samotné separaci. Jedná se obvykle o kovovou trubici dlouhou 100-300 mm s vnitřním průměrem 2-4,5 mm, která je naplněná sorbentem – SF. Náplň může být tvořena buď jedním kusem velmi porézního materiálu – monolitická kolona, nebo velkým počtem malých sférických částic – náplňová kolona. Před samotnou kolonou může být umístěna předkolona. Jedná se o velmi krátkou kolonku, která zachycuje silně zadržované látky či

nečistoty, chrání tak před nimi kolonu a prodlužuje její životnost. Použití předkolony je velmi vhodné při analýze biologického materiálu. Kolonový prostor je termostátován na požadovanou teplotu, která musí být během analýzy konstantní. Kolísání teploty může způsobit kolísání retenčních časů.

Předposlední částí chromatogramu je detektor, který je schopen zaznamenat separované analyty. Podrobnější popis HPLC detektorů je uveden v další kapitole.

Poslední nedílnou součástí je počítač s vhodným softwarem, pomocí kterého se přístroj ovládá, provádí kontrolu systému (tlak, průtok, teplota) a také umožňuje zpracování naměřených dat.



Obrázek č. 4 Schéma HPLC systému. (převzato a upraveno z Czaplicky, 2013)

1.3.3 Detektory HPLC

Detektor převádí fyzikální nebo chemické vlastnosti analytu nebo mobilní fáze na elektrický signál, který je přímo úměrný koncentraci analytu. Existuje řada detektorů, které se vzájemně liší v citlivosti a selektivitě.

Spektrofotometrický UV/VIS detektor je chopen detekovat látky, které absorbují v ultrafialové (UV) a viditelné (VIS) oblasti spektra elektromagnetického záření. Dělí se na detektory s fixní vlnovou délkou, proměnlivou vlnovou délkou a detektory s diodovým polem.

Fluorescenční detektory využívají principu fluorescence, to také značně omezuje jejich využití jen na látky fluorescence schopné, případně je lze vhodně upravit derivatizací. Xenonová výbojka poskytuje excitační záření, které je po průchodu monochromátorem

absorbováno analytem. Následně analyt přebytečnou energii vyloučí v podobě emisního záření o vyšší vlnové délce, které je měřeno.

Další typy detektorů jsou elektrochemický, sloužící pro detekci látek, které jsou schopné oxidace nebo redukce, refraktometrický měřící na základě změny indexu lomu a radiometrický, který slouží k detekci radiochemicky značených vzorků

Jako jeden z nejcitlivějších a nejselektivnějších detektorů ve spojení s HPLC je MS. Jedná se o samostatnou analytickou metodu, která ve spojení s HPLC plní úlohu detektoru. Principem MS je převedení molekul na ionty a jejich rozdělení dle poměru m/z (hmotnost/náboj). Samotný hmotnostní spektrometr se skládá z ionizačního zdroje, analyzátoru a detektoru.

V ionizačním zdroji dochází k převedení neutrálních molekul na ionty v plynné fázi. Existují různé techniky – elektrická ionizace, chemická ionizace a fotoionizace za normálního tlaku (APCI a APPI). Dalšími způsoby jsou ionizace elektrosprejem (ESI) nebo matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace (MALDI). Ionizace pomocí APCI je po ESI druhou nepoužívanější technikou ionizace ve spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). Jedná se o měkkou ionizační techniku, při které vznikají jednoduše nabití ionty $[M+H]^+$. Při této metodě je MF vytékající z kolony přiváděna kapilárou společně se zmlžujícím plynem, který zajišťuje rozptýlení MF na jemnou mlhu. Na výbojovou jehlu, umístěnou za kapilárou, je vloženo vysoké napětí, které způsobí výboj. Výboj jako první ionizuje molekuly MF, které s pomocí reakčního plynu následně ionizují analyt. Vzniklé ionty v plynné fázi jsou usměrněny iontovou optikou do analyzátoru. Analyzátor je stěžejní částí přístroje, kde dochází k rozdělení iontů na základě poměru m/z .

Nejjednodušším analyzátozem je kvadrupól (Q). Jedná se o 4 tyče, na všechny je vloženo vysokofrekvenční střídavé napětí V . Na dvě protilehlé tyče je vloženo kladné stejnosměrné napětí U a na druhou dvojici tyčí záporné stejnosměrné napětí. Vzniká elektromagnetické pole, které způsobí oscilaci iontů. Při daném poměru U/V je oscilace stabilní pouze pro jeden poměr m/z a jen tyto ionty projdou skrz Q na detektor. Ostatní ionty narazí do tyčí nebo stěn a vybijí se. Plynulou změnou poměru U/V postupně všechny ionty projdou na detektor. Jedná se o jednoduchý analyzátor, který je v porovnání s ostatními levný a prostorově nenáročný, často se využívá jako hmotnostní filtr v hybridních analyzátozech, což je spojení dvou různých analyzátozů.

Spojením tří kvadrupólů vzniká trojitý kvadrupól (QqQ). Kde v prvním Q dochází k výběru požadovaného iontu, který jako jediný prochází dále. Druhý slouží jako kolizní cela, za pomoci kolizního plynu je vybraný iont fragmentován. Třetí Q působí jako analyzátor, rozděluje vzniklé fragmenty podle m/z a propouští je na detektor.

Další hojně využívaný analyzátor je sférická iontová past (IT – ion trap), skládá se z jedné prstencové elektrody a dvou koncových elektrod. Na elektrody je opět vkládáno jak vysokofrekvenční střídavé, tak stejnosměrné napětí. Do pasti je přiváděn tlumící plyn, nejčastěji hélium, aby se zabránilo nežádoucím srážkám iontů. Ionty jsou v pasti zachyceny a mají stabilní oscilace. Postupnou změnou napětí jsou ionty s nestabilní oscilací vypuzeny na detektor. IT umožňuje MS^n , to znamená, že lze izolovat vybraný iont, fragmentovat jej, následně můžeme fragmenty postupně propustit na detektor nebo opět vybrat jeden fragmentový iont a podrobit ho další fragmentaci.

Mezi ostatní analyzátory patří lineární IT, iontová cyklotronová rezonance, analyzátor doby letu a orbitální past. Jako detektory jsou využívány elektronové násobiče, fotonásobiče nebo Faradayova klec.

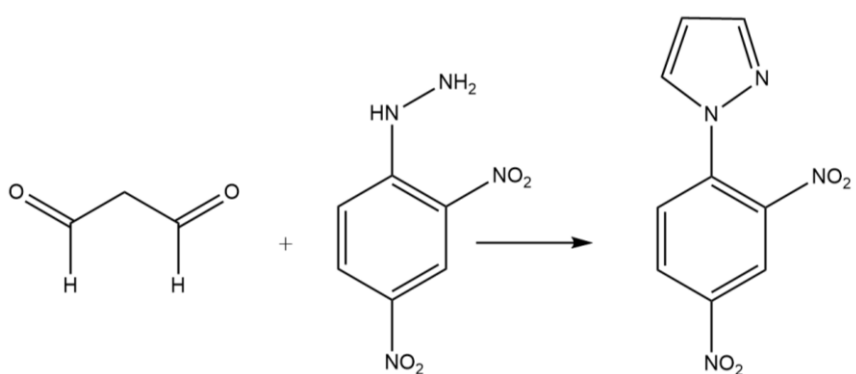
(Nováková & Douša, 2013; Kovaříková & Stariat)

1.4 Metody úpravy vzorku

Cílem úpravy vzorku je, aby byl vzorek kompatibilní s využívanou analytickou metodou. Vzhledem k využití přístrojů jako je HPLC a MS je i velmi důležité, aby byly vzorky zbaveny všech mechanických nečistot a látek, které by mohly přístroje ucpat či poškodit. Pod pojmem biologický materiál si můžeme představit krev, plazmu, sérum, moč, stolicí, mozkomíšni mok, sliny, kousky tkání nebo buněčné pelety. Vzorky biologického materiálu jsou složitou směsicí látek anorganického (např. Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^-) i organického (proteiny, cukry, lipidy) charakteru, které mohou se sledovanými analyty interferovat. Díky úpravě vzorku je možné se zbavit balastních látek a také analyty zakoncentrovat. Úprava bývá časově nejnáročnějším krokem a ovlivňuje přesnost a správnost celé analýzy.

Dále budou představeny tři základní metody úpravy vzorku, a to PP, extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE, liquid-liquid extraction) a extrakce na tuhou fázi (SPE, solid-phase extraction). U všech těchto metod se snažíme dosáhnout co nejvyšší výtěžnosti (REC – recovery), ale zároveň reprodukovatelnosti (aby byla REC co nejméně proměnlivá). (

V průběhu úpravy vzorku může být také použita derivatizace. Jedná se krok, při kterém podrobíme analyt reakci, jejíž produkt má pro analýzu lepší vlastnosti. Cílem tohoto kroku může být umožnění separace, zvýšení citlivosti nebo selektivity. Příkladem může být zabudování chromoforu do molekuly, který následně umožní UV/VIS detekci. Pro derivatizaci na karbonylové skupině se využívá reakce s DNPH nebo *p*-nitrobenzylhydroxylaminem v kyselém prostředí. Na obrázku č. 5 je zobrazena derivatizace MDA pomocí DNPH. Derivatizační reakce by měla probíhat kvantitativně, být selektivní, s minimem vedlejších produktů a výsledný produkt by měl být dostatečně stabilní.



Obrázek č. 5 Derivatizace malondialdehydu (MDA) 2,4-dinitrofenylhydrazínem (DNPH).

Jednoduchou metodou úpravy vzorku je PP, odstraňující proteiny. K precipitaci můžeme využít organická rozpouštědla mísitelná s vodou (ethanol, metanol – MeOH, aceton, acetonitril – ACN), silné kyseliny (trifluoroctová – TFA, trichloroctová – TCA, chlorista, fosforečná, chlorovodíková), soli těžkých kovů (síran zinečnatý, síran měďnatý, hydroxid barnatý, wolfram sodný) nebo kombinaci těchto přístupů. Provedení precipitace je jednoduché a nevyžaduje složité vybavení. Ke vzorku přidáme precipitační činidlo dostatečně protřepeme, vzorek centrifugujeme a odebereme supernatant. Nevýhodou precipitace může být naředění vzorku nebo ztráta analytu vázaného na precipitát.

Další metoda úpravy vzorku je LLE, ta využívá principu rozdělování analytu mezi dvě vzájemně nemísitelné kapaliny. Jelikož je biologický vzorek většinou vodné povahy, volíme druhou kapalinu tak, aby byla s vodou nemísitelná a její polarita byla co nejvíce podobná polaritě analytu. K vodnému vzorku přidáme organické rozpouštědlo nemísitelné s vodou (např. oktanol, cyklohexan, heptan, toluen, chloroform, diethylether). Následně provedeme důsledné třepání, vzorek necháme ustálit, aby se

vrstvy oddělili a poté organickou část odebereme do čisté nádoby. Pro zakoncentrování vzorku můžeme odfoukat organické rozpouštědlo proudem dusíku a vzorek rekonstituovat menším objemem rozpouštědla kompatibilního s následnou analytickou metodou. Jedná se o metodu jednoduchou na provedení, nenáročnou na vybavení, s dobrou REC a reprodukovatelností. Nevýhodou jsou horší automatizace a riziko tvorby emulzí. Existují možnosti modifikace této metody jako jsou úprava pH, zpětná nebo vícenásobná extrakce.

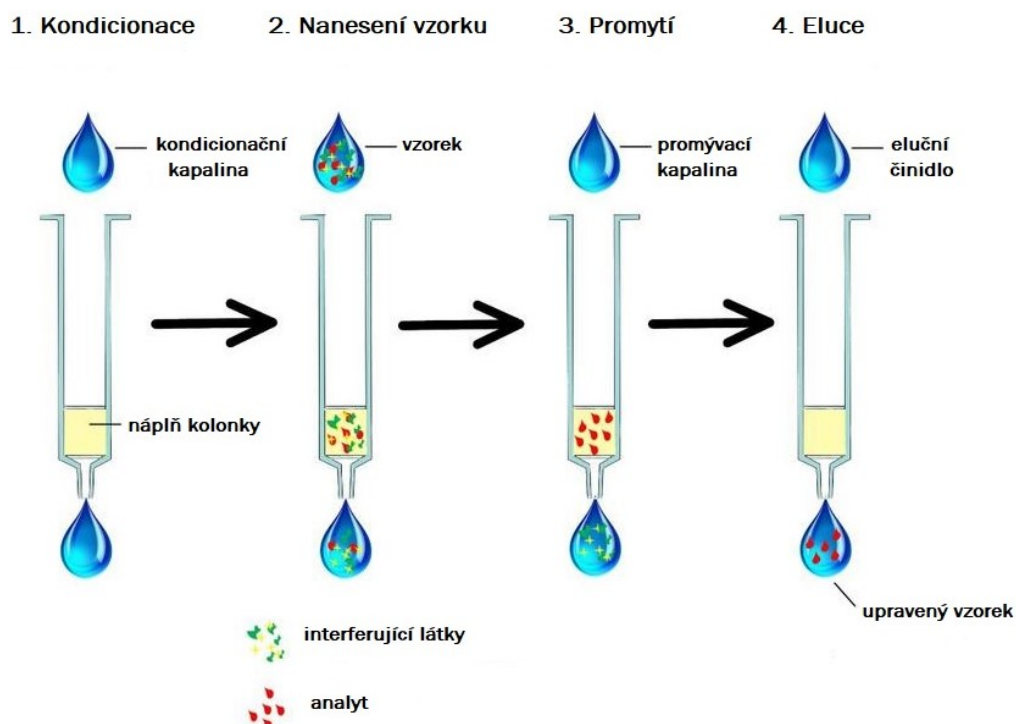
V případě SPE se jedná o metodu principem velmi podobnou chromatografii. Je založená na interakci analytu ve vzorku s pevnou fází uvnitř SPE kolonky. Nároky na vybavení jsou u této metody větší než u předchozích dvou metod, potřebujeme SPE kolonky, stojan pro SPE (tzv. manifold viz obrázek č. 6) a zdroj vakua. Pevná neboli SF se nachází uzavřená mezi fritami v SPE kolonce. Jsou využívány stejné sorbenty jako v HPLC kolonách (silikagel a jeho modifikace, polymery). Provedení SPE má 4 fáze: kondicionaci, nanesení vzorku, promytí a extrakci. Jednotlivé fáze ukazuje obrázek č. 7.



Obrázek č. 6 Manifold pro extrakci na tuhé fázi (SPE). (převzato z www.labicom.cz Manifoldy pro manuální SPE)

Kondicionace je proces smočení sorbentu a tím jeho aktivování pro extrakci, pro tento krok často využíváme polární organické rozpouštědlo např. MeOH nebo ACN. Poté se ještě kolonka propláchně rozpouštědlem co nejvíce podobným vzorku (např. vodou, puftrem). Dalším krokem je nanesení vzorku na kolonu. V této fázi se analyt zachytí na SF a je zde zadržen až do eluce. Následuje propláchnutí, které slouží k odstranění balastních látek. Používáme rozpouštědlo, ve kterém je analyt minimálně rozpustný.

Posledním krokem je eluce, kde využíváme rozpouštědlo, kterému má analyt vyšší afinitu a je schopné eluovat jej ze SF. Pro zajištění průtoku rozpouštědel kolonkou je zapotřebí podtlaku, který je zajišťován zdrojem vakua.



Obrázek č. 7 Postup extrakce na tuhé fázi (SPE). (Převzato a upraveno ze Sandoval 2017.)

Při vývoji SPE metody je důležité zvolit správný typ sorbentu, který bude schopen zachytit analyt dostatečně silně. Stejně tak je důležitá volba promývací a eluční kapaliny. Promývací kapalina nesmí vymývat analyt, ale měla by vymýt látky na sorbentu slabě zachycené, naopak eluční kapalina musí disponovat schopností vymýt analyt z pevné fáze. Dále je důležité optimalizovat objemy a případně pH jednotlivých kapalin. Výhody SPE metody jsou vysoká REC, možnost zakoncentrování vzorku, nižší spotřeba organických rozpouštědel a možnost automatizace. Mezi nevýhody patří pracnost metody, časová náročnost, nároky na vybavení a cena kolonek, které jsou jednorázové.

Na principech těchto základních metod úpravy vzorku (PP, LLE, SPE) bylo vyvinuto mnoho dalších, které minimalizují spotřebu organických rozpouštědel i vzorku, zkracují čas úpravy, umožňují lepší automatizaci nebo dokonce online spojení s analytickým přístrojem.

(Nováková & Douša, 2013; Kovaříková & Stariat)

1.5 Validace

Hlavním cílem validace je prokázat vhodnost a spolehlivost konkrétní analytické metody pro zamýšlené použití. Pro správné provedení je důležitý výběr validačních parametrů, k čemu lze využít směrnice vydané různými autoritami (Evropská léková agentura – EMA, Úřad pro kontrolu potravin a léčiv – FDA). Hlavní validační parametry pro metody v analýze biologického materiálu jsou selektivita, spodní mez kvantifikace (LLOQ – lower limit of quantification), linearita, přesnost, preciznost, REC extrakce a matricový efekt (ME).

1.5.1 Selektivita

Selektivita je schopnost bioanalytické metody rozlišit a měřit analyty i vnitřní standard (IS) za přítomnosti dalších složek vzorku (endogenní složky matrice, metabolity analytu). Prokazuje se pomocí hodnocení interferencí v minimálně 6 vzorcích blanku matrice. Interferující látky jsou akceptovatelné, pokud je jejich odezva menší než 20 % odezvy LLOQ pro analyt a méně než 5 % pro IS.

1.5.2 Přenos analytu mezi analýzami (carry-over)

Carry-over znamená výskyt signálu ve slepém vzorku, který je analyzován po vzorku s nejvyšší koncentrací analytu. Přenos vzorku by neměl být vyšší než 20 % LLOQ. Pokud je přenos vyšší, měly by mezi analýzami vzorku vyšších koncentracích být vloženy slepé vzorky.

1.5.3 Spodní kvantifikační limit (LLOQ)

Jedná se o nejnižší koncentraci analytu, které lze určit s přijatelnou přesností a precizností.

1.5.4 Linearita

Linearita je schopnost metody poskytovat odezvu přímo úměrnou koncentraci analytu ve vzorku v určitém rozsahu. Kalibrační standardy se připravují přidáním známého množství analytu do blankové matrice. Kalibrační křivka se má skládat alespoň z 6 bodů. Nejnižší kalibrační bod odpovídá LLOQ, naopak nejvyšší bod odpovídající nejvyššímu kalibračnímu standardu je označován jako ULOQ (upper limit of quantification). Všechny kalibrační vzorky jsou měřeny v replikátu. Linearita kalibrační přímky je hodnocena korelačním koeficientem (R), který by měl nabývat hodnoty

blízké 1. Kalibrační přímka je definována také rovnicí přímky, pomocí které jsou provedeny zpětné přepočty na koncentraci jednotlivých kalibračních bodů, takto přepočítané koncentrace by se neměly lišit o více než 15 %, u LLOQ o 20%.

1.5.5 Přesnost

Přesnost (accuracy) vyjadřuje těsnost shody stanovené hodnoty s hodnotou referenční (skutečnou). Rozdíl mezi těmito hodnotami se nazývá chyba výsledku. Přesnost se vypočítá dle Vzorec č. 1. Hodnotí se u vzorku obohacených známým množstvím analytu – vzorky pro kontrolu kvality (QC vzorky – quality control sample). Analýza se provede minimálně na čtyřech koncentračních úrovních v 5 opakováních. Jednotlivé koncentrační úrovně by měly pokrýt celou kalibrační křivku – 1. LLOQ, 2. trojnásobek LLOQ (spodní QC), 3. 30-50 % kalibračního rozsahu (střední QC) 4. 75 % kalibračního rozsahu (horní QC). Jednotlivé vzorky by se neměly lišit o více než 15 % od referenční hodnoty, u LLOQ je povoleno 20 %. Pro mezidenní přesnost (interday accuracy) je analýza provedena ve dvou různých dnech také na 4 koncentračních úrovních, ale dostačující jsou 3 opakování. Limity jsou stejné rozdíl 20 % pro LLOQ a 15 % pro ostatní koncentrační úrovně.

$$\text{Přesnost} = \frac{\text{naměřená hodnota}}{\text{referenční hodnota}} \cdot 100\%$$

Vzorec č. 1 výpočet přesnosti

1.5.6 Preciznost

Preciznost (precision) jedná se o míru shody mezi jednotlivými výsledky prováděné opakovaně s homogenním vzorkem. Míra preciznosti se vyjadřuje jako relativní směrodatná odchylka (RSD). Stejně jako přesnost se stanovuje na čtyřech koncentračních úrovních (LLOQ, spodní, střední a horní QC) v 5 opakováních. Hodnocení mezidenní preciznosti se provádí na 4 koncentračních úrovních ve 3 opakováních ve dvou různých dnech. Limity pro preciznost jsou rozdíl 20 % pro LLOQ a 15 % pro ostatní vzorky

1.5.7 Matricový efekt (ME)

ME se projevují jako zeslabení nebo naopak zesílení odezvy signálu v důsledku ovlivnění ionizace při MS detekci. Netěkavé složky matrice, eluující se ve stejný čas jako analyt, s ním soupeří při ionizaci, jelikož ovlivňují vytváření kapky a její

vypařování. ME mohou způsobit endogenní látky v matrici (lipidy, proteiny, močovina, cukry), ale také aditiva MF (pufry) nebo látky použité při úpravě vzorku (TFA). K jejich hodnocení se využívají metody postextrakčního přidavku, porovnání směrníc kalibračních přímek a post-kolonová infuze. Metoda postextrakčního přidavku spočívá v porovnání odezvy vzorku, ke kterému byl přidán analyt až po úpravě vzorku (A) ku vzorku analytu v rozpouštědle bez matrice (B). Výpočet dle Vzorec č. 2. Limit normalizovaného ME (zahrnující i IS) pro validaci vyjádřený jako variační koeficient (CV) je $\pm 15 \%$. ME lze ovlivnit úpravou vzorku, jeho naředěním či úpravou chromatografických podmínek. (Klapková *et al.*, 2019)

$$ME = \frac{A}{B} \cdot 100 \%$$

Vzorec č. 2 výpočet matricových efektů (A = odezva analytu přidaného k blankové matrici post-extrakčně post-spike, B = odezva vzorku standardů bez matrice, ME=matricový efekt)

1.5.8 Výtěžnost (REC)

REC určuje množství analytu, které se vyextrahovalo ze vzorku po jeho úpravě. Stanovuje se metodou postextrakčního přidavku. Jsou porovnávány vzorky ke, kterým byl přidáno stejné množství analytu před úpravou (A) a po úpravě vzorku (B). Výpočet dle Vzorec č. 3. REC by měla být co nejvyšší, ale hlavně konstantní jak pro jednotlivé koncentrační hladiny, tak při opakovaném použití.

$$REC = \frac{A}{B} \cdot 100 \%$$

Vzorec č. 3 Výpočet výtěžnosti (A=odezva analytu ve vzorku matrice s přidaným analytem před extrakci pre-spike, B= odezva analytu přidaného k blankové matrici post-extrakčně post-spike, REC=výtěžnost)

(Nováková & Douša, 2013; Kovaříková & Stariat; Guideline on Bioanalytical Method Validation)

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo optimalizovat úpravu vzorku pomocí SPE pro chromatografické metody stanovení BOS z biologického materiálu. Výsledné postupy poté aplikovat na vzorky pocházející z *in vitro* experimentu.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a instrumentace

Chemikálie

Malondialdehyd tetrabutyl-amonná sůl (MDA), hydroxyd sodný (NaOH), kyselina trichloroctová (TCA), kyselina trifluoroctová (TFA), 2,4-dinitrofenylhydrazin (DNPH), hovězí serový albumin (BSA), Bradfordové činidlo, kyselina octová (AA), 3-nitro-L-tyrosin (3-NT), 3-nitro-L-tyrosin-¹³C₉ ([¹³C₉]3-NT), 2-deoxyguanosin (2dG), 8-oxo-2-deoxyguanosin (8o2dG) a tablety solného fosfátového pufru (PBS) byly zakoupeny u Sigma-Aldrich/Merc (Darmstadt, Německo).

Deuterovaný 1,1,3,3-tetraetoxypropan (d²-TEP), 8-oxo-2deoxyguanosin-¹⁵N₅ ([¹⁵N₅]8o2dG) byly zakoupeny u Cambridge Isotope Laboratories (Tewksbury, USA).

Methanol (MeOH) byl zakoupen u J. T. Baker (Phillipsburg, USA).

Kyselina mravenčí (FA) a acetonitril (ACN) byly zakoupeny u VWR (Leuven, Belgie).

Ultra čistá voda byla získána pomocí Millipore purification systém od Merck – Millipore (Darmstadt, Německo).

Spotřební materiál a chromatografické příslušenství

SPE kolonky Phenomenex STRATA C18-E (55 μm, 70 Å) 100 mg/1 ml, chromatografická kolona KINETEX C18(2) (2,6 μm, 150 x 3 mm, 100 Å) a chromatografická kolona LUNA OMEGA Polar C18 (1.6 μm, 100 x 2.1 mm, 100 Å) byly zakoupeny u Phenomenex (Torrance, USA).

SPE kolonky Biotage Isolute ENV+ (50 mg/1 ml) byly zakoupeny u Biotage (Uppsala, Švédsko).

Pipetovací špičky a mikrozkuřavky byly zakoupeny u Eppendorf (Hamburk, Německo).

96-jamková mikrotitrační destička byla zakoupena u Kartel Labware (Noviglio, Itálie).

Vialky a inserty byly zakoupeny u VWR (Leuven, Belgie).

Millex DURAPORE (PVDF), 0,22 μm stříkačkové filtry od Merc-Millipore (Darmstadt, Německo)

Instrumentace

HPLC systém Shimadzu Prominence skládající se z: DGU-20A Prominence Degasser, LC-20AT Liquid Chromatography Pump, CTO-20A Column Oven, and SIL-20A Prominence Autosampler (Shimadzu, Kjóto, Japonsko). Detektor Thermo Finnigan LCQ Advantage Max Ion Trap hmotnostní spektrometr vybaven APCI zdrojem (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA).

UHPLC 1290 Infinity II LC System + detektor AJS-ESI+QQQ 6470 MS (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)

Analytické váhy ABT-220-4M (KERN&SOHN, Balingen, Německo).

Ultrazvukový homogenizátor Q500 QSONICA (QSONICA Sonicators, Newton, USA).

Třepačka (vortex) Wizard IR Infrared Vortex Mixer (VELP Scientifica, Usmate, Itálie).

Centrifuga IEC CL31R Multispeed Centrifuge (Thermo Fisher Scientific, San Jose, USA).

Thermomixer Comfort vyhřívaná třepačka (Eppendorf, Hamburk, Německo).

Manifold pro SPE extrakci Visiprep 24DL od SUPELCO (Bellefonte, USA).

Koncentrátor vzorků – Termostatované zařízení pro odpařování vzorků pod proudem dusíku DB-3 Sample Concentrator (TECHNE, Cole-Parmer, UK).

Automatické pipety (Eppendorf, Hamburk, Německo).

Infinite 200 PRO UV-VIS mikrodestičkový spektrofotometr od Tecan (Männedorf, Švýcarsko)

Pro validační a statistické výpočty byly použity programy Excel MS Office (Microsoft, Redmond, USA) a GraphPad Prism 9.3.1. (GraphPad Software, San Diego, USA).

3.2 Příprava roztoků a vzorků pro analýzu MDA

3.2.1 Roztoky pro optimalizaci úpravy vzorku při analýze MDA

Roztok NaOH o koncentraci $6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ pro alkalickou hydrolyzu MDA vázaného na proteiny byl připraven rozpuštěním 2,40 g NaOH v 10 ml H₂O.

Roztok 35% (w/w) TCA používaný pro precipitaci proteinů a zároveň okyselení vzorku byl připraven rozpuštěním 3,50 g TCA v 6,50 g H₂O.

Roztok 35% (v/v) TFA použitý při optimalizaci proteinové precipitace byl připraven smísením 354 μl TFA (99%) s 646 μl H_2O .

Roztok 15% (w/w) TCA použitý při optimalizaci proteinové precipitace byl připraven rozpuštěním 0,150 g TCA v 850 μl H_2O .

Roztok 15% (v/v) TFA použitý při optimalizaci proteinové precipitace byl připraven smísením 152 μl TFA (99%) s 848 μl H_2O .

Roztok derivatizačního činidla DNPH o koncentraci 5 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ byl připraven rozpuštěním 9,90 mg DNPH v 10 ml směsi ACN:FA (98:2, v/v).

Zásobní roztok standardu MDA o koncentraci 1 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ byl připraven rozpuštěním 3,14 mg MDA (tetrabutyl amonná sůl) v 10 ml H_2O .

Blankový buněčný homogenát byl získán ultrasonikací buněčných pelet lidského hepatocelulárního karcinomu (HepG2) o stejné pasáži. Takto získaný buněčný homogenát sloužil pro přípravu všech kalibračních křivek a pro validaci metody

Pracovní roztok standardu MDA pro kvantifikaci MDA v biologické matrici o koncentraci 25 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ byl připraven smísením 25 μl zásobního roztoku MDA (1 mM) a 975 μl blankového buněčného homogenátu.

Zásobní roztok IS (d^2 -MDA) byl připraven postupem dle (Tsikar, 2017) kyselou hydrolyzou deuterovaného prekurzoru d^2 -TEP. Výsledná koncentrace zásobního roztoku byla 3,2 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Pracovní roztok IS o koncentraci 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ byl připraven smísením 10 μl zásobního roztoku MDA (3,2 $\text{mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$) a 3190 μl H_2O .

MF A (0,1% FA v H_2O , v/v) byla připravena smísením 1 ml FA s 999 ml H_2O .

3.2.2 Zpracování buněčné pelety

Zmražené ($-80\text{ }^\circ\text{C}$) buněčné pelety byly rozmrazeny za laboratorní teploty. Následně byly resuspendovány v H_2O pro dosažení koncentrace cca 1 milion buněk na 1 ml rozpouštědla. Dále byla provedena sonikace buněk pro uvolnění jejich intracelulárního obsahu. Sonikace všech vzorků byla provedena ultrazvukovým homogenizátorem při amplitudě 20 %, v cyklu 2s/2s po dobu 2 minut.

3.2.3 Finální postup pro úprava vzorku při stanovení MDA

K 250 μl buněčného homogenátu bylo přidáno 10 μl IS ($10 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Provedla se alkalická hydrolyza proteinově vázaného MDA přidavkem 50 μl NaOH ($6 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Vzorek se umístil na 30 minut do blokového termostatu vyhřátého na 60 °C. Následně se vzorek ochladil a podrobil proteinové precipitaci, jako precipitační činidlo sloužilo 150 μl TCA (35%), kyselina zároveň složila i k acidifikaci vzorku. Pro odstranění precipitovaných proteinů se vzorek centrifugoval 10 minut při 10000 RPM a 4 °C. Do čisté mikrozkušavky bylo odebráno 400 μl supernatantu ke, kterým se přidalo 25 μl derivatizačního činidla DNPH ($5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Derivatizace probíhala 60 minut při 37 °C v termomixeru při 300 RPM bez přístupu světla. Dále byl vzorek přečištěn metodou SPE. Kolonka byla kondicionována 1 ml MeOH a 1 ml H₂O, poté byl nanesen vzorek, k propláchnutí bylo použito 750 μl H₂O a analyty byly eluovány 1 ml MeOH. Vzorky byly odpařeny do sucha proudem dusíku při 70 °C. Rekonstituovány 100 μl 70% MeOH a převedeny do vialek s inserty.

3.2.4 Příprava standardů pro kvantifikaci MDA validaci metody

Příprava roztoků pro kalibrační křivku přesnost a preciznost

Roztoky pro vytvoření kalibrační přímky byly připraveny smísením pracovního standardu MDA ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) s blankovým buněčným homogenátem dle tabulky č. 3. Výsledný objem byl 250 μl . Vzorky pro přípravu kalibrační křivky byly připravovány na denní bázi.

Tabulka č. 3 Příprava kalibračních roztoků standardů MDA.

	Pracovního roztoku MDA $25 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (μl)	Blankový buněčný homogenát (μl)	Výsledná koncentrace MDA ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)
L1	1	249	0,1
L2	2	248	0,2
L3	5	245	0,5
L4	10	240	1
L5	15	235	1,5
L6	20	230	2
Blank	0	250	0

Vzorky pro určení přesnosti a preciznosti na koncentračních hladinách L1, L3, L4 a L5 byly připraveny také dle tabulky č. 3. Pro stanovení denní přesnosti a preciznosti se připravilo 5 vzorků každé koncentrační hladiny. Pro stanovení mezidenní přesnosti a preciznosti se následující dva dny připravoval vždy 1 vzorek každé koncentrační hladiny.

Příprava roztoků pro hodnocení ME a REC

Hodnotu ME a REC jsme stanovovaly na dvou koncentračních hladinách odpovídajících L2 a L5.

Roztok MDA v 70% MeOH o koncentraci $25 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ byl připraven smísením $12,5 \mu\text{l}$ zásobního standardu MDA ($1 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$) a $487,5 \mu\text{l}$ MeOH (70%).

Zderivatizovaný standard POST-L2 odpovídající koncentraci $0,2 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ MDA byl připraven smísením $2 \mu\text{l}$ pracovního standardu MDA ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), $248 \mu\text{l}$ MeOH (70%), $10 \mu\text{l}$ IS a $1 \mu\text{l}$ FA, následně byl roztok podroben derivatizaci $25 \mu\text{l}$ DNPH ($5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$) za finálních podmínek viz kapitola 3.2.3 ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 60 min, 300 RPM).

Zderivatizovaný standard POST-L5 odpovídající koncentraci $1,5 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ MDA byl připraven smísením $15 \mu\text{l}$ pracovního standardu MDA ($25 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), $235 \mu\text{l}$ MeOH (70%), $10 \mu\text{l}$ IS a $1 \mu\text{l}$ FA, roztok byl podroben derivatizaci $25 \mu\text{l}$ DNPH (5mM) za finálních podmínek.

Post-spike vzorek odpovídající L2 tvořilo $250 \mu\text{l}$ blankového homogenátu, který byl zpracován finálním postupem (viz 3.2.3). K eluentu z SPE byl přidán předem zderivatizovaný standard POST-L2 v 70% MeOH. Následně byl vzorek odpařen do sucha a rekonstituován $100 \mu\text{l}$ 70% MeOH.

Post-spike vzorek odpovídající L5 tvořilo $250 \mu\text{l}$ blankového homogenátu, který byl zpracován finálním postupem. K eluentu z SPE byl přidán předem zderivatizovaný standard POST-L5 v 70% MeOH. Následně byl vzorek odpařen do sucha a rekonstituován $100 \mu\text{l}$ 70% MeOH.

Roztok MDA v 70% MeOH o koncentraci $0,57 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (ME-L2) byl připraven smísením $1 \mu\text{l}$ zásobního roztoku MDA ($1 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$) s $1754 \mu\text{l}$ MeOH (70%).

Roztok MDA v 70 % MeOH o koncentraci $4,29 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (ME-L5) byl připraven smísením $3 \mu\text{l}$ zásobního roztoku MDA ($1 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$) s $697 \mu\text{l}$ MeOH (70%).

Roztok IS o koncentraci $28,6 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (ME-IS) byl připraven smísením $5 \mu\text{l}$ zásobního roztoku IS ($3,2 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$) s $555 \mu\text{l}$ H_2O .

Rozpouštědlový standard bez matrice odpovídající L2 byl připraven smísením $250 \mu\text{l}$ roztoku ME-L2, $10 \mu\text{l}$ ME-IS a $1 \mu\text{l}$ FA. Po přidavku $25 \mu\text{l}$ DNPH ($5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$) byl podroben derivatizaci za finálních podmínek.

Rozpouštědlový standard bez matrice odpovídající L5 byl připraven smísením $250 \mu\text{l}$ roztoku ME-L5, $10 \mu\text{l}$ ME-IS a $1 \mu\text{l}$ FA. Po přidavku $25 \mu\text{l}$ DNPH ($5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$) byl podroben derivatizaci za finálních podmínek.

Pre-spike vzorky pro stanovení REC se připravovaly na koncentračních hladinách L2 a L5. Roztoky byly připraveny, jak zobrazuje tabulka č. 3 a zpracovány finálním způsobem.

Příprava roztoků pro hodnocení selektivity

První roztok pro hodnocení selektivity byl připraven smísením $260 \mu\text{l}$ 70% MeOH s $1 \mu\text{l}$ FA, následně byl roztok podroben derivatizaci $25 \mu\text{l}$ DNPH ($5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$) za finálních podmínek viz kapitola 3.2.3 ($37 \text{ }^\circ\text{C}$, 60 min, 300 RPM).

Druhý roztok pro hodnocení selektivity byl připraven smísením $260 \mu\text{l}$ PBS s $1 \mu\text{l}$ FA, následně byl roztok podroben derivatizaci $25 \mu\text{l}$ DNPH ($5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$) za finálních podmínek.

3.3 LC-MS/MS podmínky pro stanovení MDA

Analýza byla prováděna HPLC systémem (Shimadzu Prominence) pomocí chromatografické kolony Phenomenex KINETEX C18(2). Vodná složka (A) mobilní fáze byla 0,1% FA v H_2O , organickou složku (B) tvořil MeOH. Separace probíhala za konstantního průtoku $0,270 \text{ ml/min}$ MF. Jednalo se o gradientovou eluci složení MF v čase analýzy bylo následovné: 0 min (50 % B), 0-1 min (75 % B), 1-7 min (75 % B), 7-11 min (50 % B). Teplota na chromatografické koloně byla udržována na $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Do systému bylo nastříkováno $20 \mu\text{l}$ vzorku. MS detekci analytů zajišťovala sférická iontová past (Thermo Finnigan LCQ Advantage Max Ion Trap). K Ionizaci byla použita technika APCI v pozitivním módu. (teplota iontového zdroje $325 \text{ }^\circ\text{C}$, proud na jehle $5 \mu\text{A}$, teplota kapiláry $275 \text{ }^\circ\text{C}$, napětí na kapiláře 14 V, průtok sušícího plynu 65 arb, průtok zamlžujícího plynu 20 arb). Analýza probíhala v režimu sledování vybraných reakcí (SRM – selected reaction monitoring). Byly sledovány přechody m/z 235

$[M+H]^+ \rightarrow m/z 159 + 189$ pro MDA (respektive MDA-DNPH) a $m/z 237 [M+H]^+ \rightarrow m/z 161 + 191$ pro IS (d^2 -MDA-DNPH)

3.4 Stanovení intracelulárního proteinu metodou dle Bradfordové

Příprava roztoků pro sestavení kalibrační přímky v rozsahu 0-1400 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ se prováděla dle tabulky č. 4

Tabulka č. 4 Příprava kalibrační řady pro stanovení intracelulárního proteinu.

	BSA 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ (μl)	H ₂ O (μl)	Koncentrace proteinu ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)
1	0	1000	0
2	20	980	400
3	30	970	600
4	40	960	800
5	50	950	1000
6	60	940	12000
7	70	930	1400

K 20 μl kalibračního standardu se přidalo 400 μl činidla dle Bradfordové. Po promíchání se 200 μl roztoku převedlo do 96 jamkové mikrotitrační destičky v duplikátu.

Jelikož buněčný homogenát obsahoval vyšší množství intracelulárních proteinů, než byl rozsah kalibrační přímky, musel se naředit (ředění bylo poté zohledněno ve výpočtu dle kalibrační přímky). Vzorky buněčného homogenátu byly tedy připravovány takto: 10 μl buněčného homogenitu se smísilo s 10 μl H₂O a s 400 μl činidla, po promíchání se 200 μl roztoku pipetovalo do 96 jamkové mikrotitrační destičky v duplikátu.

Absorbance jednotlivých vzorků byla změřena pomocí destičkového spektrofotometru při vlnové délce 595 nm.

3.5 Vzorky pro analýzu MDA v HepG2 buňkách pro *in vitro* testování toxicity oximových reaktivátorů AChE

Výsledná metoda byla aplikována na HepG2 buňky, které byly inkubovány s roztoky oximových reaktivátorů K048, K074, K075 a K204 (viz obrázek č. 21) o koncentraci způsobující 50% inhibici – IC₅₀ (viz tabulka č. 5) po dobu 1,4, a 24 hodin. Jako pozitivní kontrola sloužily buňky ovlivněné *tert*-butylhydroperoxidem (*t*-BOOH). Vlastní *in vitro* experiment byl prováděn dle (Múčková *et al.*, 2019) na Katedře toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity Obrany.

Tabulka č. 5 IC₅₀ zkoušených oximů.

Oxim	IC ₅₀
K048	30,60 mmol·dm ⁻³
K074	27,18 mmol·dm ⁻³
K075	2,43 mmol·dm ⁻³
K204	2,05 mmol·dm ⁻³
<i>t</i> -BOOH	132,25 μmol·dm ⁻³

3.6 Příprava roztoků a vzorků pro analýzu 3-NT, 2dG a 8o2dG

3.6.1 Roztoky pro optimalizaci SPE úpravy vzorku při analýze 3-NT, 2dG a 8o2dG

Eluční činidlo ACN:MeOH (1:4 v/v) bylo připraveno smísením 2 ml ACN s 8 ml MeOH a přídavkem 10 μl AA (100%).

Eluční činidlo MeOH:ACN (1:4 v/v) bylo připraveno smísením 2 ml MeOH s 8 ml ACN a přídavkem 10 μl AA (100%).

Eluční činidlo ACN:MeOH (1:1 v/v) bylo připraveno smísením 5 ml ACN s 5 ml MeOH a přídavkem 10 μl AA (100%).

Eluční činidlo ACN:MeOH:H₂O (1:3:1 v/v) bylo připraveno smísením 2 ml ACN, 6 ml MeOH s 2 ml H₂O a přídavkem 10 μl AA (100%).

Roztok 0,1% FA (v/v) využitý na rekonstituci vzorku po precipitaci byl připraven smísením 10 μl FA a 9990 μl H₂O.

Roztok 0,5% FA (v/v) využitý na rekonstituci vzorku po precipitaci byl připraven smísením 50 μl FA a 9950 μl H_2O .

Roztok 35% TFA (v/v) použitý při proteinové precipitaci byl připraven smísením 354 μl TFA (99%) s 646 μl H_2O .

Pracovní roztok směsi standardu o koncentraci 100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ byl připraven smísením 10 μl každého standardu (3-NT, [$^{13}\text{C}_9$]3-NT, 8o2dG, [$^{15}\text{N}_5$]8o2dG, 2dG) o koncentrací 10 mg/ml a 950 μl H_2O .

Vzorek plazmy se standardy o koncentraci 1 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ se připravil smísením 495 μl plazmy s 5 μl pracovního roztoku směsi standardů (100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$)

MF A (0,1% FA v H_2O , v/v) byla připravena smísením 1 ml FA s 999 ml H_2O .

3.6.2 Původní metoda úpravy vzorku

Původní metody pro extrakci 3-NT, 2dG a 8o2dG vycházely ze studie (Lam. *et al.*, 2012), která byla koncipována pouze pro extrakci 2dG a 8o2dG. Vzorek tvořící 500 μl plazmy byl smísen s 500 μl H_2O a upraven pomocí SPE na kolonce Biotage Isolute ENV+ (50 $\text{mg}/1\text{ml}$). Pro kondicionaci byl použit 1 ml MeOH a 1 ml H_2O , poté byl nesen 1 ml vzorku. Kolonka byla propláchnuta dvakrát 500 μl H_2O a následná eluce byla provedena dvakrát 700 μl elučním činidlem (ACN:MeOH 1:4, v/v). Vzorek byl odpařen do sucha proudem dusíku a rekonstituován 100 μl MF počátečního složení. Při převedení do insertu vialky byl vzorek ještě filtrován přes 0,22 μm filtr.

3.6.3 Příprava vzorků pro optimalizaci SPE extrakce analytů z plazmy

V rámci optimalizace SPE extrakce byla testována různá eluční a rekonstituční činidla (viz kapitola 3.6.1) a kombinace proteinové precipitace a SPE extrakce:

Precipitace TFA – vzorek se připravil smísením 500 μl plazmy s se standardy (1 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) s 500 μl TFA (35%). Po protřepání se vzorek centrifugoval 10 minut při 10000 RPM a 4 °C. Supernatant se přenesl do čisté mikrozkuhavky a podrobil SPE (1 ml MeOH, 1 ml H_2O , vzorek, dvakrát 500 μl H_2O , dvakrát 700 μl ACN:MeOH 1:4). Vzorek byl odpařen do sucha proudem dusíku a rekonstituován 100 μl 20% MeOH.

Precipitace ACN 1 – vzorek se připravil smísením 500 μl plazmy s se standardy (1 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) s 1,5 ml ACN. Po protřepání se vzorek centrifugoval 10 minut při 10000 RPM a 4 °C. Supernatant se přenesl do čisté mikrozkuhavky a odpařil do sucha

proudem dusíku. Vzorek byl rekonstituován 500 μl 0,1% FA, podrobil SPE (1 ml MeOH, 1 ml H_2O , vzorek, dvakrát 500 μl H_2O , dvakrát 700 μl ACN:MeOH 1:4). Vzorek byl odpařen do sucha proudem dusíku a rekonstituován 100 μl 20% MeOH.

Precipitace ACN 2 – vzorek se připravil smísením 500 μl plazmy s se standardy (1 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) s 1,5 ml ACN. Po protřepání se vzorek centrifugoval 10 minut při 10000 RPM a 4 °C. Supernatant se přenesl do čisté mikrozkušavky a odpařil do sucha proudem dusíku. Vzorek byl rekonstituován 500 μl 0,5% FA, podrobil SPE (1 ml MeOH, 1 ml H_2O , vzorek, dvakrát 500 μl H_2O , dvakrát 700 μl ACN:MeOH 1:4). Vzorek byl odpařen do sucha proudem dusíku a rekonstituován 100 μl 20% MeOH.

Precipitace MeOH – vzorek se připravil smísením 500 μl plazmy s se standardy (1 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$) s 1,5 ml MeOH. Po protřepání se vzorek centrifugoval 10 minut při 10000 RPM a 4 °C. Supernatant se přenesl do čisté mikrozkušavky a odpařil do sucha proudem dusíku. Vzorek byl rekonstituován 500 μl 0,1% FA, podrobil SPE (1 ml MeOH, 1 ml H_2O , vzorek, dvakrát 500 μl H_2O , dvakrát 700 μl ACN:MeOH 1:4). Vzorek byl odpařen do sucha proudem dusíku a rekonstituován 100 μl 20% MeOH.

Precipitace ACN postspike – vzorek se připravil smísením 500 μl plazmy s 1,5 ml ACN. Po protřepání se vzorek centrifugoval 10 minut při 10000 RPM a 4 °C. Supernatant se přenesl do čisté mikrozkušavky a odpařil do sucha proudem dusíku. Vzorek byl rekonstituován 500 μl 0,1% FA, podrobil SPE (1 ml MeOH, 1 ml H_2O , vzorek, dvakrát 500 μl H_2O , dvakrát 700 μl ACN:MeOH 1:4). Následně bylo přidáno 5 μl pracovního roztoku směsi standardů (100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$). Vzorek byl odpařen do sucha proudem dusíku a rekonstituován 100 μl 20% MeOH.

Precipitace MeOH postspike – vzorek se připravil smísením 500 μl plazmy s 1,5 ml MeOH. Po protřepání se vzorek centrifugoval 10 minut při 10000 RPM a 4 °C. Supernatant se přenesl do čisté mikrozkušavky a odpařil do sucha proudem dusíku. Vzorek byl rekonstituován 500 μl 0,1% FA, podrobil SPE (1 ml MeOH, 1 ml H_2O , vzorek, dvakrát 500 μl H_2O , dvakrát 700 μl ACN:MeOH 1:4). Následně bylo přidáno 5 μl pracovního roztoku směsi standardů (100 $\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$). Vzorek byl odpařen do sucha proudem dusíku a rekonstituován 100 μl 20% MeOH.

3.7 LC-MS/MS podmínky pro stanovení 3-NT, 2dG a 8o2dG

Analýza analytu byla prováděna UHPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie za zvýšeného tlaku – ultra high performance liquid chromatography) systémem (1290 Infinity II) pomocí chromatografické kolony LUNA OMEGA Polar C18. Vodná složka (A) mobilní fáze byla 0,1% FA v H₂O, organickou složku (B) tvořil ACN. Separace probíhala za konstantního průtoku 0,280 ml/min MF. Jednalo se o gradientovou eluci a složení MF v čase analýzy bylo následovné: 0-3 min (8 % B), 3-4 min (80 % B), 4-5 min (80 % B), 5-5,5 min (8 % B), 5,5-9 min (8 % B). Teplota na chromatografické koloně byla udržována na 40 °C. Do systému bylo nastříkováno 20 µl vzorku. MS detekci analytů zajišťoval QqQ (AJS, Agilent). K Ionizaci byla použita technika ESI v pozitivním módu. (viz tabulka č. 6). Režim analýzy byl SRM. Pro jednotlivé analyty byly sledovány následující SRM přechody m/z 289 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 173 pro IS [¹⁵N₅]8o2dG, m/z 284 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 168 pro 8o2dG, m/z 268 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 152 pro 2dG, m/z 236 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 189,1 pro IS [¹³C₉]3-NT, m/z 227 $[M+H]^+ \rightarrow m/z$ 181 pro 3NT.

Tabulka č. 6 Parametry iontového zdroje při analýze 3-NT, 2dG a 8o2dG.

Gas temp	300 °C
Gas Flow	5 l·min ⁻¹
Nebulizer	45 psi
Sheath gas temp	400 °C
Sheat gas flow	9 l·min ⁻¹
Capilary	2000 V
Nozzle voltage	500 V

4 VÝSLEDKY PRÁCE

4.1 Optimalizace metody stanovení MDA

Metodu jsme se rozhodly optimalizovat kvůli změně IS, kterým ve výchozí metodě byl strukturní analog MDA glutaraldehyd. Naším novým IS byl izotopicky značený d^2 -MDA. Některé z kroků byly právě přizpůsobeny původnímu IS, proto jsme zkoušely postupnou modifikaci jednotlivých kroků úpravy vzorku.

Původní metoda úpravy vzorku:

- 250 μ l buněčného homogenátu
- Alkalická hydrolyza přidavkem 50 μ l NaOH ($6 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) 30 min při 60 °C
- Proteinová precipitace pomocí 150 μ l TCA (35%) + 10 μ l IS (glutaraldehyd) a následná centrifugace (10 min, 10000 RPM, 4 °C)
- Odebrání 400 μ l supernatantu a jeho derivatizace 50 μ l DNPH ($5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$) 60 min (37 °C, 300 RPM)
- SPE kondicionace 1 ml MeOH následně 1 ml H₂O, nanesení vzorku, propláchnutí 250 μ l H₂O, eluce 1 ml MeOH
- Odpaření do sucha a rekonstituce v 250 μ l MeOH (70%)

4.1.1 Precipitace

Jako první jsme se zaměřily na proteinovou precipitaci, kde jsem zkoušely dvě precipitační činidla – TCA a TFA ve dvou koncentracích – 15% a 35%. Cílem bylo, aby vzniklý precipitát byl dobře oddělitelný a zároveň, aby přidavek činidla byl schopen vzorek dostatečně okyselit, protože v předchozím kroku byla prováděna alkalická hydrolyza pomocí NaOH a vzorek měl silně zásadité pH. Okyselení vzorku je důležité pro následný krok, neboť derivatizace MDA pomocí DNPH probíhá v kyselém prostředí. Obě 15% kyseliny v objemu 150 μ l nebyly schopny vzorek okyselit, proto byly nevhodnými kandidáty. Rozdíl mezi 35% TCA a TFA nebyl příliš výrazný, ale vzorky precipitované TCA měly vyšší odezvu pro MDA. Proto jsem se rozhodly tento krok úpravy zachovat dle původní metody – 150 μ l TCA (35%).

4.1.2 Derivatizace

Dále jsme optimalizovaly objem derivatizačního činidla DNPH ($5 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$). Zkoušely jsme objemy 50 μ l, 25 μ l a 10 μ l. Podmínky zůstaly stejné (60 min, 37 °C,

300 RPM). Tento krok je důležité optimalizovat zejména proto, že nezreagovaný DNPH interferuje s MDA v průběhu LC-MS/MS analýzy. Jako nevhodné se ukázalo 10 μl , kde byla pozorována značně snížená odezva pro MDA. Pravděpodobně toto množství činidla nebylo schopno derivatizovat veškerý přítomný MDA. V případě přídavku 25 μl a 50 μl byla pozorována srovnatelná odezva i při koncentraci 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. A proto byl přídavek 25 μl vyhodnocen jako dostačující pro kvantitativní průběh derivatizace MDA.

4.1.3 SPE promytí

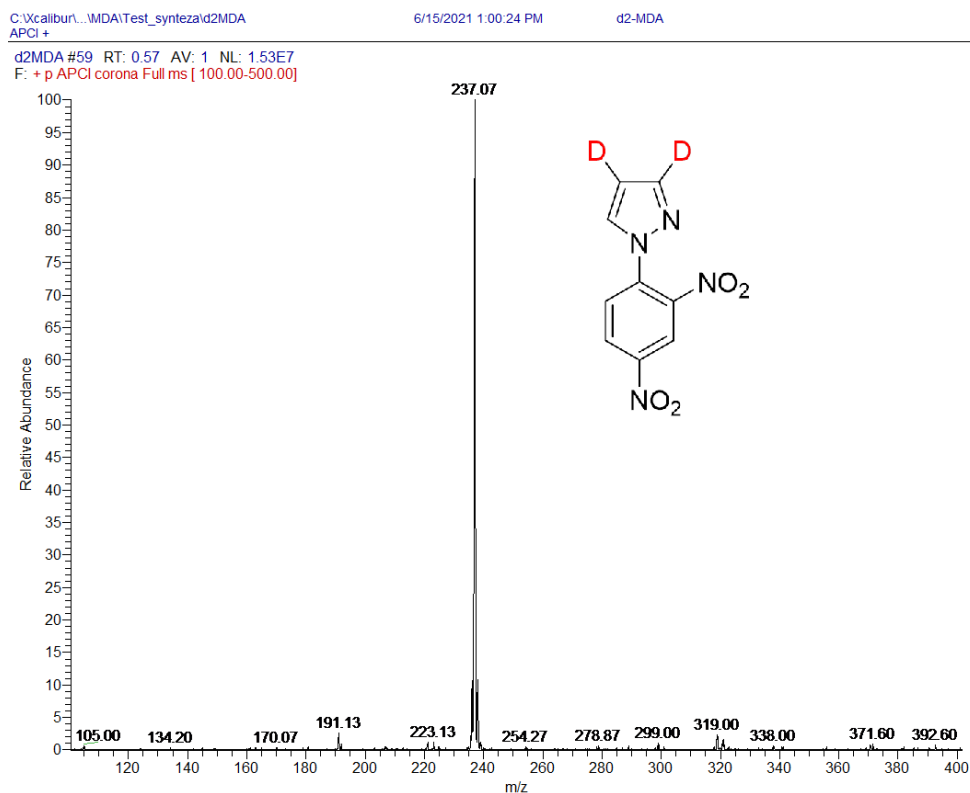
Při optimalizaci SPE jsme se zaměřily zejména na krok promývání. Vzhledem k tomu, že původní IS vykazoval v porovnání s MDA slabší retenci na C18 SPE kolonce. Zkoušely jsme objemy 250 μl , 500 μl a 750 μl . Se zvyšujícím objem promývací kapaliny docházelo dokonce ke zvyšování odezvy MDA, což značí efektivnější odstranění balastních a interferujících látek. Rozhodly jsme se proto dále využívat objem 750 μl H_2O .

4.1.4 Rekonstituce

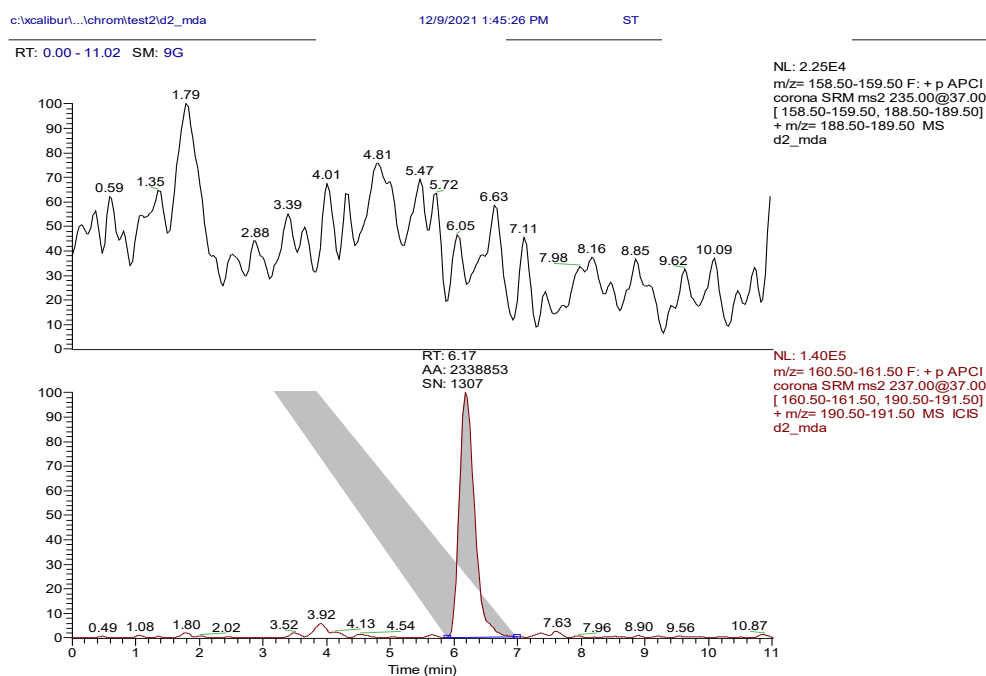
Poslední, na co jsme se zaměřily, byl objem rekonstitučního činidla (70% MeOH). Porovnávaly jsme 250 μl a 100 μl . Ani ve vzorku rekonstituovaném 100 μl nebyl v chromatogramu výrazně zesílen šum a díky většímu zakoncentrování poskytoval vyšší odezvu. Proto jsme se rozhodly dále využívat objem 100 μl 70% MeOH

4.2 Kontrola čistoty IS

Vzhledem k tomu, že IS není komerčně dostupný, byla potřeba jeho syntéza. Před použitím IS bylo nutné ověřit identitu $\text{d}^2\text{-MDA}$ a také, že neobsahuje žádné významné množství nedeuterovaného MDA, které by interferovalo s endogenními hladinami MDA. Bylo zjištěno, že ani po přímém nástřiku koncentrovaného IS do MS systému (obrázek č. 8), ani při použití koncentrace používané pro reálné vzorky (obrázek č. 9) není MDA v relevantním množství přítomný.



Obrázek č. 8 Přímý nástřik zderivatizovaného koncentrovaného IS ($3,2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) do MS systému za účelem hodnocení čistoty nasyntetizovaného d2-malondialdehydu. Hodnota m/z 237 odpovídá deuterovanému MDA zderivatizovanému pomocí 2,4.dinitrophenylhydrazinu.



Obrázek č. 9 Chromatogram analýzy roztoku IS o koncentraci $10 \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ za finálních chromatografických podmínek. Chromatogram při sledování SRM přechodu MDA je uveden v horní sekci a v dolní sekci je uveden chromatogram při sledování SRM přechodu IS.

4.3 Validace

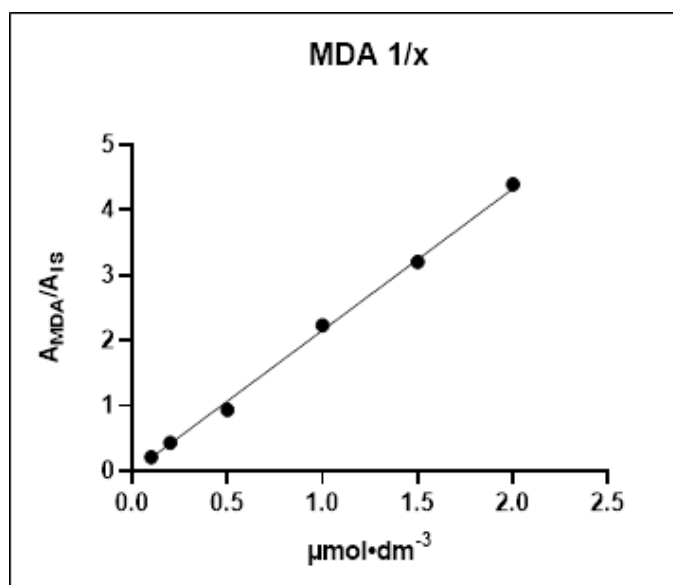
Validační parametry byly hodnoceny podle směrnice EMA pro validace bioanalytických metod. Hodnotily jsme denní a mezidenní přesnost a preciznost, REC, ME, linearitu, specifitu a přenos. V tabulce č. 7 jsou uvedeny vypočítané hodnoty pro přesnosti, preciznosti, REC a ME. Přesnost je vyjádřena jako průměr ± směrodatná odchylka (SD) (denní n=5, mezidenní n=4). Za daných podmínek bylo dosaženo přijatelné přesnosti (85 % – 115 %). Preciznost je vyjádřena jako CV (denní n=5, mezidenní n=4). Dosažená preciznost vyhovuje limitům validace (<15 %). REC je vyjádřena jako průměr ± SD (n=2). IS normalizovaný ME je vyjádřen jako CV (n=2). Nebyly pozorovány žádné významné ME (ME <10 %).

Tabulka č. 7 Vypočítané validační parametry pro jednotlivé koncentrační hladiny. Denní přesnost je vyjádřena jako průměr ± SD (n=5). Mezidenní přesnost je vyjádřena jako průměr ± SD (n=4). Denní preciznost je vyjádřena jako variační koeficient (CV, n=5). Mezidenní preciznost je vyjádřena jako CV (n=4). Výtěžnost je vyjádřena jako průměr ± SD (n=2). IS normalizovaný matricový efekt je vyjádřen jako CV (n=2).

Koncentrace MDA ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	0.1	0.2	0.5	1.0	1.5
Denní přesnost (%)	92.13 ± 5.04	-	95.37 ± 4.34	101.29 ± 4.20	94.70 ± 2.45
Mezidenní přesnost (%)	108.57 ± 6.13	-	94.20 ± 2.70	102.41 ± 1.73	102.87 ± 2.59
Denní preciznost (%)	10.94	-	9.14	8.28	5.17
Mezidenní preciznost (%)	11.32	-	5.72	1.62	5.02
Výtěžnost (%)	-	85.63 ± 3.99	-	-	83.48 ± 4.51
IS normalizovaný matricový efekt (%)	-	4.66	-	-	2.17

Linearita byla hodnocena v rozsahu 0,1– 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Jako LLOQ byla stanovena hodnota 0,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, která splňovala podmínku přesnosti ($\pm 20\%$) i preciznosti ($\leq 20\%$). Blankový homogenát byl použitý jako nulový kalibrátor, jeho odezva MDA byla odečtena od odezvy MDA na každé kalibrační hladině. Následně byla sestavena

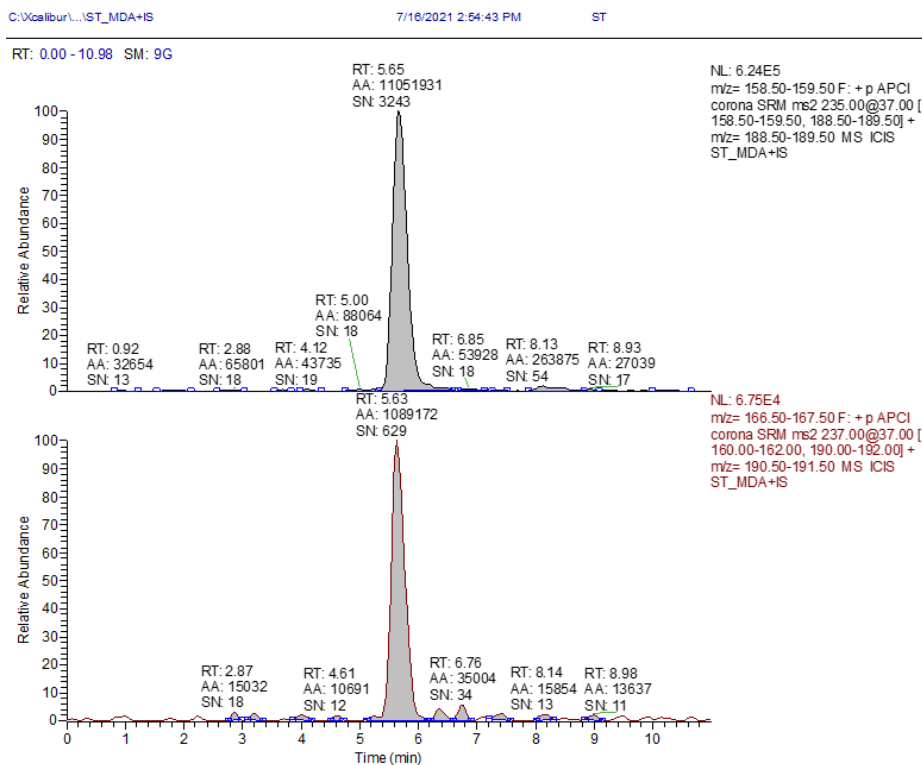
vážená kalibrační přímka (1/x). Každý den měření byla připravována nová kalibrační přímka. Příklad kalibrační přímky je uveden na obrázku č. 10, kde na ose x je vynesena koncentrace MDA a na ose y je vyjádřen poměr ploch píku MDA a IS ($A_{\text{MDA}}/A_{\text{IS}}$).



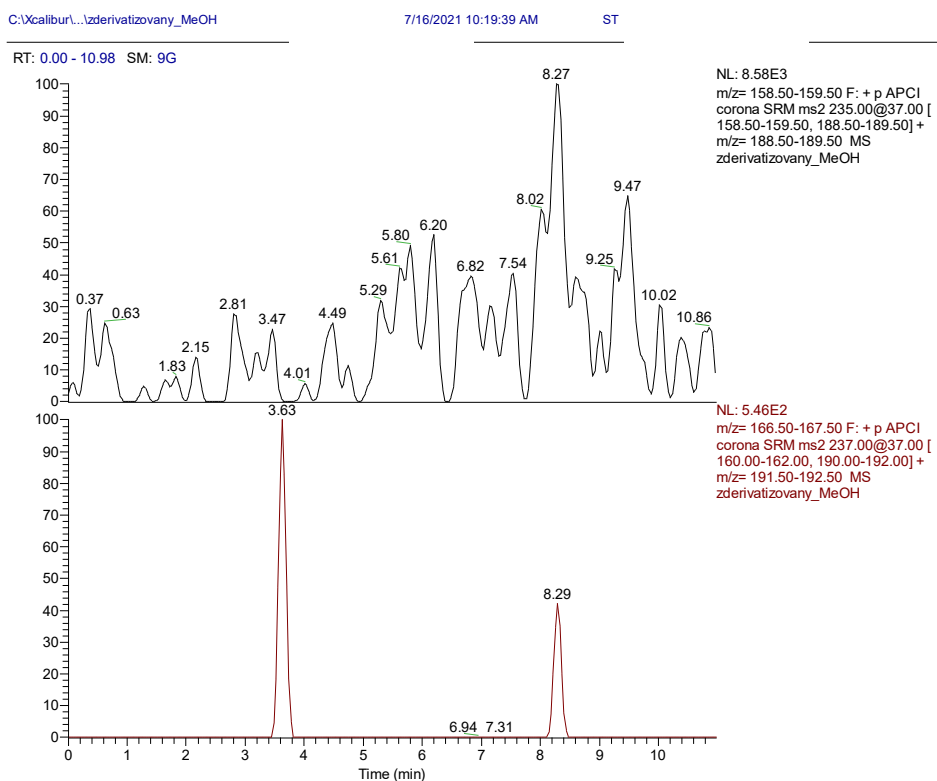
Obrázek č. 10 Kalibrační přímka vážená 1/x stanovení MDA v HepG2.

Rovnice přímky: $y=2.171x - 0,0143$; korelační koeficient $R^2=0,9971$.

Cílem hodnocení selektivity bylo zjistit, že použití žádného činidla v průběhu úpravy vzorku nezpůsobuje uměle vytvořenou MDA a případně nedochází k interferenci s jinými látkami. Vzhledem k tomu, že MDA je fyziologicky vyskytující se endogenní látka, nebylo možné stanovit selektivitu vůči blankové matrici. Následující chromatogramy zobrazují analýzu standardu (obrázek č. 11), 70% MeOH (obrázek č. 12) a PBS (obrázek č. 13).

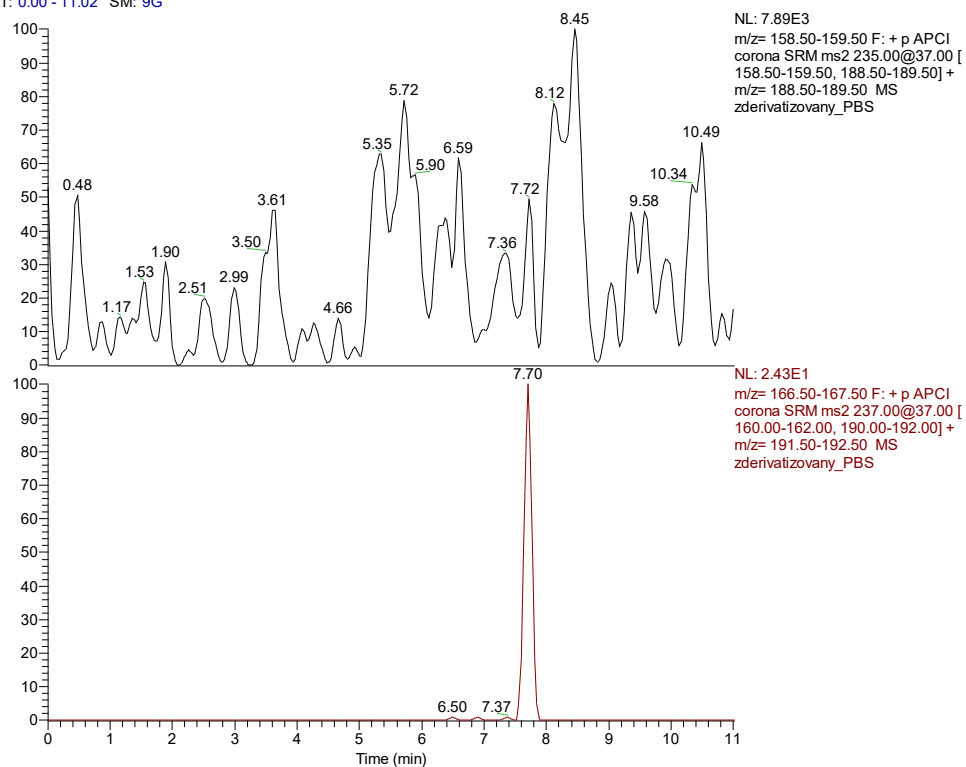


Obrázek č. 11 Chromatogramy analýzy standardu. Chromatogram při sledování SRM přechodu MDA je uveden v horní sekci a v dolní sekci je uveden chromatogram při sledování SRM přechodu IS



Obrázek č. 12 Chromatogramy analýzy 70% MeOH při hodnocení selektivity. Chromatogram při sledování SRM přechodu MDA je uveden v horní sekci a v dolní sekci je uveden chromatogram při sledování SRM přechodu IS.

RT: 0.00 - 11.02 SM: 9G



Obrázek č. 13 Chromatogramy analýzy PBS při hodnocení selektivity. Chromatogram při sledování SRM přechodu MDA je uveden v horní sekci a v dolní sekci je uveden chromatogram při sledování SRM přechodu IS.

4.4 Analýza MDA v HepG2 buňkách pro *in vitro* testování toxicity oximových reaktivátorů

Množství intracelulárního proteinu v homogenátu HepG2 buněk vystavených působení oximů v daných časových intervalech bylo stanoveno metodou dle Bradfordové postupem uvedeným v kapitole 3.4. Výsledky zobrazuje tabulka č. 8, kde je uvedena průměrné množství proteinu v mg \pm SD (n=2).

Tabulka č. 8 Množství intracelulárního proteinu v homogenátu HepG2 buněk vystavených oximům v časových intervalech 1, 4 a 24 hodin. Vyjádřeno v mg \pm SD (n=2).

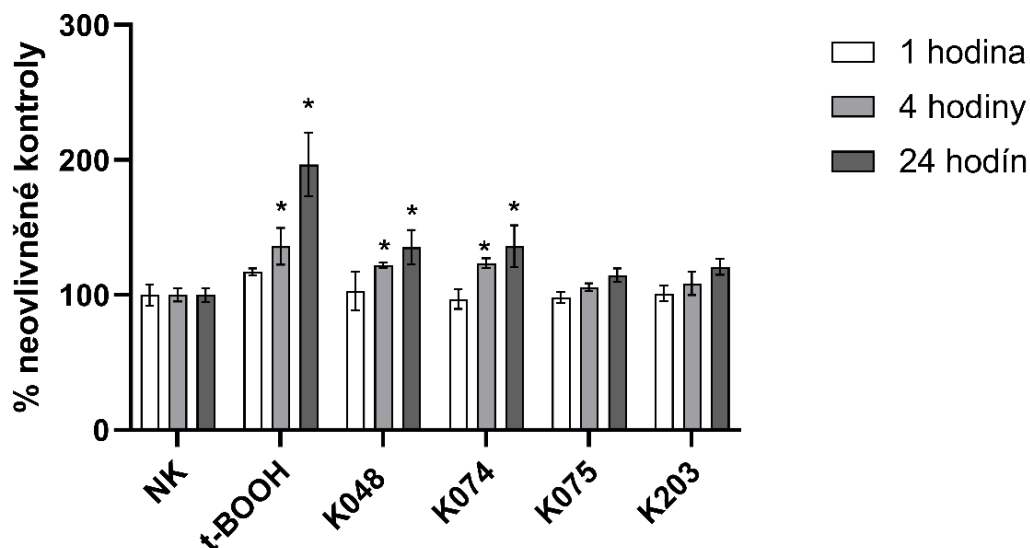
Vzorek	Čas (h)	Protein (mg)
K048	1	1.45 \pm 0.04
	4	1.53 \pm 0.05
	24	0.85 \pm 0.08
K074	1	1.17 \pm 0.25
	4	0.87 \pm 0.18
	24	0.91 \pm 0.11
K075	1	0.68 \pm 0.16
	4	0.97 \pm 0.12
	24	0.46 \pm 0.07
K203	1	1.02 \pm 0.11
	4	0.92 \pm 0.08
	24	0.75 \pm 0.06
t-BOOH	1	0.97 \pm 0.08
	4	0.75 \pm 0.07
	24	0.69 \pm 0.05
Kontrola	1	1.75 \pm 0.11
	4	1.70 \pm 0.15
	24	1.43 \pm 0.05

Koncentrace MDA stanovená ve vzorcích byla vztažena na množství intracelulárního proteinu, který byl stanoven spektrofotometricky dle Bradfordové. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 9 jako průměr \pm SD (n=3).

Tabulka č. 9 Koncentrace MDA vztažená na množství intracelulárního proteinu v HepG2 buňkách vystavených oximům po dobu 1, 4 a 24 hodin. Koncentrace analytu je vyjádřena jako $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ celkového proteinu $\pm\text{SD}$ (n=3).

Vzorek	Čas (h)	MDA ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$)
K048	1	0.98 ± 0.08
	4	1.12 ± 0.05
	24	1.11 ± 0.05
K074	1	0.93 ± 0.02
	4	1.18 ± 0.09
	24	1.12 ± 0.10
K075	1	0.94 ± 0.06
	4	1.01 ± 0.05
	24	0.94 ± 0.02
K203	1	0.97 ± 0.07
	4	1.04 ± 0.12
	24	0.99 ± 0.02
<i>t</i> -BOOH	1	1.12 ± 0.09
	4	1.30 ± 0.18
	24	1.61 ± 0.12
Kontrola	1	0.96 ± 0.08
	4	0.95 ± 0.05
	24	0.82 ± 0.04

Na obrázku č. 14 je zobrazen graf, který znázorňuje výsledky z tabulky č. 9 vyjádřené jako procentuální změna obsahu MDA v buňkách exponovaných oximovým reaktivátorům AChE vzhledem ke kontrolním buňkám. Jako pozitivní kontrola byl použit *t*-BOOH, který je konvenčně používán jako silný induktor oxidačního stresu *in vitro*.



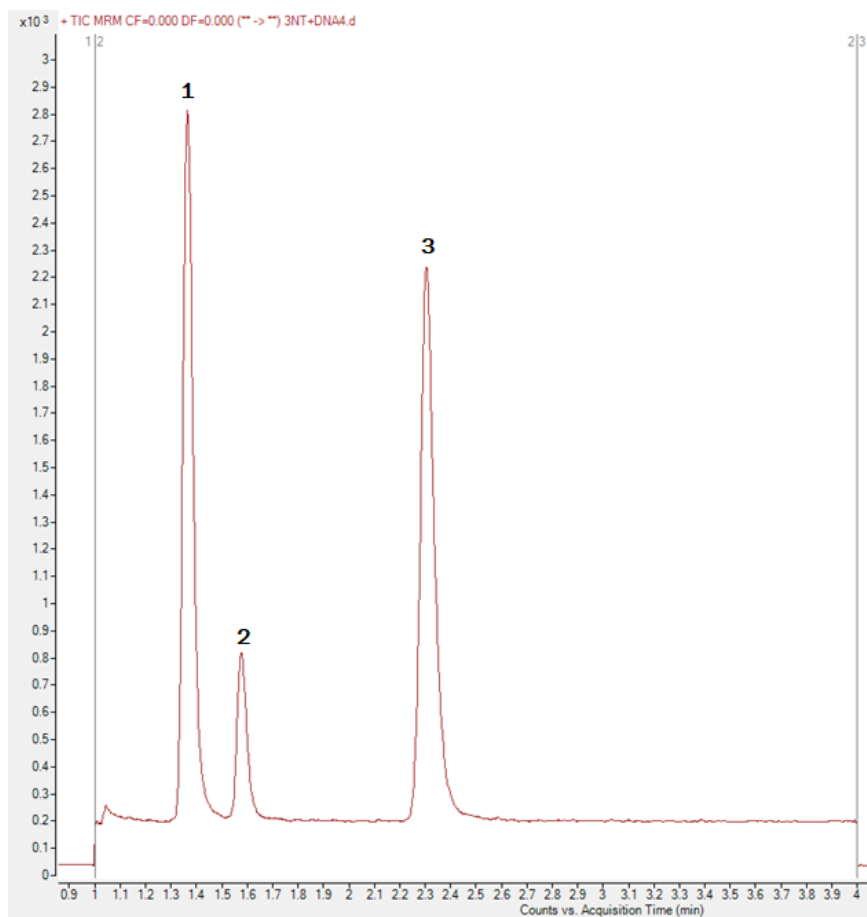
Obrázek č. 14 Hladiny MDA nalezené v HepG2 buňkách po 1, 4 a 24 hodinách expozice K048, K074, K075 a K203 v koncentraci odpovídající jejich hodnotě IC₅₀. Výsledky jsou vyjádřeny v % vůči negativní kontrole (NK; neovlivněné buňky). Hodnoty v grafu představují průměr ± SD (n=3). Statisticky významné výsledky mezi neovlivněnými buňkami a buňkami exponovanými oximům (One-way ANOVA, Dunnettův test) jsou v grafu označeny * (p ≤ 0,05).

4.5 Optimalizace metody stanovení 3-NT, 2dG a 8o2dG

První jsme si ověřili podmínky původní metody pro stanovení 3-NT, 2dG a 8o2dG. Pro koncentraci analytu 5 ng·ml⁻¹. Na chromatografu byly viditelné všechny analyty (viz obrázek č. 15)

Za účelem dosažení dobré odezvy a tvaru píku bylo optimalizováno složení rekonstitučního činidla (200 µl), kde jsme porovnávaly MF počátečního složení, 20% MeOH, 50% MeOH a 50% ACN. Odezvu jednotlivých analytů zobrazuje tabulka č. 10, výsledné chromatografy jsou na obrázku č. 16. Nejlepší odezvu a tvar píku poskytoval 20% MeOH.

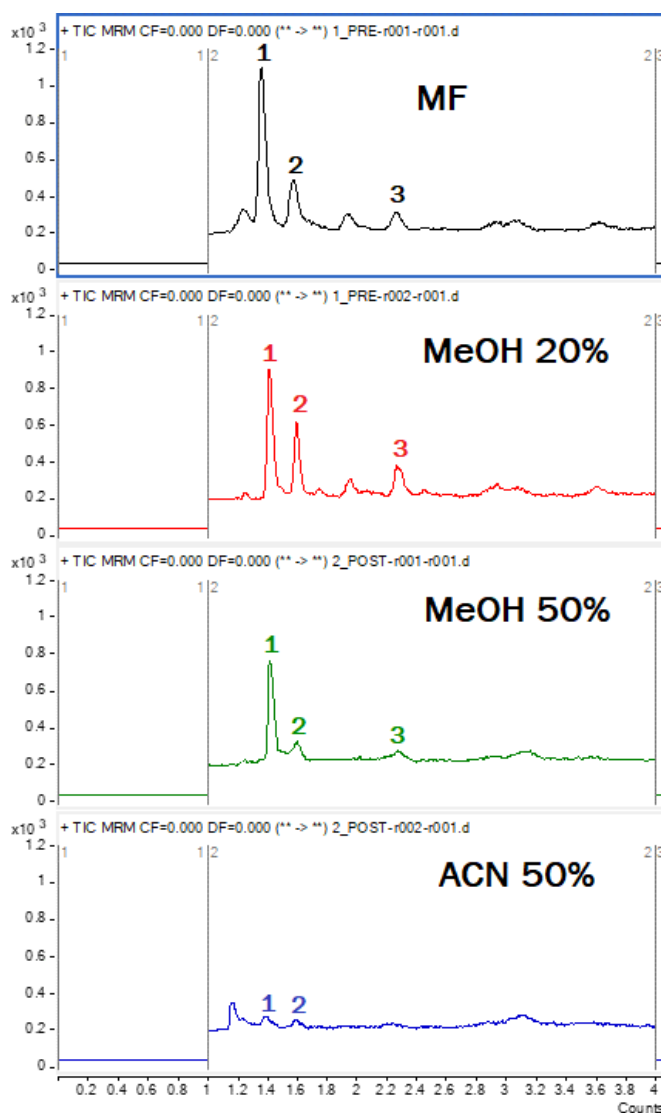
Aplikací původního SPE postupu nebylo dosaženo uspokojivé výtěžnosti pro 3-NT a jeho IS. Pro optimalizaci jsme zkoušely různá eluční činidla (ACN:MeOH 1:4 v/v, ACN:MeOH 1:1 v/v, MeOH:ACN 1:4 v/v, ACN:MeOH:H₂O 1:3:1 v/v/v). Změna poměru ACN:MeOH ale nevedla k zvýšení výtěžnosti extrakce pro 3-NT. Jako výsledné eluční činidlo se tedy dále používalo ACN:MeOH 1:4 v/v.



Obrázek č. 15 Chromatogram standardů o koncentraci $5 \text{ ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ve 20% MeOH při analýze 2dG, 8o2dG a 3-NT. (1 = 2dG, 2 = 8o2dG+[$^{15}\text{N}_5$]8o2dG, 3 = 3-NT+[$^{13}\text{C}_9$]3-NT)

Tabulka č. 10 Odezvy analytů při použití MF, 20% MeOH, 50% MeOH a 50% ACN jako rekonstitučních činidel v objemu 200 μl .

Rekonstituční činidlo	2dG	8o2dG	[$^{15}\text{N}_5$]8o2dG	3NT	[$^{13}\text{C}_9$]3-NT
MF	3052	595	439	295	200
20% MeOH	1946	603	481	388	303
50% MeOH	1495	197	134	-	-
50% ACN	206	57	11	-	-

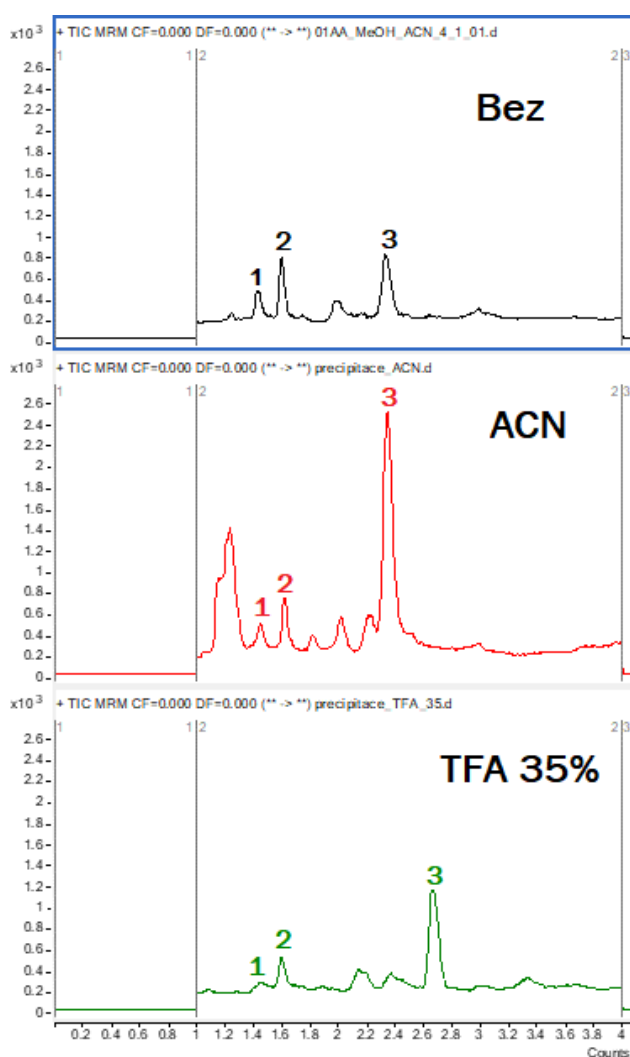


Obrázek č. 16 Chromatografy při použití MF, 20% MeOH, 50% MeOH a 50% ACN jako rekonstitučních činidel v objemu 200 μ l. (1 = 2dG, 2 = 8o2dG+[¹⁵N₅]8o2dG, 3 = 3-NT+[¹³C₉]3-NT)

Jako další jsme zkusily přidat před SPE krok PP. Vzhledem k tomu, že na SPE kolonku se nanáší větší objem plazmy (0,5 ml), může dojít k jejímu ucpání proteiny a tím by mohlo dojít ke zhoršení extrakční účinnosti. V jednom případě jsme použily k precipitaci 35% TFA (1:1 v/v), druhém případě jsme precipitovaly pomocí ACN (1:3 v/v) a po odpaření supernatantu vzorek se vzorek rekonstituoval v 0,1% FA. Kompletní způsob zpracování je uveden v kapitole 3.6.3 Odezvu jednotlivých analytů zobrazuje tabulka č. 11, výsledné chromatografy jsou na obrázku č. 17. Vzorek precipitovaný ACN vykazoval téměř čtyřnásobnou odezvu pro 3-NT a jeho IS, oproti metodě bez precipitace a odezva 8o2dG nebyla významně snížena.

Tabulka č. 11 Odezvy analytů bez precipitace a při použití precipitace ACN a TFA 35%.

Precipitační činidlo	2dG	8o2dG	[¹⁵ N ₅]8o2dG	3NT	[¹³ C ₉]3-NT
Bez precipitace	600	775	629	1399	1251
ACN	601	697	618	5826	4547
TFA 35%	-	433	390	2411	2040



Obrázek č. 17 Chromatografy bez precipitace a po přidání precipitace ACN a TFA 35%. (1 = 2dG, 2 = 8o2dG+[¹⁵N₅]8o2dG, 3 = 3-NT+[¹³C₉]3-NT)

Následně jsme připravily vzorek, který byl po precipitaci rekonstituován 500 μ l 0,5% FA místo 0,1% FA. Vzorek, kde jsme k precipitaci využily MeOH (1:3 v/v) namísto

ACN rekonstituovaný 0,1% FA. Rekonstituce 0,5% FA po precipitaci ACN nevedla k zvýšení odezvy 3NT. Precipitace MeOH vedla k zvýšení odezvy všech analytů téměř dvojnásobně oproti precipitaci ACN. Odezvy zobrazuje tabulka č. 12

Tabulka č. 12 Odezvy analytů při provedení precipitace pomocí ACN a MeOH a rekonstituci 0,1% FA nebo 0,5% FA.

Precipitační + rekonstituční činidlo	2dG	8o2dG	[¹⁵ N ₅]8o2dG	3NT	[¹³ C ₉]3-NT
ACN+0,1% FA	598	435	291	4254	3358
ACN+0,5% FA	360	871	775	2074	2452
MeOH+0,1% FA	1342	909	760	8233	6531

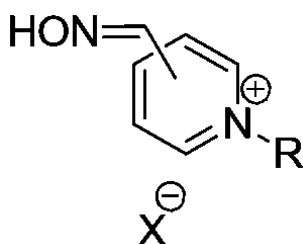
Posledním krokem, který jsme uskutečnily bylo ověření výtěžnosti při postupu precipitace pomocí ACN (1:3 v/v) a MeOH (1:3 v/v), odpaření supernatantu, rekonstituce 500 µl 0,1% FA a SPE. Výsledky výtěžnosti v porovnání s výtěžností původní metody jsou uvedeny v tabulce č. 13. Takto vysoká výtěžnost u 3-NT a jeho IS byla uspokojivá, vzhledem k tomu, že výtěžnost původní metody byla u 3-NT kolem 7 %. Bohužel došlo zároveň ke snížení výtěžnosti SPE extrakce pro 2dG a 8o2dG, proto bude potřeba dále hledat takové extrakční podmínky, které by zajistily vysokou míru výtěžnosti pro všechny analyty. Vzhledem k tomu že vzorky plazmy jsou až pětkrát zakoncentrovány, bude také nutné vyhodnotit vliv matricového efektu na sledované analyty.

Tabulka č. 13 Výtěžnost při použití precipitace ACN, MeOH a původní metody.

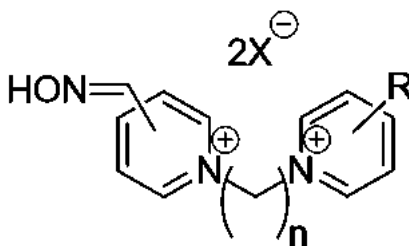
Výtěžnost (%)	2dG	8o2dG	[¹⁵ N ₅]8o2dG	3NT	[¹³ C ₉]3-NT
ACN	79	64	50	21,	23
MeOH	-	64	68	75	72
Původní metoda	67	90	96	7	7

5 DISKUZE

Studium toxicity (Múčková et al 2018) kolorimetrickým stanovením buněčné viability (MTT test), ukázalo, že existuje spojitost mezi strukturou oximových reaktivátorů AChE a jejich toxicitou. Obecné strukturální vzorce pro monokvaternární a biskvaternární oximy jsou uvedeny na obrázku č. 18 a obrázku č. 19. Nejnižší toxicitu vykazovaly biskvaternární oximy s 3C spojovacím řetězcem, inserce kyslíku do 3C řetězce toxicitu zvyšovala, zejména pokud došlo také k přesunu oximové skupiny z polohy 4 pyridinového jádra do polohy 2. U látek obsahujících 4C spojovací řetězec bylo pozorováno zvýšení toxicity v případě, že obsahoval dvojnou vazbu.



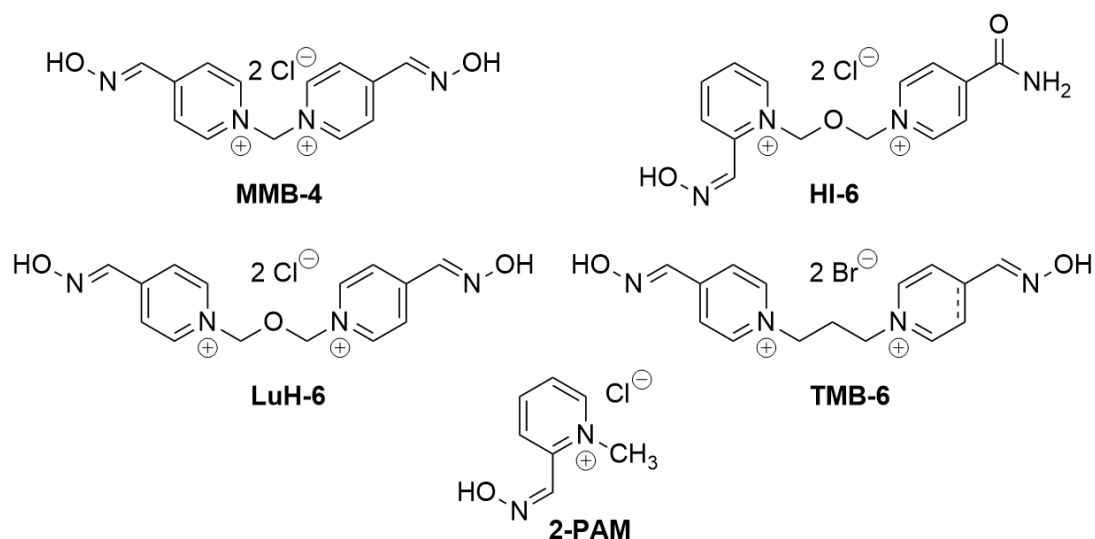
Obrázek č. 18 Obecný vzorec monokvaternárního oximu.



Obrázek č. 19 Obecný vzorec biskvaternárního oximu.

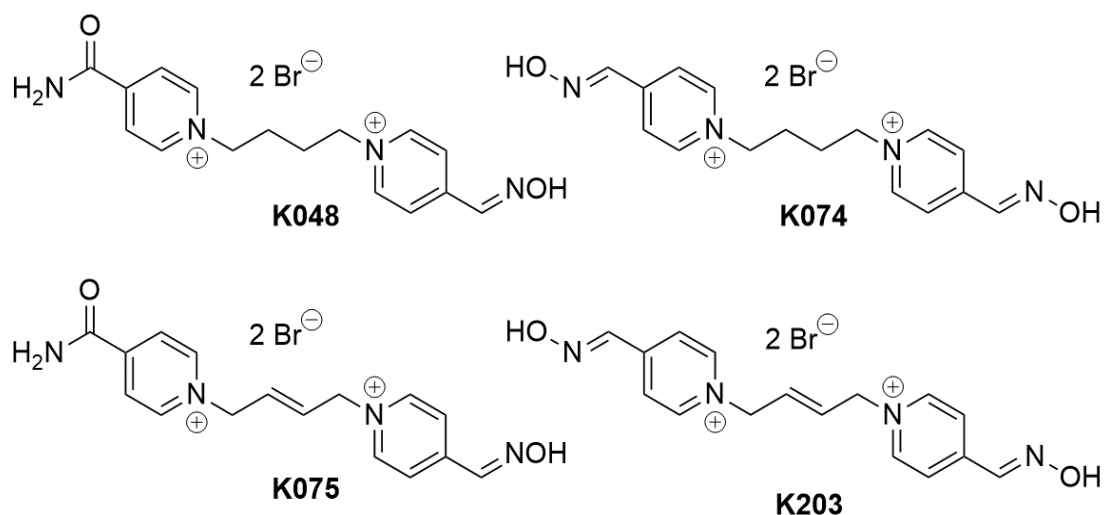
Vzhledem k tomu, že toxicita léčiv může být způsobena oxidačním stresem, který indukují, byla provedena studie (Múčková et al 2019), která hledala spojitost mezi strukturálními znaky pěti strukturálně odlišných oximů (asoxim, metoxim, obidoxim, pralidoxim a trimedoxim) a intenzitou vyvolaného oxidačního stresu *in vitro*. Zahrnuty byly oximy s jedním nebo dvěma pyridinovými jádry, různou délkou a modifikací spojovacího řetězce, odlišnou polohou a počtem oximových skupin. Struktury těchto oximů jsou zobrazeny na obrázku č. 20. V rámci této *in vitro* studie byla pomocí fluorescenčních sond (dihydroethidium – DHE a 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetát – DCFH-DA) hodnocena schopnost oximů produkovat RONS. Dále stanovením různých markerů (MDA, 3-NT, thiolů a disulfidů) bylo zjištěno, že největší

potenciál indukovat oxidační stres mají biskvarterní oximy obsahující dvě aldoximové skupiny v 4 poloze pyridinového jádra (obidoxim, trimedoxim a methoxim). Délka spojovacího řetězce a přítomnost kyslíku v něm nevykazovaly významné rozdíly v indukci oxidačního stresu.



Obrázek č. 20 Chemické struktury oximových reaktivátorů acetylcholinesterasy: methoxim (MMB-4), asoxim (HI-6), obidoxim (LuH-6), trimedoxim (TMB-4) a pralidoxim (2-PAM).

Pro detailnější studium vztahu mezi strukturou a indukcí oxidačního stresu byly pro další experiment vybrány molekuly s menšími strukturálními rozdíly než v předchozí studii. Námi hodnocené oximy (viz obrázek č. 21) jsou biskvarterní sloučeniny s 4C spojovacím řetězcem, který ve dvou případech obsahuje dvojnou vazbu (K075, K203). Na pyridinovém cyklu ve 4 poloze nesou aldoximovou skupinu. Oximy K074 a K075 mají oba cykly substituované aldoximovou skupinou ve 4 poloze, na rozdíl od nich je u oximů K048 a K203 je druhé pyridinové jádro substituované ve 4 poloze amidickou skupinou.

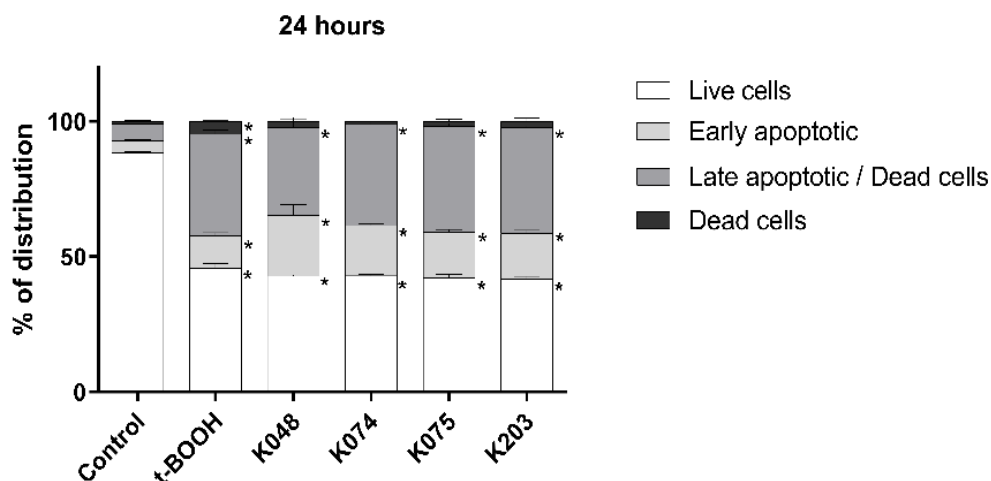


Obrázek č. 21 Chemické struktury oximových reaktivátorů acetylcholinesterasy K048, K074, K075 a K203.

In vitro experiment indukce oxidačního stresu byl prováděn v HepG2 buněčné linii v 25 cm² kultivačních lahvích. V den experimentu bylo kultivační medium odebráno a kultivační nádoby byly dvakrát promyty 3 ml PBS. Následně byly do každé nádoby přidány 3 ml čistého Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) kultivačního média (negativní kontrola) nebo DMEM kultivačního média s *t*-BOOH (pozitivní kontrola) nebo DMEM kultivační medium obsahující zkoušený oxim vždy v triplikátu. Koncentrace *t*-BOOH a zkoušených oximů v DMEM kultivačním médiu odpovídala jejich hodnotě IC₅₀.

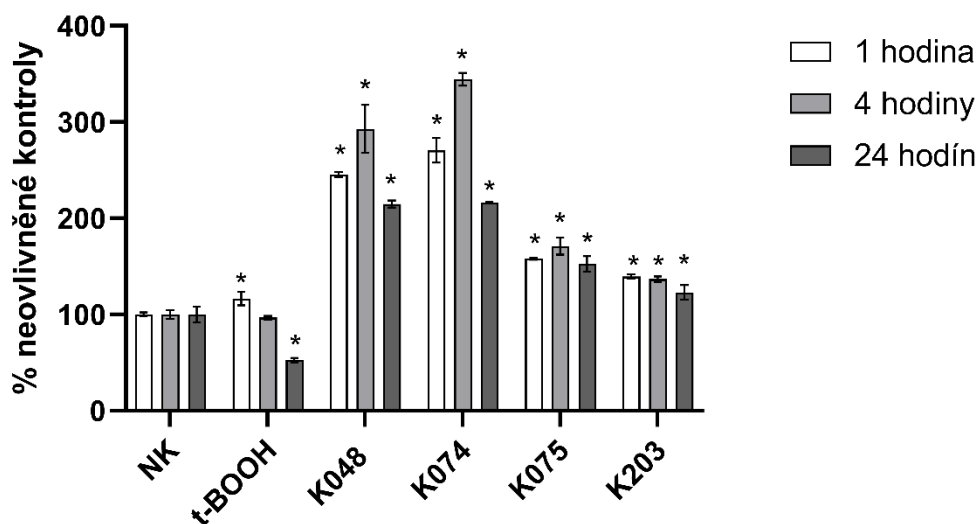
Buňky byly inkubovány po dobu 1, 4 a 24 hodin. Po inkubaci bylo experimentální médium odstraněno, buňky byly promyty 3 ml PBS a sundány z povrchu kultivační lahve pomocí buněčné škrabky. Výsledná buněčná suspenze byla odstředěna v centrifuzě (220 g, 21 °C, 5 min). Supernatant byl následně odebrán a buněčné pelety (cca 3 miliony buněk) byly skladovány při -80 °C.

Koncentrace odpovídající IC₅₀ byla ověřena pomocí MTT testu a zároveň byla po 24 hodinách provedena analýza buněčné smrti (nekróza a apoptóza) pomocí průtokové cytometrie. Z obrázku č. 22 je patrné, že po 24 hodinách došlo k poklesu buněčné viability o 50% a buněčná smrt byla způsobena hlavně apoptózou.



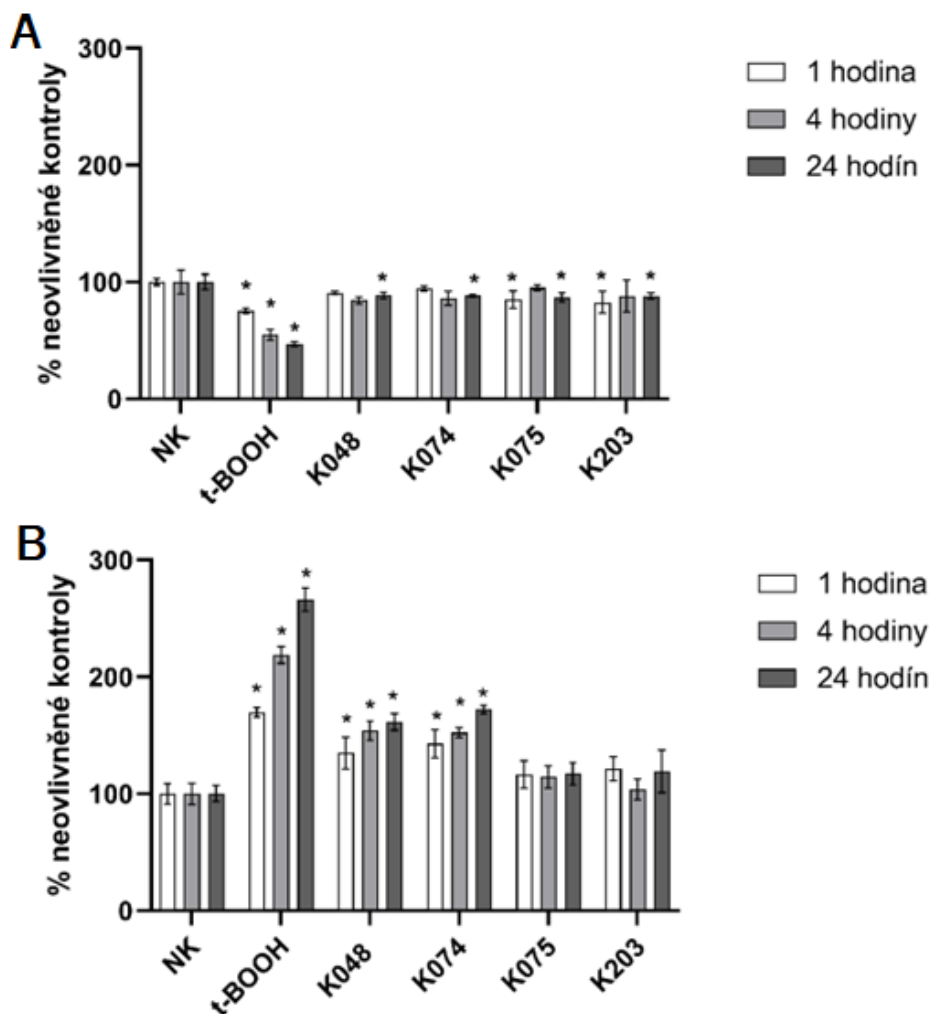
Obrázek č. 22 Analýza buněčné smrti pomocí mikrokapilární průtokové cytometrie. Výsledky jsou vyjádřeny v % vůči negativní kontrole (NK; neovlivněné buňky). Hodnoty v grafu představují průměr \pm SD (n=3). Statisticky významné výsledky mezi neovlivněnými buňkami a buňkami exponovanými oximům (One-way ANOVA, Dunnettův test) jsou v grafu označeny * ($p \leq 0,05$).

Kromě stanovení MDA jako markeru lipoperoxidace, byla také stanovena schopnost oximů indukovat RONS *in vitro* pomocí fluorescenční sondy DCFH-DA a rovněž byly stanoveny HPLC-UV metodou (Váňová *et. al.*, 2018) hladiny intracelulárních antioxidantů thiolů a disulfidů. Změny RONS měřené sondou ukazuje obrázek č. 23. Stanovené množství non-proteinových thiolů (NP-SH) a disulfidů (NP-SS-NP) ukazuje obrázek č. 24.



Obrázek č. 23 Změny v intracelulárních hladinách ROS/RNS měřených DCFH-DA sondou po 1, 4 a 24 hodinách inkubace s K048, K074, K075, K203 v koncentraci odpovídající jejich hodnotě IC_{50} . Výsledky jsou vyjádřeny v % vůči negativní kontrole (neovlivněné buňky) Hodnoty v grafu představují průměr \pm SD (n =3) Statisticky významné výsledky mezi neovlivněnými buňkami a buňkami exponovanými oximům (One-way ANOVA, Dunnettův test) jsou v grafu označeny * ($p \leq 0,05$).

Na základě výsledku lze říci, že oximy, které ve svém spojovacím řetězci obsahují dvojnou vazbu indukují oxidační stres méně. Zdá se, že není významný rozdíl v indukci oxidačního stresu mezi oximy, které obsahují dvě aldoximové skupiny nebo jednu aldoximovou a jednu amidovou skupinu. Za účelem zjištění, zda přítomnost dvojně vazby ve spojovací řetězci může hrát roli v případném vylučování volných radikálů bude dále sledována jejich potenciální antioxidační aktivita. Toto stanovení bude probíhat při současné inkubaci oximu a *t*-BOOH pomocí DCFH-DA sondy.



Obrázek č. 24 Množství NP-SH (A) a NP-SS-NP (B) nalezené v HepG2 buňkách po 1, 4 a 24 hodinách expozice K048, K074, K075, K203 v koncentraci odpovídající jejich hodnotě IC_{50} . Výsledky jsou vyjádřeny v % vůči kontrole (neovlivněné buňky). Hodnoty v grafu představují průměr \pm SD ($n = 3$). Statisticky významné výsledky mezi neovlivněnými buňkami a buňkami exponovanými oximům (One-way ANOVA, Dunnettův test) jsou v grafu označeny * ($p \leq 0,05$).

6 ZÁVĚR

Byla vypracována diplomová práce na téma: sledování oxidačního stresu HPLC metodami, v rámci, které byla optimalizována HPLC-MS metoda stanovení MDA z buněčné pelety. MDA slouží jako biomarker poškození lipidů oxidačním stresem. Při optimalizaci metody byla největší pozornost věnována úpravě vzorku pomocí derivatizace, PP a SPE. Výsledná metoda byla úspěšně validována a použita na analýzu vzorků z *in vitro* experimentu. V experimentu bylo hodnoceno množství MDA v HepG2 buňkách vystavených oximovým reaktivátorům AChE (K048, K074, K075 a K203), jeho cílem bylo najít spojitosti mezi strukturou reaktivátoru a vyvolaným oxidačním stresem.

Další součástí byla optimalizace metody pro stanovení biomarkeru poškození DNA – 8o2dG, tak aby bylo současně možné stanovit i poškození proteinů – 3-NT. Opět hlavním předmětem optimalizace byla úprava vzorku pomocí SPE i PP. V rámci této metody byly učiněny značné pokroky ve výtěžnosti 3-NT, ale k nalezení finálního postupu je nutné na této metodě dále pracovat.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AYALA, A., M. F. MUÑOZ a S. ARGÜELLES. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2014, **2014** [cit. 2022-05-03]. ISSN 1942-0900. Dostupné z: doi:10.1155/2014/360438

BANERJEE, S. a J. GHOSH. Drug Metabolism and Oxidative Stress: Cellular Mechanism and New Therapeutic Insights. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* [online]. 2016, **5(1)** [cit. 2022-05-03]. ISSN 2161-1009. Dostupné z: doi:10.4172/2161-1009.1000255

COOKE, M. S., M. D. EVANS, M. DIZDAROGLU a J. LUNEC. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *The FASEB Journal* [online]. 2003, **17(10)**, 1195-1214 [cit. 2022-05-03]. ISSN 0892-6638. Dostupné z: doi:10.1096/fj.02-0752rev

CZAPLICKI, S. Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. *Column Chromatography* [online]. InTech, 2013, 2013-04-10 [cit. 2022-05-03]. ISBN 978-953-51-1074-3. Dostupné z: doi:10.5772/55620

DEAN, R. T., S. FU, R. STOCKER a M. J. DAVIES. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochemical Journal* [online]. 1997, **324(1)**, 1-18 [cit. 2022-05-03]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj3240001

DEAVALL, D. G., E. A. MARTIN, J. M. HORNER a R. ROBERTS. Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *Journal of Toxicology* [online]. 2012, **2012** [cit. 2022-05-03]. ISSN 1687-8191. Dostupné z: doi:10.1155/2012/645460

DUNCAN, M. W. A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine. *Amino Acids* [online]. 2003, **25**, 351-361 [cit. 2022-05-03]. ISSN 0939-4451. Dostupné z: doi:10.1007/s00726-003-0022-z

FRIJHOFF, J. et al. Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. 2015, **23(14)**, 1144-1170 [cit. 2022-05-03]. ISSN 1523-0864. Dostupné z: doi:10.1089/ars.2015.6317

Guideline on Bioanalytical Method Validation. Ve: www.ema.europa.eu [online]. 2011 [cit. 2022-05-03]. Dostupné z: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf

HAUCK, A. K., Y. HUANG, A. V. HERTZEL a D. A. BERNLOHR. Adipose oxidative stress and protein carbonylation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2019, **294**(4), 1083-1088 [cit. 2022-05-03]. ISSN 00219258. Dostupné z: [doi:10.1074/jbc.R118.003214](https://doi.org/10.1074/jbc.R118.003214)

HIMMELSTEIN, M. W. et al. Creating context for the use of DNA adduct data in cancer risk assessment: II. Overview of methods of identification and quantitation of DNA damage. *Critical Reviews in Toxicology* [online]. 2009, **39**(8), 679-694 [cit. 2022-05-03]. ISSN 1040-8444. Dostupné z: [doi:10.1080/10408440903164163](https://doi.org/10.1080/10408440903164163)

CHAMBERS, J. E., M. B. DAIL a E. C. MEEK. Oxime-mediated reactivation of organophosphate-inhibited acetylcholinesterase with emphasis on centrally-active oximes. *Neuropharmacology* [online]. 2020, **175** [cit. 2022-05-03]. ISSN 00283908. Dostupné z: [doi:10.1016/j.neuropharm.2020.108201](https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2020.108201)

KLAPKOVÁ, E., R. UHŘINOVSKÁ a R. PRŮŠA. Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. *Klinická Biochemie a Metabolismus* [online]. 2019, **19**(1), 5-8 [cit. 2022-05-03]. ISSN 1210-7921. Dostupné z: <https://www.cskb.cz/res/file/KBM-pdf/2011/2011-1/Klapkova.pdf>

KOVAŘÍKOVÁ, P. a J. STARIAT. *Využití vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve farmaceutické analýze*, Katedra farmaceutické chemie a farmaceutické analýzy [Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Univerzita Karlova], [online]. [cit. 2022-05-03], Dostupné z <https://dl1.cuni.cz/course/view.php?id=2904>

LAM, P. M.W. et al. Rapid measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in human biological matrices using ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2012, **52**(10), 2057-2063 [cit. 2022-05-03]. ISSN 08915849. Dostupné z: [doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.004](https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.03.004)

Manifoldy pro manuální SPE [online]. HPST, 2022 [cit. 2022-05-03]. Dostupné z: <https://www.labicom.cz/produkty/spotrebni-material/priprava-vzorku-prislusenstvi/spe-solid-phase-extraction/manifoldy-nahradni-dily>

MENDONÇA, R. et al. Sensitive and selective quantification of free and total malondialdehyde in plasma using UHPLC-HRMS. *Journal of Lipid Research* [online]. 2017, **58**(9), 1924-1931 [cit. 2022-05-03]. ISSN 00222275. Dostupné z: doi:10.1194/jlr.D076661

MICHALOVICZ, L. T., K. A. KELLY, K. SULLIVAN a J. P. O'CALLAGHAN. Acetylcholinesterase inhibitor exposures as an initiating factor in the development of Gulf War Illness, a chronic neuroimmune disorder in deployed veterans. *Neuropharmacology* [online]. 2020, **171** [cit. 2022-05-03]. ISSN 00283908. Dostupné z: doi:10.1016/j.neuropharm.2020.108073

MÚČKOVÁ, L. et al. Cytotoxicity of acetylcholinesterase reactivators evaluated in vitro and its relation to their structure. *Drug and Chemical Toxicology* [online]. 2018, **42**(3), 252-256 [cit. 2022-05-03]. ISSN 0148-0545. Dostupné z: doi:10.1080/01480545.2018.1432641

MÚČKOVÁ, L. et al. Oxidative stress induced by oxime reactivators of acetylcholinesterase in vitro. *Toxicology in Vitro* [online]. 2019, **56**, 110-117 [cit. 2022-05-03]. ISSN 08872333. Dostupné z: doi:10.1016/j.tiv.2019.01.013

NOVÁKOVÁ, L. a M. DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I a II*. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3 a 978-80-260-4244-0.

POULSEN, H. E. Oxidative DNA modifications. *Experimental and Toxicologic Pathology* [online]. 2005, **57**, 161-169 [cit. 2022-05-03]. ISSN 09402993. Dostupné z: doi:10.1016/j.etp.2005.05.015

RACEK, J. *Oxidační stres a možnosti jeho ovlivnění*. 1. Praha: Galén, 2003. Repetitorium. ISBN 80-726-2231-5.

SANDOVAL, M. A. General steps for solid phase extraction (SPE). In: *Researchgate* [online]. 2017 [cit. 2022-05-03]. Dostupné z:

https://www.researchgate.net/figure/General-steps-for-solid-phase-extraction-SPE_fig2_320024643

SIES, H. Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie International Edition in English* [online]. 1986, **25**, 1058-1071 [cit. 2022-05-03]. ISSN 1433-7851.

STRATIL, P. a V. KUBÁŇ. *Reaktivní kyslíkové radikály, přírodní antioxidanty a jejich zdravotní účinky*. Český Těšín: 2 THETA, 2018. ISBN 978-80-86380-91-9.

ŠTÍPEK, S. et al. *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Praha: Grada, 2000. ISBN 80-716-9704-4.

TSIKAS, D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Analytical Biochemistry* [online]. 2017, **524**, 13-30 [cit. 2022-05-03]. ISSN 00032697. Dostupné z: doi:10.1016/j.ab.2016.10.021

VALAVANIDIS, A., T. VLACHOGIANNI a C. FIOTAKIS. 8-hydroxy-2' - deoxyguanosine (8-OHdG): A Critical Biomarker of Oxidative Stress and Carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health, Part C* [online]. 2009, **27**(2), 120-139 [cit. 2022-05-03]. ISSN 1059-0501. Dostupné z: doi:10.1080/10590500902885684

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. 2007, **39**(1), 44-84 [cit. 2022-05-03]. ISSN 13572725. Dostupné z: doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001

VÁŇOVÁ, N. et al. Simultaneous determination of malondialdehyde and 3-nitrotyrosine in cultured human hepatoma cells by liquid chromatography-mass spectrometry. *Biomedical Chromatography* [online]. 2018, **32**(12) [cit. 2022-05-03]. ISSN 02693879. Dostupné z: doi:10.1002/bmc.4349

WEIDINGER, A. a A. KOZLOV. Biological Activities of Reactive Oxygen and Nitrogen Species: Oxidative Stress versus Signal Transduction. *Biomolecules* [online]. 2015, **5**(2), 472-484 [cit. 2022-05-03]. ISSN 2218-273X. Dostupné z: doi:10.3390/biom5020472

WOREK, F., T. WILLE, M. KOLLER a H. THIERMANN. Toxicology of organophosphorus compounds in view of an increasing terrorist threat. *Archives of Toxicology* [online]. 2016, **90**(9), 2131-2145 [cit. 2022-05-03]. ISSN 0340-5761. Dostupné z: doi:10.1007/s00204-016-1772-1