

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.