

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ

Katedra analytické chemie



UPLATNĚNÍ MODERNÍCH SEPARAČNÍCH TECHNIK
V ANALÝZE BIOLOGICKÉHO MATERIÁLU

Disertační práce

Hradec Králové 2017

Mgr. Barbora Červinková

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem, které jsem vypracovala samostatně pod vedením svého školitele. 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 dne 7. 7. 2017

.....

Barbora Červinková

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli prof. RNDr. Petru Solichovi, CSc. a školitelce specialistce doc. RNDr. Lence Kujovské Krčmové, Ph.D. za jejich podporu, péči a odborné rady, které mi věnovali jak při sepisování této práce, tak v průběhu mého celého postgraduálního studia. Školitelce specialistce děkuji za její lidský a přátelský přístup a to, že mě uvedla do světa klinických aplikací. Troufám si říct, že to úplně změnilo můj pohled na analytickou chemii a její možnosti.

Velké poděkování patří celému kolektivu Výzkumné laboratoře FNHK a Katedry analytické chemie FaF UK v HK za jejich milý přístup a ochotu pomoci v jakékoliv situaci, jak odborné, tak osobní. Především děkuji za všechny cenné rady, připomínky a zkušenosti mně předané od doc. RNDr. Dagmar Solichové, Ph.D., prof. MUDr. Bohuslava Melichara, Ph.D. a prof. MUDr. Luboše Sobotky, CSc.

V neposlední řadě nesmím zapomenout na mé kolegyně Mgr. Evu Kasalovou a Mgr. Lenku Javorskou, se kterými jsme se v průběhu studia vzájemně podporovaly, pomáhaly si a vytvořily si tak přátelské a příjemné prostředí ve kterém se nám dobře pracovalo. Dále bych ráda poděkovala studentkám Mgr. Sávě Klabačkové, Mgr. Veronice Šestákové a Michaele Hutníkové, které se v rámci vypracování diplomových prací podílely na vývoji prezentovaných metod.

V rámci postgraduálního studia jsem absolvovala několik odborných stáží na zahraničních univerzitách a díky všem mým externím školitelům jsem měla možnost rozšířit si obzory, jak vědecké, tak kulturní. Za to bych ráda poděkovala zvláště prof. RNDr. Mirkovi Mackovi, Ph.D. (University of Tasmania, Austrálie), Dr. Charles Heard a prof. Marcela Votruba (Cardiff University, Velká Británie).

V neposlední řadě bych ze srdce ráda poděkovala mé rodině a partnerovi Lukášovi, kteří mě vždy podporovali při studiích i zahraničních cestách a dokázali mě povzbudit a motivovat i ve chvílích, kdy mi scházel úsměv na rtech a studium se zdálo být nad mé síly.

Ráda bych vyjádřila poděkování za finanční podporu projektům IGA MZČR NT 14265-3/2013, IGA MZČR NT 13564-4/2012, IGA MZČR NT 13566-4/2012, GAUK 860216/2016, TEAB CZ.1.07/2.3.00/20.0235, PRVOUK P37/12, SVV 260 412, FAFIS CZ.1.07/2.2.00/28.0194, CEPIN CZ.1.07/2.4.00/17.0115 a ERASMUS+.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové, Katedra analytické chemie

Kandidát: Mgr. Barbora Červinková

Školitel: prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Školitel specialista: doc. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

Název disertační práce: Uplatnění moderních separačních technik v analýze biologického materiálu

Předložená disertační práce se zabývá vývojem, optimalizací a validací nových chromatografických metod pro stanovení vitamínů A a E, biomarkerů zánětu a oxidačního poškození nukleových kyselin, včetně jejich extrakce z biologickém materiálu.

V první teoretické části práce jsou blíže popsány jednotlivé analyty a možnosti jejich stanovení v biologickém materiálu, moderní trendy v kapalinové chromatografii a vybrané validační normy v bioanalýze. Dále je zde diskutována manipulace s biologickým materiálem od jeho odběru po zpracování v laboratoři – zejména problematika transportu a úpravy vzorku.

Druhá část práce je rozdělena do dvou tematických okruhů věnovaných komentářům k publikovaným výstupům. V prvním okruhu jsou komentovány vyvinuté a publikované analytické metody. Jako první je komentována metoda zaměřená na stanovení lipofilních vitamínů v lidském séru pomocí miniaturizované LLE s následnou selektivní separací na fluorované stacionární fázi pomocí systému UHPLC s fluorescenční detekcí a časem analýzy 4 minuty. Následně je diskutováno stanovení kreatininu, biomarkerů oxidačního poškození DNA a RNA v moči s využitím extrakce na pevnou fázi, rychlé UHPLC separace včetně izotopově značeného vnitřního standardu a citlivé tandemové hmotnostní detekce. Jako poslední je komentováno stanovení časných biomarkerů zánětu v exsudátu ran, plodové vodě a výpotku pomocí jednoduché precipitace proteinů, HPLC analýzy s využitím monolitické stacionární fáze druhé generace, PDA a fluorescenční detekce. Druhý okruh je věnován komentářům k publikovaným biomedicínským aplikacím vyvinutých analytických metod. Zde je diskutováno stanovení lipofilních vitamínů a zánětlivých biomarkerů u pacientů s nádorovým onemocněním a poškozením sítnice.

V závěru disertační práce je uveden souhrn publikací a ostatních výstupů, na kterých se autorka v rámci svého postgraduálního studia podílela.

ABSTRACT

Charles University, Faculty of Pharmacy in Hradec Králové, Department of Analytical Chemistry

Candidate: Mgr. Barbora Červinková

Supervisor: prof. RNDr. Petr Solich, CSc.

Supervisor specialist: assoc. prof. RNDr. Lenka Kujovská Krčmová, Ph.D.

Title of dissertation: Application of modern separation techniques in the analysis of biological material

The presented dissertation is focused on development, optimization and validation of new extraction procedures and chromatographic methods for determination of vitamins A and E, inflammation biomarkers, DNA and RNA oxidative stress products in biological matrices.

In the theoretical part of this work selected analytes and possibility of their determination in biological materials are described. Moreover, modern trends in liquid chromatography and bioanalytical validation guidelines are included. In this part, special attention is focused on sample handling, transport and pre-treatment.

The second part is focused on published methods and divided into two sections. The first section comments published developed analytical methods. As first method, determination of lipophilic vitamins in human serum by miniaturized liquid-liquid extraction with subsequent separation on fluorinated stationary phase using UHPLC system with fluorescent detection in 4 min is discussed. Thereafter, determination of creatinine, DNA and RNA oxidative stress biomarkers in human urine by selective solid-phase extraction, rapid UHPLC separation including isotope labelled internal standard and sensitive tandem mass spectrometry detection is described. As last method, determination of early inflammatory biomarkers in amniotic fluid, malignant effusions and wound exudates by simple and fast deproteinization, HPLC analysis using second-generation monolith stationary phase, PDA and fluorescent detection is commented. The second section is focused on clinical research publications. In these clinical studies, levels of lipophilic vitamins and inflammatory biomarkers in malignant and eye disease are discussed.

List of author's publications, lectures, posters, grant projects and research internships are included in the last part of dissertation work.

OBSAH

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	13
1 ÚVOD.....	16
2 CÍL PRÁCE	17
3 TEORETICKÁ ČÁST	18
3.1 Vybrané metody úpravy biologických vzorků před analýzou	18
3.1.1 Konvenční metody pro úpravy vzorků	19
3.1.2 Moderní mikroextrakční techniky pro úpravu vzorků	24
3.2 Vybrané separační techniky a trendy v kapalinové chromatografii.....	27
3.2.1 Instrumentace pro kapalinovou chromatografii	27
3.2.2 Trendy v kapalinové chromatografii.....	30
3.3 Použité analyty	35
3.3.1 Vitamíny	35
3.3.2 Biomarkery aktivace imunitního systému.....	45
3.3.3 Produkty oxidačního poškození nukleových kyselin	53
3.3.4 Kreatinin	59
3.4 Zásady manipulace s vybraným biologickým materiálem	62
3.4.1 Krev	62
3.4.2 Plodová voda	63
3.4.3 Moč	63
3.4.4 Výpotek	64
3.4.5 Exsudát z rány.....	65
3.4.6 Zásady správného transportu biologických vzorků	66
3.4.7 Důvody pro odmítnutí vzorů laboratoří.....	66
3.5 Vybrané validační parametry v bioanalýze	68
3.5.1 Test způsobilosti chromatografického systému.....	68
3.5.2 Přesnost a opakovatelnost.....	69
3.5.3 Selektivita a matricový efekt	69
3.5.4 Linearita a limity metody	70
3.5.5 Stabilita	71
3.5.6 Robustnost	71

4	KOMENTÁŘE K PUBLIKOVANÝM VÝSTUPŮM.....	72
4.1	Komentáře k publikovaným pracím s analytickou tematikou	73
4.1.1	Stanovení biomarkerů oxidačního poškození DNA a RNA v moči.....	73
4.1.2	Význam a možnosti stanovení vitamínu E v biologickém materiálu	78
4.1.3	Stanovení lipofilních vitamínů v séru.....	81
4.1.4	Stanovení neopterinu, kynureninu a tryptofanu v plodové vodě, výpotku a exsudátu z dlouhodobě špatně se hojících ran	86
4.2	Komentáře k publikovaným pracím s biomedicínskou tematikou	91
4.2.1	Význam stanovení biomarkerů citrulinu a neopterinu při monitorování míry poškození střevní sliznice v důsledku chemoradioterapie	91
4.2.2	Prognostický význam stanovení neopterinu v moči a séru u pacientů s karcinomem konečníku.....	93
4.2.3	Vliv hemaferézy na hladiny lipofilních vitamínů u pacientů s věkem podmíněnou makulární degenerací sítnice	95
5	ZÁVĚR	97
6	PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH VÝSTUPŮ	99
7	PŘEHLED OSTATNÍCH VÝSTUPŮ, GRANTOVÝCH PROJEKTŮ A STÁŽÍ	100
7.1	Přednášky	100
7.2	Plakátová sdělení	102
7.3	Řešené grantové projekty	105
7.4	Absolvované stáže	106
8	LITERATURA	107
9	PŘÍLOHY.....	120
9.1	PŘÍLOHA 1.....	121
9.2	PŘÍLOHA 2.....	151
9.3	PŘÍLOHA 3.....	171
9.4	PŘÍLOHA 4.....	201
9.5	PŘÍLOHA 5.....	215
9.6	PŘÍLOHA 6.....	227
9.7	PŘÍLOHA 7.....	235

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

α -TTP	alfa tokoferol transportní protein
ACN	acetonitril
AN	Alzheimerova nemoc
AMAC	octan amonný (ammonium acetate)
BH4	tetrahydrobiopterin
C18	řetězec obsahující 18 atomů uhlíku
CEHC	2,5,7,8-tetramethyl-2-(2'-karboxyethyl)-6-hydroxychroman
CV	variační koeficient
ČL	Český lékopis
DAD	detektor s diodovým polem (diode array detector)
DLLME	disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (dispersive liquid-liquid microextraction)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DPX	extrakce pomocí plněných špiček pipet (disposable-pipette extraction)
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
ELSD	evaporative light scattering detector
EMA	European Medicines Agency
ESI	ionizace elektrosprejem
Eurachem	Nadnárodní organizace zaměřená na analytickou chemii v Evropě (A Focus for Analytical Chemistry in Europe)
FA	kyselina mravenčí (formic acid)
FDA	Food and drug administration
FLD	fluorescenční detekce
FNHK	Fakultní nemocnice Hradec Králové
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)
GCHI	guanosin trifosfát cyklohydroláza I
GTP	guanosin trifosfát
HDL	lipoproteiny s vysokou hustotou (high density lipoprotein)

HETP	výškový ekvivalent teoretického patra (height equivalent to a theoretical plate)
HF-LPME	extrakce do dutého vlákna (hollow fiber-based liquid-phase microextraction)
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí (hydrophilic interaction liquid chromatography)
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
HR	vysoké rozlišení (high resolution)
ICH	Mezinárodní konference o harmonizaci technických požadavků na registraci humánních léčiv (International Conference on Harmonization)
IDO	indolamin 2,3-dioxygenáza
IL	interleukin
IPA	isopropanol
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a užitou chemii (International Union of Pure and Applied Chemistry)
INT- α	interferon alfa
INT- γ	interferon gama
Kyn	kynurenin
LC	kapalinová chromatografie (liquid chromatography)
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě (low density lipoproteins)
LLE	extrakce z kapaliny do kapaliny (liquid-liquid extraction)
LOD	limit detekce (limit of detection)
LOQ	limit kvantifikace (limit of quantification)
LLOQ	dolní limit kvantifikace (lower limit of quantification)
MDDR	úprava výživy při onemocnění ledvin (modification of diet in renal disease)
MeOH	methanol
MEPS	mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu (microextraction by packed sorbents)
MIP	molekulárně vtištěné polymery (molecularly imprinted polymers)
MM	mozkomíšní mok
MW	molekulová hmotnost (molecular weight)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)

MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (tandem mass spektrometry)
Neo	neopterin
PEEK	polyether ether keton
PhEur	Evropský lékopis (European Pharmacopoeia)
PP	precipitace proteinů
Ret	retinol
RAM	materiály s omezeným přístupem (restricted access material)
RCF	relativní odstředivá síla
RNA	ribonukleová kyselina
RP	reverzní fáze (reverse phase)
RSD	relativní směrodatná odchylka (relative standard deviation)
SALLE	extrakce vysolováním (salting-out liquid-liquid extraction)
SBSE	extrakce na magnetickém míchadle (stir bar sorptive extraction)
SDME	extrakce do jedné kapky rozpouštědla (single-drop microextraction)
SLE	extrakce do kapaliny podpořená pevnou fází (solid supported liquid extraction)
SPE	extrakce na pevné fázi (solid-phase extraction)
SST	test vhodnosti systému (system suitability test)
SÚKL	Státní ústav pro kontrolu léčiv
Trp	tryptofan
TDO	tryptofan 2,3-dioxygenáza
TFA	kyselina trifluoroctová (trifluoroacetic acid)
TNF- α	tumor nekrotizující faktor alfa
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (ultra-high performance liquid chromatography)
ULOQ	horní limit kvantifikace (upper limit of quantification)
USP	Americký lékopis (United States Pharmacopeia)
UV/VIS	ultrafialová – viditelná oblast světla
VLDL	lipoproteiny o velmi nízké hustotě (very low density lipoprotein)
8OH2dG	8-hydroxy-2-deoxyguanosin
8OHG	8-hydroxyguanosin
¹⁵ N5-8OH2dG	¹⁵ N5-8-hydroxy-2-deoxyguanosin

1 ÚVOD

V posledních letech dochází k výraznému rozvoji laboratorní medicíny, kdy se stále zvyšuje počet dostupných diagnostických metod, laboratorních testů a vyšetřovacích postupů. Laboratorní vyšetření již dnes přináší velké množství informací o stavu pacienta a jejich význam neustále roste. Současně jsou na klinické laboratoře kladeny stále vyšší nároky na kvalitu analýz a musí čelit náporům velkého množství vzorků. Ty je nutné zpracovat v relativně krátkém čase s dostatečnou citlivostí a spolehlivostí. Z toho důvodu jsou dnes stále častěji využívány v klinických laboratořích chromatografické metody, nabízející rychlé, robustní a citlivé analýzy s možností kvantifikace více analytů v jedné komplexní matici.

V oblasti kapalinové chromatografie jsou využívány univerzální vysokoúčinné (HPLC) a ultra-vysokoúčinné systémy (UHPLC). Systém UHPLC byl na český trh uveden přibližně před deseti lety, a protože poskytuje velmi rychlé analýzy našel své uplatnění v mnoha oblastech včetně bioanalýzy. Mezi novinky v separacích, využití v této práci, patří vysoce selektivní stacionární fáze na bázi fluoru a fenylu. Ty poskytují unikátní interakce specifické pro analyty s aromatickou strukturou. V oblasti materiálů analytických kolon jsou stále častěji využívány povrchově porézní částice a monolitické sorbenty. Novým trendem jsou monolitické stacionární fáze druhé generace poskytující vysoké rozlišení a vyšší separační účinnost.

V oblasti extrakčních technik je dnes kladen důraz zejména na malou spotřebu biologického materiálu a organických rozpouštědel, tak aby nové metody co nejméně zatěžovali pacienta a životní prostředí. Dalším trendem je miniaturizace a automatizace konvenčních extrakčních technik. Automatizované metody nabízejí časovou i personální úsporu, což vede ke snížení celkových nákladů na prováděné analýzy. Miniaturizace již používané metody umožní zpracování větších sérií vzorků s nižšími spotřebami rozpouštědel a biologického materiálu.

Biologický materiál představuje komplexní systém s celou škálou biochemických a fyzikálních interakcí. V oblasti bioanalytických aplikací se nejčastěji jedná o analýzu malých molekul (vitamíny, biomarkery). Větší molekuly jsou naopak analyzovány v proteomice. Společným cílem v oblasti klinického výzkumu je objevit specifický biomarker pro určité onemocnění a ten využít v laboratorní diagnostice.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této disertační práce bylo vyvinout a validovat tři nové bioanalytické metody na bázi kapalinové chromatografie pro stanovení lipofilních vitamínů, biomarkerů oxidačního poškození a zánětu v různých biologických matricích. Dalším cílem byla modernizace již zavedených metod včetně miniaturizace extrakčního postupu a urychlení chromatografické analýzy. Posledním cílem této práce bylo využít vyvinuté analytické metody v klinické praxi za účelem získání nových informací pro léčebné postupy.

Při vývoji nových separačních a extrakčních metod byl kladen důraz na jejich rychlost, jednoduchost a použitelnost v klinickém výzkumu. Tyto metody byly zadány Výzkumné laboratoři III. interní gerontometabolické kliniky dle konkrétních požadavků a klinických studií Fakultní nemocnice Hradec Králové (FNHK) a Fakultní nemocnice Olomouc (FNOL). Použitý biologický materiál byl získán od pacientů hospitalizovaných ve FNHK a FNOL v souladu s etickým protokolem. Jednalo se o moč, krevní sérum, plodovou vodu, výpotek a exsudát z dlouhodobě špatně se hojících ran.

Dále byla náplní práce rešerše literatury. Jejímž cílem bylo získat informace o charakteru analytů, jejich klinickém významu a možnostech stanovení včetně publikace teoretických znalostí formou souhrnného článku.

Prvním úkolem bylo vyvinout novou UHPLC metodu s fluorescenční detekcí pro stanovení retinolu a všech izoform tokoferolu včetně miniaturizace postupu úpravy vzorku na bázi extrakce z kapaliny do kapaliny. Druhým úkolem byla modifikace a zrychlení HPLC metody pomocí monolitické kolony druhé generace pro stanovení neopterinu, kynureninu a tryptofanu v plodové vodě, výpotku a exsudátu z dlouhodobě špatně se hojících ran s využitím fluorescenční a UV detekce. Posledním úkolem byl vývoj nové UHPLC metody s UV a tandemovou hmotnostní detekcí pro stanovení 8-hydroxy-2-deoxyguanosinu, 8-hydroxyguanosinu a kreatininu v moči včetně metody extrakce na pevnou fázi. Při vývoji metod s víceřadovou extrakcí bylo cílem využít vnitřní standard ke korekci výsledků. V případě analýzy vitamínů, tokol, a biomarkerů oxidačního poškození ¹⁵N5-8-hydroxy-2-deoxyguanosin. Pro využití metod v klinickém výzkumu a praxi byla nutná validace dle platných bioanalytických norem a ověření jejich použitelnost analýzou biologického materiálu.

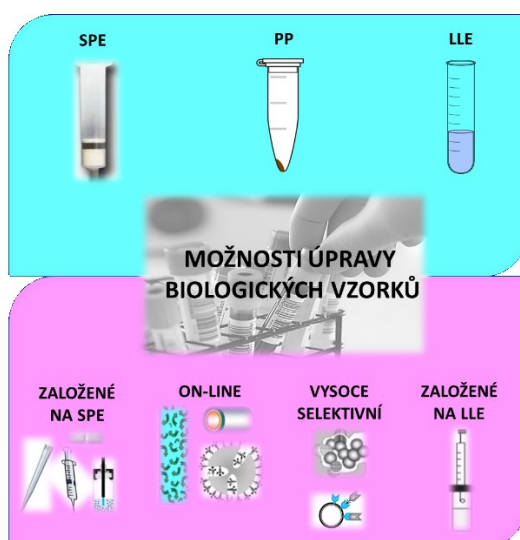
3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Vybrané metody úpravy biologických vzorků před analýzou

Extrakce a manipulace s biologickým materiálem patří mezi základní úkony v bioanalýze. V dnešní době patří úprava vzorků ke kritickým a také nejvíce časově náročným krokům v rámci celé analýzy. Mnohdy tyto úkony zabírají 60 až 70% z celkové manipulace se vzorkem [1]. Tento fakt je poměrně limitující zvláště v oblasti analýzy biologických vzorků, kde je nutné zpracovávat velké série v krátkém časovém úseku.

Kvůli komplexnímu charakteru reálných biologických vzorků není vhodný jejich přímý nástřik do chromatografického systému, protože by mohlo dojít k zanesení jednotlivých součástí, snížení účinnosti kolony, zvýšení zpětného tlaku a v neposlední řadě také ke zkrácení životnosti kolony. Na základě toho jsou biologické vzorky nejčastěji podrobeny alespoň jednomu nebo několika postupům jejich úpravy.

Volba správného postupu úpravy vzorku má klíčový vliv na celkový výsledek analýzy, jak z kvalitativního, tak i z kvantitativního hlediska. Vhodná technika je vybrána na základě míry komplexnosti vzorku, množství sledovaného analytu a koncentrace ostatních komponent. Takový postup slouží nejčastěji k rozrušení komplexní matrice, zakoncentrování analytů, odstranění proteinů, fosfolipidů a dalších balastních látek. Metody extrakce vzorků zahrnují širokou škálu technik, které lze podle historie a četnosti použití rozdělit na techniky konvenční a moderní. Schématické rozdělení technik je na obrázku 1.



Obrázek 1: Rozdělení extrakčních technik na „modré“ konvenční a „růžové“ moderní (převzato ze zdroje Nováková a kol. [1] a upraveno).

Mezi nároky na vhodnou extrakční metodu patří - spotřeba co nejmenšího množství vzorku a organických rozpouštědel a zároveň krátká doba extrakce s minimálním počtem kroků. Metoda splňující tyto požadavky bude šetrná k pacientovi i životnímu prostředí a vhodná pro extrakci větších sérií vzorků [2].

Metody úpravy vzorku, které byly využity pro přípravu podkladů této disertační práce, jsou extrakce na pevné fázi, extrakce z kapaliny do kapaliny a její miniaturizovaná verze, extrakce do kapaliny podpořená pevnou fází, centrifugace, filtrace a precipitace proteinů. Následující kapitola se proto, kromě stručného popisu ostatních metod, bude blíže věnovat popisu těchto vybraných extrakčních technik.

3.1.1 Konvenční metody pro úpravy vzorků

Konvenční techniky jsou dlouhodobě známé, rozšířené a v mnoha laboratořích zavedené pro extrakci biologických vzorků. Mezi jejich výhody patří dobrá optimalizace a reprodukovatelnost.

3.1.1.1 Extrakce z kapaliny do kapaliny

Extrakce z kapaliny do kapaliny (liquid-liquid extraction, LLE) je známá, dobře prostudovaná a hojně využívaná technika úpravy vzorků. Metoda je založena na bázi rozdělovacího koeficientu, kdy dojde k rozdělení cílového analytu mezi dvě vzájemně nemísitelné kapaliny. Princip metody je velmi jednoduchý, analyt je extrahován z vodné fáze (biologický materiál) do organického s vodou nemísitelného rozpouštědla (nejčastěji hexan nebo ethyl acetát). Takto získaný extrakt je často inkompatibilní s analytickým systémem, a proto je před jeho nástřikem organické rozpouštědlo odpařeno a odparek následně rozpuštěn ve vhodné mobilní fázi.

Existuje několik možností, jak zvýšit výtěžek extrakce této metody, mezi ně patří opakovaná extrakce, zpětná extrakce a iont-párové extrakce. V případě opakované extrakce, lze dosáhnout vyšší výtěžnosti opakováním extrakce několikrát s menším množstvím organického činidla.

Extrakce z kapaliny do kapaliny je s výhodou používána zvláště kvůli své malé náročnosti na přístrojové vybavení, nízké ceně, použitelnosti pro široké spektrum analytů a možnosti automatizace a miniaturizace. K nevýhodám metody patří tvorba zákalů a emulzí, manuální náročnost a velká spotřeba organických rozpouštědel.

V literatuře jsou popsány metody, kdy byla extrakce z kapaliny do kapaliny provedena v miniaturizovaném uspořádání. K extrakci byly využity mikrotitrační destičky, Eppendorf zkumavky či vialky. V takovém provedení dojde ke značné úspoře organických rozpouštědel i času nezbytnému pro extrakci jednoho vzorku. Automatizace metody v mikrotitračních destičkách byla již také v literatuře popsána [1, 3].

3.1.1.2 Extrakce na pevné fázi

Technika extrakce na pevné fázi (solid-phase extraction, SPE) se řadí mezi nejvíce rozšířené a používané metody extrakce, dobře známé již od roku 1970. Její princip spočívá v účinné sorpci analytu na pevnou fázi, zatímco ostatní komponenty vzorku jsou sorbovány v co nejmenší míře. Zachycený analyt se pak uvolní ze sorbentu zahřátím a/nebo elucí vhodným rozpouštědlem. V prvním kroku extrakce je analyt zadržen pomocí interakcí na pevné fázi a následně je z ní eluován vhodným činidlem. Fází mohou být naplněny kolonky, mikrotitrační destičky i pipetovací špičky. Cílem extrakce je zakoncentrování analytů, odstranění balastních látek a získání čistého extraktu s minimalizací interferencí z komplexních matic.

Jednotlivé kroky SPE jsou kondicionace, ekvibrace, aplikace vzorku, promytí a eluce. Všechny tyto kroky je nutné při vývoji metody optimalizovat a významný je také výběr vhodného sorbentu a úprava vzorku před samotnou extrakcí.

Výběr vhodného sorbentu má zásadní vliv na výtěžnost celé extrakce. Na trhu je dostupné široké spektrum sorbentů obdobných jako stacionární fáze pro kapalinovou chromatografii (LC). Při vývoji SPE metody, lze volit z celé škály fází například polární, nepolární, iontově výměnné, vícemodální, imuno-sorbenty a další. Na základě charakteru analytu, druhu matrice a jeho předpokládaných koncentrací ve vzorku si zvolíme optimální druh sorbentu, například polymerní pro extrémní pH vzorku, více modální či molekulově vtištěné polymery pro vysoce selektivní analýzy.

Před samotným zahájením extrakce je vhodné vzorek upravit a zbavit pevných částic, které by mohly zanést póry v sorbentu. Nejčastěji se pro tyto účely využívá úprava pH či iontové síly, centrifugace a precipitace proteinů.

Pevný sorbent je před nanesením vzorku třeba kondicionovat. Cílem kondicionace je aktivace funkčních skupin, nejčastěji pomocí methanolu ve dvojnásobném objemu kolonky. Na kondicionaci navazuje ekvibrace, kdy dojde k vytvoření rovnováhy na fázovém rozhraní, která bude ideální pro budoucí aplikaci roztoku vzorku. K ekvibraci je nejčastěji volen roztok blízký použitému biologickému materiálu, pro moč a krev se využívá voda nebo pufr.

Při aplikaci vzorku je velice důležité respektovat vlastnosti zvoleného sorbentu. V některých případech je vhodné sorbent nechat volně nasáknout vzorkem na základě gravitační síly a až po chvíli regulovat rychlost průtoku pomocí vytvoření vakua.

Promytí sorbentu je pouze volitelný krok, při kterém dochází k odstranění zadržovaných balastních látek z matrice na pevném nosiči. Tyto látky by byly v následujícím kroku eluovány a působily jako interference při LC analýze. K promytí sorbentu se nejčastěji využívají rozpouštědla nejméně blízká svojí polaritou cílovému analytu. Jako promývací roztok pro odstranění solí a jiných interferujících polárních analytů je volena voda nebo pufr s upraveným pH.

Posledním krokem při SPE je eluce cílového analytu z pevného sorbentu. Jako eluční činidlo se využívá rozpouštědlo s nejvyšší afinitou k cílovému analytu. Velkou výhodou je oproti LLE možnost eluce nejen organickými rozpouštědly. Jako eluční činidlo je ideálně použita fáze vycházející z podmínek chromatografické metody. Pro další zakoncentrování analytu a změnu media je možné eluát odpařit a následně odparek rozpustit v adekvátním mobilní fázi.

Mezi výhody této techniky patří vysoká výtěžnost, možnost zakoncentrování analytu, menší spotřeba toxických organických rozpouštědel v porovnání s dalšími konvenčními technikami, možná automatizace i provedení on-line. Nevýhodou jako u většiny konvenčních technik zůstává vysoká spotřeba rozpouštědel a vzorku, časová náročnost metody, mnoha kroková extrakce a omezená reprodukovatelnost mezi jednotlivými šaržemi [1, 4].

3.1.1.3 Extrakce do kapaliny podpořená pevnou fází

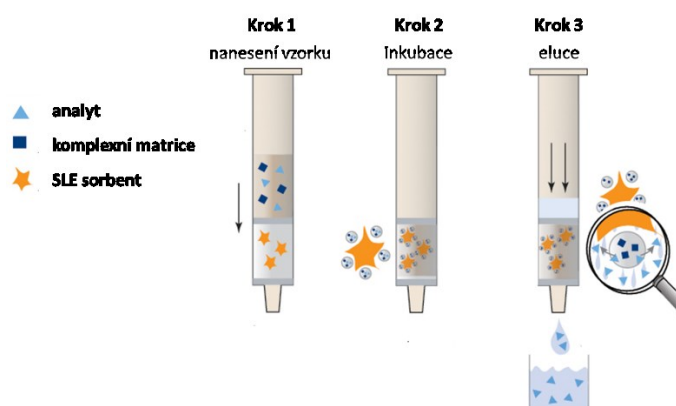
Extrakce do kapaliny podpořená pevnou fází (Solid Supported Liquid Extraction, SLE) je známá již od roku 1980. Tato technika zažila velký návrat v roce 2015, kdy začala být podporována na evropském trhu firmou Phenomenex. Metoda SLE využívá absorpce analytů na pevný inertní nosič, a proto její uspořádání připomíná spíše SPE. Pevná fáze ale na rozdíl od SPE fáze nedisponuje žádnou selektivitou k vybrané skupině analytů a jedná se pouze o nosič na bázi chemicky inertní křemeliny.

Při praktickém provedení SLE není nutné na rozdíl od SPE provádět kondicionaci ani aktivaci sorbentu. Po nanesení vzorku na pevný nosič je ponechán čas, aby došlo k jeho rovnoměrnému nasycení sorbentu vzorkem. Na spodní části sorbentu je umístěn hydrofobní filtr, aby se zabránilo okamžitému protečení vodné části vzorku. Po nanesení organického rozpouštědla dochází vlivem gravitace k postupnému strhávání analytu ze sorbentu až do

sběrné nádoby. Krok eluce je často pro zvýšení výtěžnosti extrakce opakován. Vzniklé eluáty jsou následně spojeny, odpařeny a odparek je rozpuštěn ideálně v mobilní fázi.

Výhodou této techniky oproti LLE je menší manuální náročnost, nepřítomnost emulzí a zákalu, eliminace třepání, míchání, centrifugace a odebírání organické fáze. K nevýhodám patří použití organických rozpouštědel typu hexan a ethyl acetát.

Metodu SLE je možné provádět buď v kolonkách s různým množstvím sorbentu nebo v mikrotitračních destičkách. Tato technika nabízí poměrně jednoduchou možnost automatizace [1, 3]. Schéma SLE techniky je znázorněno na obrázku 2.



Obrázek 2: Schéma SLE extrakce (převzato ze zdroje Sopachem Analytical [5] a upraveno).

3.1.1.4 Precipitace proteinů

Odstranění proteinů (protein precipitation, PP) z biologického materiálu patří mezi tradiční a často využívané metody úpravy vzorků před následnou analýzou. Tato technika je jednoduchá, rychlá, levná a nenáročná na přístrojové vybavení i optimalizaci. Precipitace proteinů je často volena v případech, kdy je nevhodný přímý nástřik biologického vzorku do chromatografického systému, aby nedošlo k jeho zanesení, zhoršení účinnosti kolony a při hmotnostní detekci (MS) ke kontaminaci iontového zdroje. Výhodou precipitace je odstranění až 98% proteinů všech velikostí ze vzorku a možnost automatizace. K nevýhodám patří nízká specifita, možnost vazby analytu na precipitát, naředění vzorku, přítomnost zbytkových fosfolipidů a dalších možných interferencí, které v případě MS detekce zvýší pravděpodobnost výskytu matricových efektů.

K odstranění proteinů ze vzorku dochází buď pomocí chemické precipitace, enzymové deproteinace nebo fyzikálně-chemických metod.

Chemická precipitace proteinů se provádí přidáním silné kyseliny (kyselina chlorovodíková, trichloroctová, chloristá), organického rozpouštědla (methanol, acetonitril), solí vícemocných iontů (síran zinečnatý, síran měďnatý) nebo pomocí přírodních látek typu tanin.

Při enzymové deproteinaci se využívá působení proteolytických enzymů například papainu, trypsinu, proteáz a dalších.

K odstranění proteinů pomocí fyzikálně-chemických metod je možné využít zvýšené či snížené teploty, ultrazvukové lázně či membránové filtrace. V posledním případě je využívána semipermeabilní membrána v kombinaci s centrifugací. Na této membráně dochází k zachytu proteinů na základě velikosti a do permeátu prochází pouze volné analyty [1, 2].

Po vysrážení proteinů následuje centrifugace a filtrace supernatantu před LC analýzou. Vlastnosti supernatantu mohou být ovlivněny na základě zvoleného činidla, to může způsobit například limitní hodnotu pH, vysokou koncentraci solí, rozklad analytů nebo vznik komplexů s kovy.

3.1.1.5 Centrifugace a filtrace

K centrifugaci neboli odstředění se využívají centrifugy, kde dochází k oddělení směsí kapalin nebo směsí kapalin a tuhých látek pomocí odstředivé síly. Odstředivá síla se využívá pro oddělení látek na základě hustoty a zrychlení procesu sedimentace. Rychlost centrifugace je nejčastěji udávána jako odstředivé gravitační zrychlení (g) nebo relativní centrifugační síla (RCF). Centrifugy jsou dnes běžně vybaveny výměnnými rotory a tím umožňují použít při centrifugaci skleněné zkumavky, Eppendorf zkumavky či mikrotitrační destičky. Po úspěšné centrifugaci je možné roztok využít pro přímý nástřik do chromatografického systému.

Výhodu centrifugace je její jednoduchost, manuální nenáročnost a rychlost. Mezi nevýhody patří oddělení složek pouze na základě výrazné odlišnosti ve velikosti, vznik emulzí a vyšší pořizovací náklady na vybavení [6].

Filtrace společně s prostým zředění vzorku se řadí mezi nejjednodušší techniky pro úpravu biologického materiálu. Filtrací biologického materiálu před analýzou dojde k odstranění složek matrice, které by potenciálně mohly způsobit zanesení některých částí přístroje. Dále se filtrace využívá pro získání čistého extraktu před další extrakcí nebo naopak po extrakci před nástřikem do chromatografického systému [3].

K filtraci biologického materiálu se v rutinních laboratořích nejčastěji používají jednorázové nylonové filtry, spin zkumavky s filtry a filtrační mikrotitrační destičky

(Obrázek 3). Využití mikrotitračních destiček poskytuje významnou úsporu množství biologického materiálu a času, kdy je možné filtrovat až 96 vzorků v jedné sérii. Počet vzorků je ovlivněn typem a velikostí mikrotitrační destičky. Množství použitého biologického materiálu se liší podle typu destičky, zpravidla se jedná o přibližně 160 μl .



Obrázek 3: Možnosti filtrace vzorků – jednorázové filtry, spin zkumavky a mikrotitrační destičky (převzato ze zdrojů Merck Millipore [7], Dot Scientific [8] a Pall Corporation [9]).

3.1.2 Moderní mikroextrakční techniky pro úpravu vzorků

V současné době existuje velké množství moderních mikroextrakčních metod určených pro úpravu biologických vzorků před analýzou. Výhodou mikroextrakcí je provedení v miniaturizovaném formátu s minimálními spotřebami a využitím nových materiálů. Mikroextrakce často splňují požadavky na moderní techniky, a to zejména krátký čas extrakce s nízkými spotřebami. Přesto jsou momentálně tyto techniky používány spíše ve výzkumu, a to zejména kvůli nárokům na přístrojové vybavení a omezené robustnosti.

3.1.2.1 Mikroextrakční techniky

Mikroextrakční techniky vycházejí ze dvou základních konvenčních postupů, a to extrakce na pevnou fázi a extrakce z kapaliny do kapaliny.

Moderní mikroextrakční techniky využívající extrakce z kapaliny do kapaliny můžeme rozdělit podle jejich manuální náročnosti na jednodušší a složitější. Mezi jednodušší a zároveň levnější techniky patří extrakce vysolováním (salting-out assisted liquid-liquid extraction, SALLE) a disperzní mikroextrakce z kapaliny do kapaliny (dispersive liquid-liquid micro-extraction, DLLME). Naopak mezi metody náročnější na provedení řadíme extrakce do jedné kapky rozpouštědla (single-drop microextraction, SDME) a extrakce do dutého vlákna (hollow-fiber liquid phase micro-extraction, HF-LPME). Nevýhodou mikroextrakčních technik na bázi LLE je nutnost zkušené a opatrné manipulace v průběhu celé extrakce. Tyto techniky našly své uplatnění spíše na vědecké úrovni ve farmaceutické, potravinářské a

environmentální analýze. Pro praktické použití v rutinních laboratořích se zatím obecně jeví jako málo robustní [1].

Mezi moderní mikroextrakční techniky založené na principu SPE patří mikroextrakce pomocí plněného tuhého sorbentu (micro-extraction by packed sorbent, MEPS), sorpční extrakce na míchadle (stir bar sorptive extraction, SBSE), mikroextrakce na pevné fázi (solid phase micro-extraction SPME) a extrakce pomocí plněných špiček pipet (disposable pipette tip extraction, DPX). Jedná se o techniky manuálně méně náročné oproti LLE mikroextrakcím, mezi kterými vyniká MEPS a DPX svou rychlostí. Při extrakci MEPS se využívá Hamiltonova stříkačka, ve které je přímo vloženo a utěsněno malé množství tuhého sorbentu (cca 1 až 2 mg). Tento sorbent je v případě vypotřebování nebo změny jednoduše vyměněn odšroubováním pojistné matice. Životnost sorbentu závisí na konkrétním použitém biologickém materiálu, ale přibližně se jedná o 40 až 100 vzorků [10]. Na obdobném principu jako MEPS je prováděna i poslední dobou stále více populární DPX extrakce s tím rozdílem, že sorbent není umístěn ve stříkačce ale v pipetovacích špičkách. Mezi metody nejméně zatěžující životní prostředí patří SBSE, kdy jsou analyty extrahovány pomocí stacionární fáze nanesené na magnetickém míchadle podle rozdělovacího koeficientu. Tyto metody mají prakticky nulovou spotřebu organických rozpouštědel a primárně jsou vhodné pro extrakci nepolárních analytů s odlišnými strukturami. Největší limitací SBSE metody je dlouhý proces desorpce analytů [11]. Mikroextrakční techniky na bázi SPE našly využití zejména v experimentální bioanalýze a environmentální analýze.

3.1.2.2 On-line extrakční techniky

On-line extrakční techniky jsou s výhodou využívány zvláště proto, že splňují nároky na moderní metody úpravy vzorků, jako jsou automatizace, úspora času a lidského faktoru. Kvůli dávkování celého objemu vzorku do analytického systému disponují tyto metody vyšší citlivostí v porovnání s off-line extrakčními technikami.

Mezi extrakční techniky zapojené přímo do chromatografického systému řadíme chromatografii s turbulentním průtokem, kapilární mikroextrakci na pevné fázi a materiály s omezeným přístupem (restricted access media, RAM). Chromatografie s turbulentním průtokem využívá jevu turbulence, kdy dochází k nárůstu převodu hmoty pro malé molekuly a zvýšení vířivé difúze. Tato technika je zvláště vhodná pro přímý nástřik biologického materiálu do LC systému, kdy dochází k separaci malých molekul analytu od makromolekulární matrice. Zajímavou možností je také využití biokompatibilních RAM materiálů pro přímý

nástřík biologických vzorků do chromatografického systému. Tento materiál je tvořen sorbentem s velmi malými póry umožňujícím rozdělit matici do frakcí podle molekulové hmotnosti. Zároveň díky úpravě vnějšího povrchu materiálu a velikosti pórů není umožněn vstup vysokomolekulárním látkám do částice RAM. Tyto materiály s výhodou využívají kombinace dvou extrakčních principů, a to extrakce na pevnou fázi a vylučovací chromatografie (size exclusion chromatography, SEC). Životnost RAM materiálu byla v minulosti v literatuře odhadována na 200 až 2000 nástříků [1, 12].

3.1.2.3 Vysoce selektivní extrakční metody

Moderní vysoce selektivní extrakční techniky jsou založeny na principu extrakce na pevnou fázi s využitím speciálně navržených sorbentů pro izolaci analytů ze složitých matic. Mezi zástupce takových metod patří SPE s molekulárně vtištěnými polymery (molecularly imprinted polymers, MIP) a imunoafinitní SPE.

Sorbenty MIP, které jsou v dnešní době velmi populární, umožňují selektivní extrakci cílových analytů díky jejich speciálně navržené struktuře. Tyto sorbenty jsou vhodné pro extrakce analytů z reálných vzorků komplexních matic. Sorbenty MIP obsahují synteticky připravené dutinky se speciálními vazebnými místy určenými pouze pro vybranou skupinu strukturně příbuzných látek. Praktické provedení extrakce je identické s konvenční metodou SPE. S výhodou je možné sorbent použít opakovaně, ale postupem času dochází ke ztrátám specifických vazebných míst. Limitací této metody je nízká kapacita, malá specificita a omezené spektrum sorbentů.

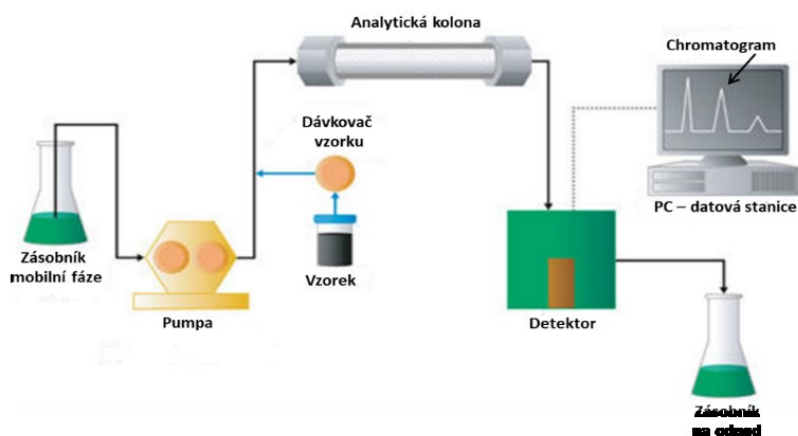
Imunoafinitní SPE nabízí proti MIP více selektivní až specifické extrakce analytů z komplexních matic. Extrakce s využitím imunoafinitních sorbentů je založena na rekogničním mechanismu antigen-protilátka a využívá vysoké specificity protilátek v kombinaci s následnou separací. V praxi jsou ale MIP sorbenty jednodušší na přípravu, chemicky i tepelně stabilnější a v případě dlouhodobého skladování nedochází k ovlivnění afinity na rozdíl od imunoafinitních sorbentů [1, 13].

3.2 Vybrané separační techniky a trendy v kapalinové chromatografii

3.2.1 Instrumentace pro kapalinovou chromatografii

3.2.1.1 Vysokoúčinná a ultra-vysokoúčinná chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) patří mezi analytické separační techniky využívané k oddělení, identifikaci a kvantifikaci analytů ve směsi. V případě kapalinové chromatografie je separace látek založena na jejich rozdílné distribuci mezi nemísitelnou mobilní a stacionární fází. Přístroj sloužící k provedení této techniky se nazývá kapalinový chromatograf a skládá se ze zásobníků mobilní fáze, degaseru, vysokotlakého čerpadla, autosampleru, chromatografické kolony, detektoru a zařízení na vyhodnocení získaných dat. Obecné schéma kapalinového chromatografu je uvedeno na obrázku 4.



Obrázek 4: Schéma kapalinového chromatografu (převzato ze zdroje Waters [14] a upraveno).

Moderním trendem v oblasti separačních technik je UHPLC (Ultra-High Performance Liquid Chromatography), zahrnující systémy pracující za ultra vysokých tlaků (15000 PSI, 1000 BAR, 100 MPa). Princip i efektivita této techniky zůstávají stejné jako v případě HPLC. Přístroje sloužící ke kapalinové chromatografii za extrémních tlaků jsou komerčně vyráběny od roku 2004, kdy byly představeny na trh firmou Waters (USA) jako UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography). Tyto systémy byly v té době již dobře známé, ale byly využívány pouze pro vědecké účely. K jejich rozšíření napomohla hlavně výhodná kombinace s novými stacionárními fázemi s částicemi menšími než 2 μm . Podle van Deemterovy rovnice, která

popisuje vztah mezi lineární rychlostí a výškou teoretického patra, je účinnost separace nepřímo úměrná velikosti částic sorbentu.

Z praktického hlediska je UHPLC systém vybaven odolným šroubením a robustním čerpadlem, aby odolal vysokým tlakům a teplotám. Jednotlivé součástky jsou vyrobeny z vysoce odolných materiálů typu ocel, pozlacená ocel, PEEK (polyether ether keton) a jejich kombinací. Tento systém dále disponuje minimálním mimo-kolonovým objemem, vysokou frekvencí sběru dat a rychlým dávkovačem. Ideální stacionární fáze pro UHPLC využití mají částice s průměrem přibližně 1,7 μm . Využití částic ještě s menším průměrem než 1,7 μm vede k minimálnímu zvýšení účinnosti na úkor maximálního navýšení zpětného tlaku. V UHPLC systému jsou vysoké nároky kladeny i na mobilní fázi a všechny používané roztoky. Rozpouštědla, pufrů a modifikátory musí splňovat kritéria na minimální obsah nečistot a velice nízký obsah alkalických kovů.

V porovnání s konvenčním HPLC poskytuje tento systém v kombinaci s vhodně zvolenou stacionární fází a detekčními podmínkami rychlejší a účinnější separace, nižší meze detekce, vyšší citlivost a v neposlední řadě nižší náklady na analýzu. Díky těmto přednostem našel UHPLC systém využití v téměř všech průmyslových i klinických odvětvích [1, 15, 16].

Autosampler pro mikrotitrační destičky

Moderním trendem v instrumentaci kapalinových chromatografů je autosampler pro mikrotitrační destičky. V takovém autosampleru je možné skladovat velké množství vzorků v termostatovaném (4-40°C) a zároveň před světlem chráněném prostoru. Odpaření a zakoncentrování biologického materiálu z mikrotitračních destiček brání speciální krytky. Tento druh autosampleru je na našem trhu dostupný například pod označením Well-plate Sampler od firmy Agilent (USA) nebo Rackchanger od firmy Shimadzu (Japonsko) viz. obrázek 5. V autosampleru Rackchanger je možné skladovat až 4 608 vzorků ve 12 mikrotitračních destičkách. Nejčastěji je použito pouze malé množství vzorků a to 50-150 μl . Autosampler tohoto druhu je často využíván v bioanalýze, kde umožní plně automatizované kontinuální dávkování velkých sérií vzorků.



Obrázek 5: Autosampler pro mikrotitrační destičky (převzato ze zdroje Shimadzu [17]).

3.2.1.2 Detekce

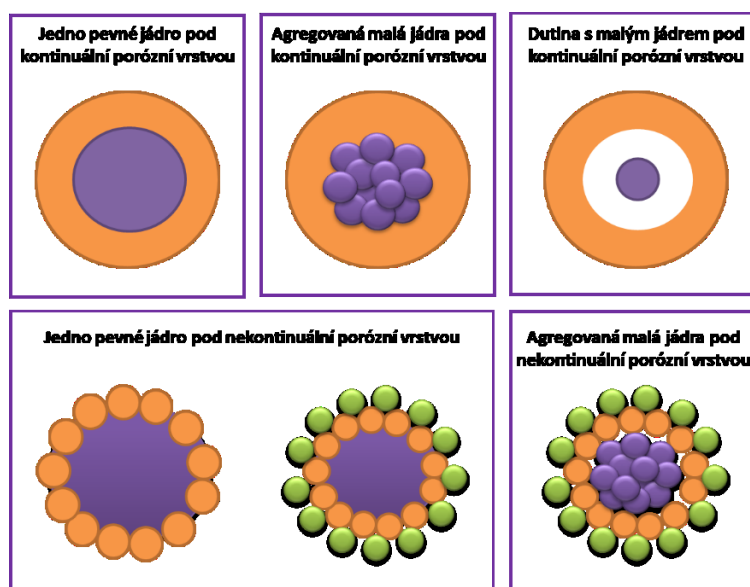
Nezbytnou součástí kapalinového chromatografu je detektor, který umožní identifikovat a kvantifikovat separované zóny látek vystupující z chromatografické kolony. V minulosti se nejčastěji v oblasti bioanalýzy využívaly detektory typu UV/VIS či FLD. Principem UV/VIS je měření absorpce eluátu v oblasti vlnových délek od 190 do 700 nm. Sofistikovanějším typem tohoto detektoru je PDA neboli také DAD (detektor s diodovým polem). Tento typ umožní záznam celého spektra v reálném čase v oblasti vlnových délek od 190 do 500 nm. Fluorescenční detektor zaznamenává sekundární (emisní) záření, které daný analyt vyzáří po absorpci primárního (excitačního) elektromagnetického záření. Absorbací záření dojde k přechodu molekul analytu do vyšších vibračních úrovní a při přechodu do nižších úrovní je absorbovaná energie vyzářena jako fluorescence. Se zvyšujícími se nároky na rychlost a citlivost nových metod dochází k rapidnímu nárůstu využití MS detekce v analýze biologických vzorků. Výhodou tohoto typu detektoru je kromě jeho vysoké citlivosti, možnost získání kvantitativních i kvalitativních informací. Kvantitativní informace vypovídají o množství daných analytů a kvalitativní o jejich struktuře a identitě. Nevýhodou jsou vysoké pořizovací náklady a vyšší cena jednotlivých analýz [1, 18]. V případě využití pouze MS detekce bez předchozí separace, je při analýze komplexních matic biologického materiálu vysoké riziko vzniku maticových efektů včetně obtížnější interpretace získaných dat [19].

3.2.2 Trendy v kapalinové chromatografii

3.2.2.1 Technologie stacionárních fází

Core-shell částice

Technologie povrchově porézních částic (porous shell particles) využívá pevného jádra s porézním povrchem. V době objevení těchto částic bylo neporézní jádro tvořené skleněnou kuličkou s povrchovou porézní vrstvou z uhlíku či silikagelu. Technologie výroby byla později zdokonalena, kdy tvorby homogenní porézního obalu bylo dosaženo pomocí koloidních roztoků a uspořádání nanočástic. Celková velikost komerčně dodávaných povrchově porézních částic se pohybuje v rozmezí 1,6 až 5 μm . Jádro částice dosahuje přibližně třikrát většího průměru než povrchová vrstva, například částice 2,6 μm je tvořena pevným jádrem o průměru 1,7 μm s 0,5 μm porézní vrstvou. Na našem trhu je dnes tento typ částic zastoupený v širokém spektru stacionárních fází od reverzní až po HILIC mód. Přestože škála funkčních skupin je široká, iontově výměnné modifikace zatím nebyly pro komerční využití uvedeny. Nevýhody těchto částic plynou z využití silikagelu pro výrobu porézního povrchu, ten má za následek omezenou stabilitu částic (do 60°C a pH 2-8). Možnosti uspořádání porézní vrstvy a pevného jádra jsou popsány na obrázku 6.



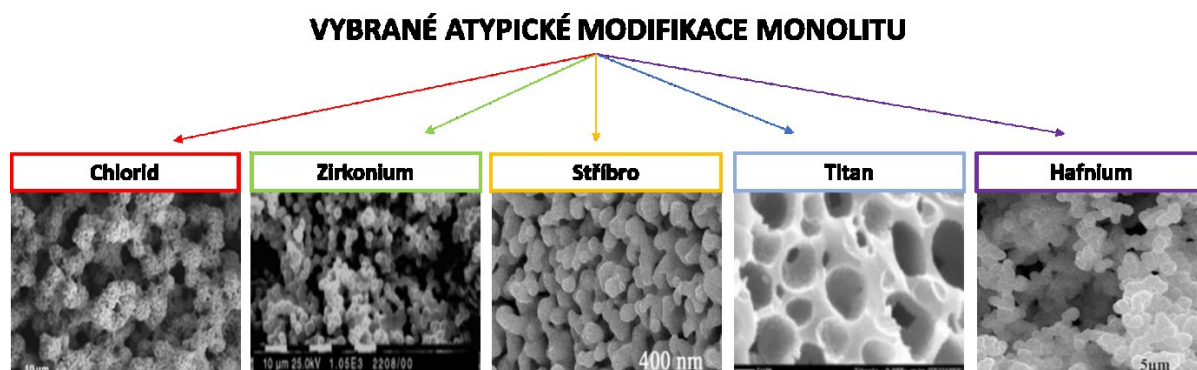
Obrázek 6: Typy uspořádání povrchově porézních částic.

S výhodou jsou kolony naplněné povrchově porézními částicemi používány jak v HPLC, tak UHPLC systémech, kde se vyznačují velmi rychlými separacemi s nízkým zpětným tlakem.

Tyto částice poskytují vysoce účinné a velmi rychlé separace. Na základě van Deemterovy rovnice lze odvodit, že ke zvýšené separační účinnosti dochází díky malému průměru částic, tenké vrstvě porézního materiálu, pravidelné distribuci částic v koloně a hustotě naplnění kolony. Výhodou oproti klasickým plně porézním částicím je, že při difúzi povrchově porézními částicemi musí analyty překonat pouze minimální vzdálenost uvnitř póru [20, 21].

Monolity

Monolitické kolony jsou na rozdíl od částicových tvořeny jedním kusem porézního pevného materiálu. Tento materiál vytváří síť středně velkých a velkých pórů. Středně velké póry (mesopóry) o průměrné velikosti 13 nm disponují velkým povrchem, díky kterému umožňují molekulám analytů přístup k místům interakce a tím zajišťují vysokou separační kapacitu. Velké póry (makropóry) vytváří síť průtokových kanálků a tím zajišťují konvektivní tok mobilní fáze. Tyto póry mají průměrnou velikost 2 μm a jsou propojeny tak, aby průtoková cesta byla co nejkratší. Monolity rozdělujeme podle složení na anorganické a polymerní. Ty mohou být dále modifikovány, vybrané atypické modifikace monolitů jsou na obrázku 7.



Obrázek 7: Vybrané atypické modifikace monolitů (převzato ze zdroje Walsh a kol. [22] a upraveno).

Chemická podstata anorganických monolitů je na bázi silikagelu. Tento typ je připravován hydrolytickou polymerací tetramethoxy/tetraethoxysilanu ve vodném roztoku kyseliny octové a polyethylenglykolu. Při jejich výrobě je možné přesně ovlivnit velikost i rozměry pórů. Jejich nevýhodou, stejně jako všech ostatních stacionárních fází na bázi silikagelu, je omezená stabilita v silně kyselém a bazickém prostředí. Monolit na bázi silikagelu je možné jednoduše modifikovat pro získání reverzní fáze. Tento typ našel své využití při separaci malých molekul i makromolekul [22, 23].

Nově od roku 2011 je známá druhá generace monolitních kolon na bázi silikagelu. Ta byla na trh uvedena pod záštitou firmy Merck a je známá pod obchodním názvem Chromolith®

HighResolution. Rozdílem oproti první generaci je odlišná velikost a objem pórů. Makropóry zde dosahují menší velikosti 1,15 μm , mesopóry 15 nm a celkový objem je 2,9 ml/g. Struktura silikagelu je více homogenní a celkově poskytuje vyšší separační účinnost. Separační účinnost je často srovnatelná s 2 μm plně porézními a 2,7 μm core-shell částicemi. Mezi nevýhody patří mírné zvýšení zpětného tlaku, které je ale zanedbatelné v porovnání s částicovými kolonami [24].

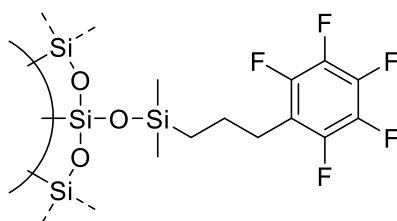
Polymerní monolity byly v minulosti připravovány přímo v dlouhých kolonách pomocí jedнокrokové polymerizace monomerů za zvýšené teploty. Zdrojem monomerů jsou akrylamid, (meth)akrylát a styren. Poslední dva zástupci jsou nejčastěji používány v bioanalýze a vyznačují se velkou stabilitou jak v kyselém, tak v bazickém prostředí. Kromě monomerů se polymerace účastní ještě porogen a iniciátor. Po proběhlé polymerizaci je sorbent promyt rozpouštědlem, aby se odstranily nezpolymerizované látky. Další možností přípravy monolitů je inkorporace monomeru s funkční skupinou do již hotového polymeru. V závislosti na způsobu přípravy monolitu a složení polymerizační směsi dojde k tvorbě určité struktury s danou velikostí pórů. Moderním trendem je miniaturizovaná syntéza monolitu v kapilárách či čípech. Své uplatnění našly polymerní monolity zvláště v proteomice, díky rychlé a účinné separaci makromolekul, polymerů i proteinů. Dále se využívají v klinické diagnostice k profilování proteinů a peptidů [1, 25].

Aplikace stacionární fáze na bázi monolitu v HPLC systému byla poprvé publikována v roce 1992 autory Švec a Fréchet [26]. Dnes jsou tyto stacionární fáze široce využívány zvláště díky svým hydrodynamickým vlastnostem, zachování separační účinnosti při použití vysokých průtoků, snadné přípravě a široké škále modifikací. Největší výhodou oproti částicovým kolonám je možnost použití relativně vysokých průtoků s minimálním zpětným tlakem. Často jsou tyto fáze aplikovány v bioanalýze a klinickém výzkumu, kde se vyznačují dlouhou životností, robustností a rychlými analýzami.

3.2.2.2 Stacionární fáze na bázi fluoru

Fluorované stacionární fáze jsou vhodnou alternativou k tradičním reverzním alkylovaným fázím C8/C18. Tento typ obměn nabývá v posledních letech na popularitě a nejčastěji se vyskytuje modifikace pentafluorofenyl. Fluorovaná funkční skupina může být na silikagelu připojena pomocí různě dlouhých alkylových řetězců, pro ilustraci je její struktura uvedena s propylovým řetězcem na obrázku 8. Stacionární fáze s obsahem fluoru poskytují celou řadu interakcí, jako jsou π - π , dipól-dipól, iontově výměnné a další. S výhodou jsou tyto

fáze využívány pro retenci bazických látek, kdy poskytují iontově výměnné interakce. Specifika této interakce ale zůstávají neobjasněná. Díky polárním interakcím typu dipól-dipól je tato stacionární fáze také vhodná pro separace malých polárních analytů. V porovnání s alkylovými stacionárními fázemi bylo pozorováno lepší zadržení fluorovaných analytů s rozdílnou velikostí, prostorovým uspořádáním a blízkou strukturou. V literatuře bylo publikováno, že vysoce selektivních a rychlých analýz je možné dosáhnout použitím kombinace povrchově porézních částic s fluorovanou stacionární fází. Tyto fáze našly své využití v oblasti analýzy vzorků životního prostředí, biologického materiálu, potravin a léčiv. Jejich rozšíření pomohl fakt, že poskytují rozdílnou retenci a selektivitu proti jiným reverzním fázím [27, 28].



Obrázek 8: Pentafluorofenylová skupina připojená propylovým řetězcem na silikagel.

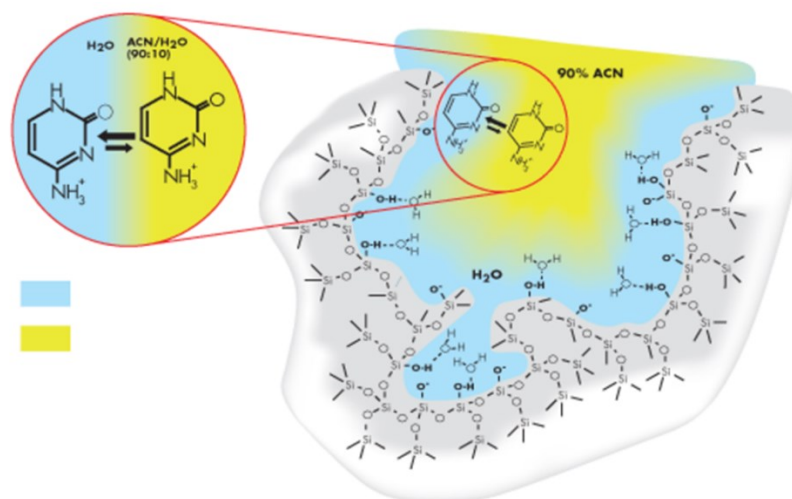
3.2.2.3 Stacionární fáze na bázi fenylu

Další z alternativ ke klasickým reverzním fázím je fáze s navázaným fenylem. Mezi její zástupce patří fenyl-hexyl, fenyl-propyl, bifenyl a další. Tyto modifikace jsou známé již několik let, ale s rozvojem chromatografie nabývají na popularitě díky svým unikátním retenčním vlastnostem. Hlavním důvodem pro jejich použití je zesílení retenčních mechanismů na základě π - π interakcí poskytovaných systémem konjugovaných dvojných vazeb v aromatickém jádře. Tento typ interakcí se projeví, pokud cílový analyt má ve své struktuře také aromát. V takovém případě byla pozorována intenzivní retence analytů a v nepřítomnosti aromátu stejná retence jako na reverzní fázi. Fenylová funkční skupina může být na silikagel připojena různě dlouhým alkylovým řetězcem, jehož struktura také ovlivní separační kapacitu. Vliv na účinnost separace má také počet aromatických skupin a přítomnost endkapovaných skupin silikagelu. Novinkou v této oblasti je stacionární fáze na bázi bifenylu. S výhodou je využívána pro separaci aromatických a polycyklických látek [29, 30].

3.2.2.4 Chromatografie HILIC

Ačkoliv se hydrofilní interakční chromatografie (hydrophilic interaction liquid chromatography, HILIC) nedá považovat za novinku v oblasti LC, nabývá v posledních letech

výrazné popularity zvláště v oblasti bioanalytických aplikací. Důvodem je častá analýza malých polárních molekul v komplexních matricích. Malé vysoce hydrofilní a nenabitě analyty jsou problematicky separovány na reverzních fázích, kdy nejčastěji dochází k jejich eluci v mrtvém čase. Přestože je tato technika známá již více jak 30 let, nebyl doposud plně pochopen ani objasněn její separační mechanismus. HILIC a chromatografie na normálních fázích se jeví jako obdobný fenomén, ale liší se mechanismem separace analytů. V HILIC módu dochází k retenci analytů na základě rozdělení mezi vodnou vrstvou imobilizovanou na sorbentu a převážně organickou mobilní fází, zatímco v normálním módu je principem adsorpce na povrch stacionární fáze. Podmínkou úspěšnosti techniky HILIC je obsah alespoň 5% vodné složky v mobilní fázi. Konkrétně bývá jako mobilní fáze využita kombinace acetonitrilu a vody či pufrů s upraveným pH. S výhodou je tento mód používán jako koncovka pro SPE v kombinaci s MS detekcí a ionizací elektrosprejem [31, 32]. Schématické uspořádání HILIC módu je znázorněno na obrázku 9.



Obrázek 9: Princip chromatografie HILIC (převzato ze zdroje Waters [33] a upraveno).

3.3 Použité analyty

Disertační práce se zabývá vývojem a validací analytických metod pro stanovení vybraných lipofilních vitamínů v lidském séru, biomarkerů oxidativního poškození nukleových kyselin v lidské moči a biomarkerů zánětu v exsudátu z dlouhodobě špatně se hojících ran, plodové vodě a výpotku. Jako další analyt v metodě stanovení biomarkerů poškození nukleových kyselin byl zvolen kreatinin kvůli potřebě korekce diurézy.

Vybrané analyty budou proto v této kapitole blíže popsány. Diskutovány budou hlavně jejich vlastnosti, biosyntéza, klinický význam v lidském organismu a možnosti stanovení pomocí chromatografických metod.

3.3.1 Vitamíny

Vitamíny jsou esenciální nízkomolekulární sloučeniny nezbytné pro chod živých organismů. Jsou to biokatalyzátory, které vykonávají funkce antioxidantů, hormonů a koenzymů. Podle fyzikálně-chemických vlastností se tyto látky rozdělují do dvou skupin, hydrofilní (rozpustné ve vodě) a lipofilní (rozpustné v tucích). Do hydrofilní skupiny patří vitamín C a skupina vitamínu B. Mezi lipofilní řadíme vitamín A, E, D a K.

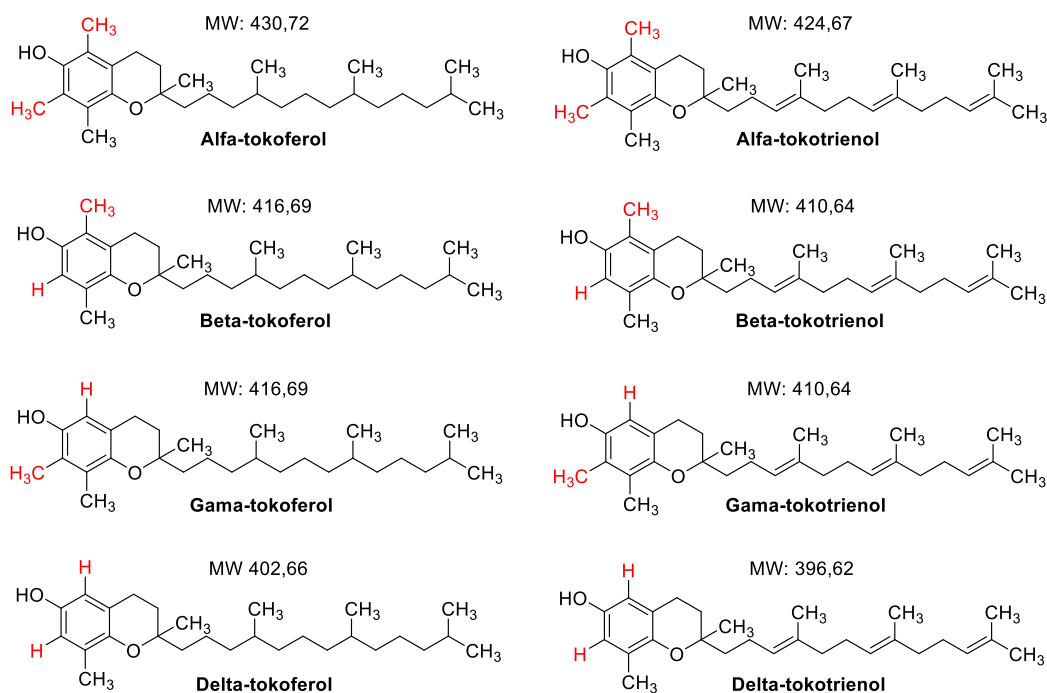
3.3.1.1 Vitamín E (tokoferoly)

Vitamín E byl poprvé popsán v roce 1922 autory Evans a Bishop při reprodukčních experimentech prováděných na krysách a byl označen jako „faktor plodnosti“ [34]. Tento vitamín, nazývaný také vitamín X, byl objeven mezi prvními a patří mezi základní antioxidanty.

Antioxidanty zahrnují širokou síť koenzymů a vitamínů, která chrání základní struktury v živých organismech, jako jsou lipidy, proteiny a nukleové kyseliny před neustálými atakami reaktivních radikálů a brání tak rozvoji oxidačního stresu. Základní funkcí vitamínu E je bránit peroxidaci lipidů. Tato schopnost klesá s počtem methylových skupin ve struktuře ($\alpha > \beta > \gamma > \delta$ -tokoferol) [35].

Chemická struktura

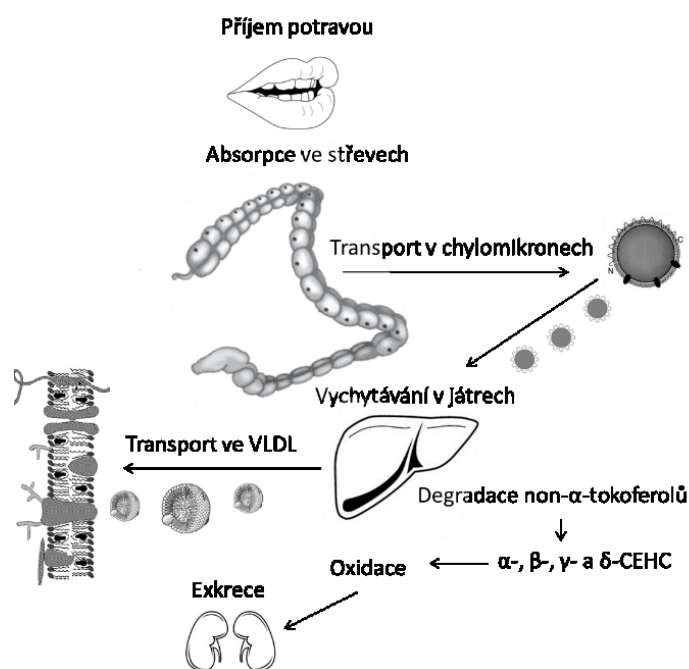
Vitamín E je souhrnné pojmenování pro dvě skupiny přírodních látek – tokoferoly a tokotrienoly z nichž každá je tvořena 4 deriváty (α , β , γ , δ). Jednotlivé analogy se v rámci skupiny liší počtem methylových skupin navázaných na chromanovém cyklu. Dalším rozdílem v chemické struktuře mezi tokoferoly a tokotrienoly je počet dvojných vazeb v alifatickém řetězci. Chemické struktury tokoferolů a tokotrienolů jsou na obrázku 10.



Obrázek 10: Chemické struktury vitamínu E.

Metabolismus

Lidský organismus nedokáže syntetizovat žádnou formu vitamínu E, na rozdíl od rostlin vybavených enzymem tokoferol cyklázou, a proto je plně závislý na jeho příjmu potravou. Mezi nejvýznamnější zdroje vitamínu E patří rostlinné oleje, ořechy, vaječné žloutky, sýry, avokádo, olivy a listová zelenina [36]. Vitamín E se v lidském organismu po příjmu potravou absorbuje ze střevního lumen, a poté je transportován pomocí chylomikronů na místa určení jako jsou tuková či svalová tkáň, ledviny a adrenergní žlázy. Zbylá chylomikronová remnanta jsou poté vychytávána v játrech, kde je vitamín E buď metabolizován a vyloučen nebo transportován do dalších orgánů [37]. Transport vitamínu E z jater do míst s velkým rizikem oxidace např. membrán probíhá pomocí transportních proteinů. Hlavním transportním proteinem, který se nachází v játrech je 32-kDa alfa-tokoferol transportní protein (α -TTP). Afinita α -TTP se liší k jednotlivým tokoferolům: α -tokoferol 100%, β -tokoferol 38%, γ -tokoferol 9% a δ -tokoferol 2% [38]. Mezi další ale méně specifické transportní proteiny patří např. 46-kDa a 14,2-kDa v placentě, mozku a játrech [39]. Metabolismus vitamínu E je znázorněn na obrázku 11.



Obrázek 11: Metabolismus vitamínu E (převzato ze zdroje Červinková a kol. [40]).

Klinický význam vitamínu E

Nedostatek vitamínu E patří mezi vzácné onemocnění, které je vyvoláno nedostatečným příjmem nebo poruchou metabolismu lipidů. Nedostatečný přísun vitamínu E potravou má za následek zvýšení rizika vzniku oxidačního stresu a projevů s ním spojených [41]. Toxicita vitamínu E zatím nebyla prokázána a jedinou známou kontraindikací k užívání vitamínu E jsou antikoagulanty.

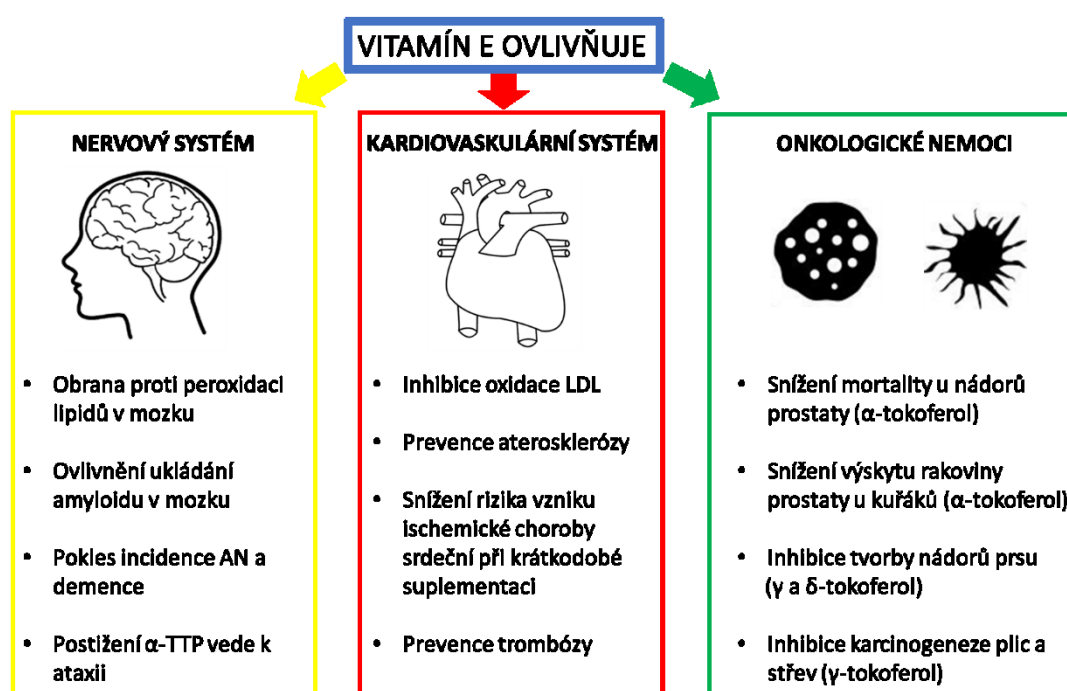
Studiu vztahů mezi hladinou vitamínu E a pozitivním či negativním vlivem na závažné onemocnění bylo věnováno velké množství klinických prací. Mezi nejvíce prostudované oblasti patří vliv na neurodegenerativní, kardiovaskulární a onkologické onemocnění. Vybrané vlivy na tyto onemocnění jsou shrnuty na obrázku 12.

Vliv vitamínu E na nervovou soustavu byl hlavním impulzem, který vedl ke studiu jeho vztahu s neurodegenerativními chorobami [41]. Mezi popsání efekty vitamínu E v nervovém systému patří neurologické poruchy při jeho nedostatečnosti, prostup α -tokoferolu přes hematoencefalickou bariéru, snížení peroxidace lipidů a ukládání amyloidu v mozku. Na základě těchto poznatků bylo provedeno několik klinických studií, které bohužel neposkytly jednoznačné závěry.

Fakt, že hladina vitamínu E výrazně zasahuje do metabolismu lipidů, vedl ke studiu vlivu vitamínu E na kardiovaskulární onemocnění. Působení vitamínu E na incidenci infarktu myokardu, cévní mozkové příhody, ischemické choroby srdeční či srdečního selhání, byl

předmětem několika klinických studií. Bylo prokázáno, že při krátkodobé suplementaci se snižuje riziko vzniku ischemické choroby srdeční.

Ochrana buněk před rozvojem oxidačního stresu, vychytávání nitroso sloučenin a posílení imunitního systému pomocí vitamínu E byly jedny z předpokladů pro jeho pozitivní protinádorový efekt. V případě klinických studií zabývajících se onkologickou problematikou byly nejčastěji sledovány jednotlivé izoformy tokoferolů, případně jejich kombinace. Vlivu vitamínu E na incidenci rakoviny prostaty se věnovalo několik rozsáhlých klinických studií, kde nebyl prokázán žádný efekt ani v případě kombinované suplementace se selenem. Naopak významný vliv, a to snížení incidence rakoviny prostaty o 32% a snížení úmrtnosti o 41% byl zaznamenán při dlouhodobé suplementaci α -tokoferolem u kuřáků. Dále byl prokázán signifikantní pozitivní inhibiční efekt γ - a δ -tokoferolů při nádorech prsu [42], plic [43], střev [44], vliv β -tokoferolu na onkologické gynekologické onemocnění [45].



Obrázek 12: Biologická funkce a vliv vitamínu E na lidské zdraví.

Přestože vitamín E je znám již od roku 1922, dodnes nebyly plně popsány a pochopeny účinky všech jeho izoform. Obecně lze říci, že lépe prostudovanou je skupina tokoferolů. Informace o tokotrienolech, které mají odlišný terapeutický účinek, jsou omezené. Nejlépe prostudovaným zůstává α -tokoferol, pravděpodobně díky jeho vysoké biologické dostupnosti a specifickému jaternímu transportéru. Nicméně studiemi bylo potvrzeno, že vliv β -, γ - a δ -tokoferolů na závažná onemocnění je podstatně větší, než vliv α -tokoferolu. V minulosti byla

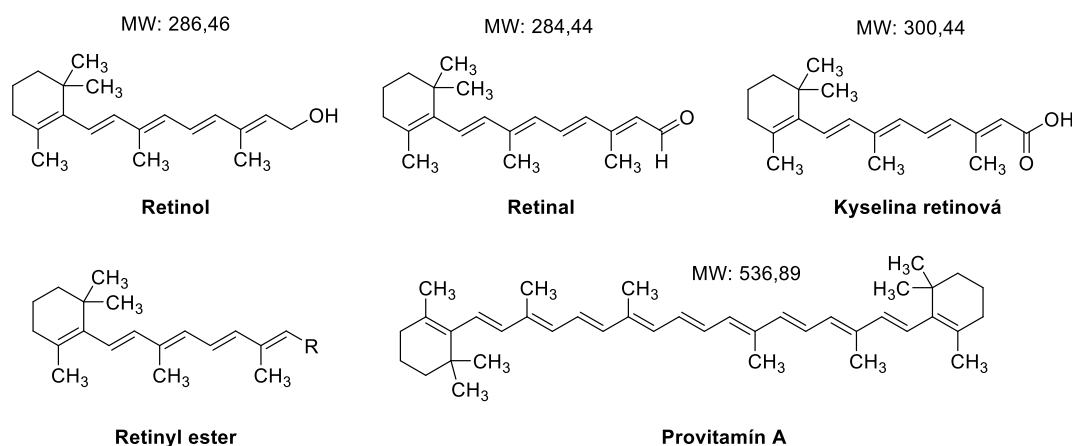
úskalím klinických studií suplementace pouze α -tokoferolem. Bylo prokázáno, že vysoké koncentrace α -tokoferolu mohou ovlivnit hladiny ostatních analogů vitamínu E a podílet se tak na rozvoji onemocnění. Jako možné řešení pro budoucí klinické studie bylo v literatuře navrženo použití α -, γ -, a δ -tokoferolů v poměru 1:5:2 nebo využití přirozeného poměru v naší potravě [46, 47].

3.3.1.2 Vitamín A (retinol)

Vitamín A, první popsáný lipofilní vitamín, zahrnuje skupinu biologicky aktivních látek nadřazeně označovaných jako retinoidy. Pojem vitamín A tedy zahrnuje retinol, retinal, retinyl ester, kyselinu retinovou a karotenoidy (označované také jako provitamín A) [48].

Chemická struktura

Struktura všech forem vitamínu A je založená na šesti členném β -jononovém kruhu, ke kterému je připojený polyenový řetězec složený ze dvou jednotek isoprenu (taktéž označovaný jako retinyllová skupina). Konjugovaný systém dvojných vazeb ve struktuře je odpovědný za typické žluto-oranžovo-červené zbarvení retinoidů. Konkrétně v polyenovém řetězci najdeme čtyři dvojně vazby, které mohou vytvářet příslušné *cis* a *trans* izomery. Obě tyto části jsou esenciální pro funkci vitamínu [49]. Chemická struktura je uvedena na obrázku 13.

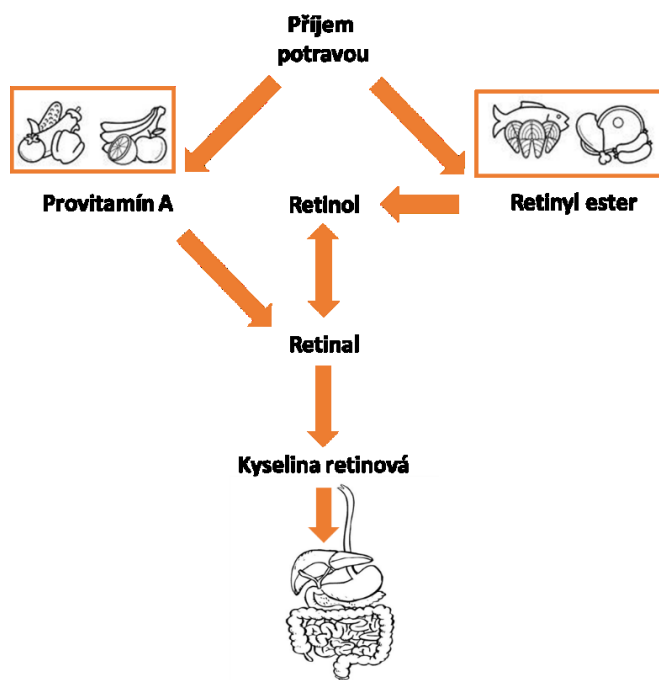


Obrázek 13: Chemické struktury skupiny vitamínu A.

Metabolismus

Vitamín A může být přijímán potravou ve dvou formách, buď přímo jako vitamín A (retinyl ester) nebo provitamín A (karotenoidy). Obě formy jsou po příjmu potravou v lidském organismu transportovány do střevního lumen, kde jsou přeměněny na micely a dále

absorbovány do krevního řečiště skrze duodenální mukózu. Převedením těchto látek pomocí intracelulárního metabolismu vzniká aktivní forma vitamínu A. Retinol je nejprve oxidován na retinal a později na kyselinu retinovou. Vitamin A je nejčastěji uchováván v lidské organismu ve formě retinyl esterů v játrech [50]. Schéma metabolismu vitamínu A v lidském těle je popsáno na obrázku 14.



Obrázek 14: Metabolismus vitamínu A.

Klinický význam vitamínu A

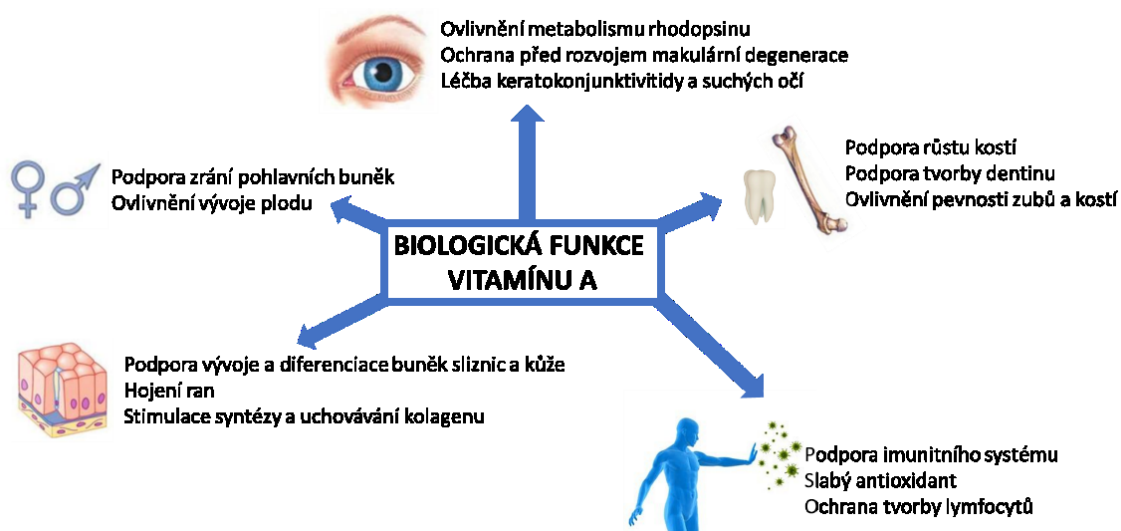
Mezi obecně známé zdravotní benefity retinolu patří podpora růstu kostí, vývoje a diferenciace buněk různého původu (krvetočné, sliznic a kůže), reprodukce (zrání pohlavních buněk a vývoj plodu), zraku (ovlivnění metabolismu rhodopsinu, ochrana před rozvojem makulární degenerace), obranyschopnosti organismu (slabý antioxidant, podpora sliznic a tvorby lymfocytů), hojení ran a hematopoézy [51]. Biologická funkce retinolu v lidském organismu je schématicky znázorněna na obrázku 15.

Nedostatkem vitamínu A jsou nejčastěji postiženi staří lidé, populace trpící malnutricí, a především lidé z rozvojových zemí. Mezi první příznaky patří zhoršená adaptace zraku ve tmě, suchá kůže, zvýšená lámavost nehtů a snížená obranyschopnost organismu [52]. Nejvíce se nedostatečnost projevuje na zhoršené funkci zraku. U dětské populace v rozvojových zemích byla v této souvislosti také pozorována xeróza rohovky a spojivky. Gilbert ve své

publikaci uvádí, že děti s jakoukoliv formou nedostatečnosti vitamínu A byly ve vyšším riziku ohrožení života [53].

Vysoké dávky vitamínu A mohou vyvolat hypervitaminózu. Hypervitaminózu rozlišujeme na akutní a chronickou. Pokud se nejedná o náhlé předávkování vitamínem A, dochází k rozvoji hypervitaminózy postupně. Tento proces je podpořen velkou skladovací kapacitou a relativně pomalým odbouráváním vitamínu A v lidském organismu. Hypervitaminóza je nejčastěji doprovázena příznaky jako jsou únava, bolesti hlavy, apatie, suchá kůže a alopecie. U závažných případů může dojít až k neurologickým, psychiatrickým či teratogenním změnám [54].

Protinádorový efekt retinolu je již dlouho znám a na toto téma bylo provedeno několik klinických studií. Studie se nejčastěji zabývaly vlivem retinolu na prevenci a terapii onkologických onemocnění. Při topickém použití retinolu v malých koncentracích byl zaznamenán inhibiční efekt na rozvoj nádorového onemocnění kůže. Podle Alizadeh a kol. [55] taktéž u pacientů s rakovinou plic byl po perorálním podávání retinolu zaznamenán útlum nádorového růstu. Snížení rizika vzniku rakoviny žaludku bylo dosaženo po podávání retinolu v kombinaci se zinkem [56].



Obrázek 15: Biologická funkce vitamínu A (převzato ze zdroje Insel a kol. [49] a upraveno).

Stanovení vitamínu A a E

Stanovení vitamínu A a E se v minulosti věnovalo mnoho výzkumných skupin. Nejčastěji byl v biologickém materiálu analyzován retinol a α -tokoferol, případně v kombinaci

s dalšími lipofilními analyty. Hladiny cílových vitamínů u zdravé populace jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Sérové hladiny vitamínu A a E u zdravé populace.

Analyt	Hladiny muži (μM)	Hladiny ženy (μM)	Průměrná koncentrace (μM)
α -tokoferol	21,30 – 30,00 [57] 28,60 [58]	17,30 – 30,40 [57] 23,70 [58]	24,68 – 26,98 [59] 24,27 [60]
β -tokoferol	NA	NA	NA
γ -tokoferol	1,14 – 3,75 [57]	0,88 – 4,33 [57]	1,57 – 1,81 [59] 1,29 [60]
δ -tokoferol	0,24 [57]	0,30 [57]	0,24 – 4,7 [61]
retinol	1,77 – 2,24 [57]	1,74 – 2,10 [57]	1,71 [60]

NA = neanalyzované

K analýze cílových vitamínů byla nejčastěji využita kapalinová chromatografie, včetně HPLC i UHPLC systémů [62–65]. Úplné separace tokoferolových derivátů bylo dříve dosaženo pouze s využitím normální fáze [66]. Ta byla později nahrazena fází reverzní. Při simultánní analýze tokoferolů a retinolu na reverzní fázi dochází nejdříve k eluci retinolu a následně tokoferolů v pořadí podle nasycení jejich řetězce. Chromatografické metody publikované v literatuře používaly všechny druhy technologií analytických kolon, tedy monolitické, core-shell i plně porézní částice. Nový typ monolitických kolon s vysokým rozlišením byl využit ve studii Kučerové a kol.[24] pro separaci retinolu a α -tokoferolu v biologickém materiálu. Ve většině publikovaných metod byla využita stacionární fáze C18. K eluci cílových analytů docházelo při gradientovém i izokratickém módu. Mobilní fáze nejčastěji obsahovala kombinaci organických rozpouštědel typu methanol a acetonitril s vodou nebo octanem amonným. Pro tento typ analýz byly použity UV, FLD i MS detekční techniky. Na základě publikovaných metod v oblasti klinického výzkumu lze shrnout, že pro analýzu vitamínu A a E v biologického materiálu není nezbytné využívat nákladnějších detekční technik typu MS. Vitamíny se v biologickém materiálu vyskytují v dostatečných koncentracích, a proto je fluorescenční detekce dostačující. Vybrané metody kapalinové chromatografie (2007-2017) a jejich separační i detekční podmínky pro simultánní analýzu retinolu a analogů tokoferolu jsou uvedeny v tabulce 3.

Volba extrakční techniky pro vitamíny A a E z biologického materiálu vychází z jejich fyzikálních a chemických vlastností. Využívané metody úpravy vzorku můžeme rozdělit podle jejich principu na extrakce na sorbent a extrakce do kapaliny. Vzhledem k tomu, že se jedná o analyty s hydrofobním charakterem, byla nejčastěji jako extrakční metoda publikována LLE. Ta

zahrnuje několik následných kroků – převedení analytu do hydrofobního rozpouštědla typu hexan nebo ethyl acetát, odpaření organické fáze a rozpuštění odparku ideálně v mobilní fázi. S výhodou byla LLE v mnoha studiích kombinována s precipitací proteinů. Vybrané extrakční metody na bázi LLE a jejich podmínky jsou blíže popsány v tabulce 2. Dále jsou v literatuře prezentovány metody úpravy vzorku na bázi jednoduché precipitace proteinů [67], miniaturizovaných extrakcí na pevnou fázi či extrakcí do nanovláknů [68]. U SPE metod někteří autoři využili opakované extrakce na různých fázích [69] i kombinace SPE s LLE [62]. Takové metody jsou pak časově velmi náročné a poměrně nevhodné do klinického výzkumu. Jako biologický materiál byla ve studiích použita plasma, sérum, sperma, plodová voda, červené krvinky i mateřské mléko [60, 63, 70–73]. V případě komplikovaných biologických matric bývá do extrakčního postupu zahrnuta také saponifikace a přidavek antioxidantů. Cílem přidání antioxidantů je ochrana analytů, které jsou tepelně labilní.

Tabulka 2: Vybrané LLE metody pro extrakci vitamínu A a E z biologického materiálu.

Matrice: V	Analyt	Antioxidant	PP činidlo	LLE činidlo	R (%)	Ref
SP: 100 μ l	α -tokoferol, retinol	BHT	EtOH	2 x hexan	α =94,6 Ret=97,0	[71]
S: 250 μ l	α -, γ -tokoferol, vit A	BHT	EtOH	2 x hexan	NA	[74]
S: 200 μ l	α -, γ -, δ -tokoferol, vit A	echinenon + BHT	EtOH	2 x hexan	NA	[63]
S: 500 μ l	α -tokoferol, retinol	NA	EtOH s MeOH	1 x hexan	α =95,4 Ret=96,2	[75]
S: 500 μ l	α -tokoferol, vit A, vit D	NA	EtOH	2 x hexan + CH ₂ Cl ₂	α > 90,0 Ret > 90,0	[76]
S: 250 μ l	α -tokoferol, retinol	BHT	EtOH s MeOH	2 x hexan + CH ₂ Cl ₂	α =98,6 Ret=96,6	[77]
P: NA	α -tokoferol, vit A	NA	EtOH	1 x hexan	NA	[78]
P: 200 μ l	α -, β -, γ -, δ -tokoferol, vit A, vit D, Q10	BHT	EtOH	1 x hexan	α =98,0 Ret=98,0	[65]

* V = objem vzorku, NA = neanalyzovaný či nepřidávaný, BHT = butylhydroxytoluen, PP činidlo = činidlo použité k precipitaci proteinů, LLE činidlo = extrakční činidlo, EtOH = ethanol, MeOH = methanol, Ret = retinol, M = moč, SP = sperma, S = sérum, P = plasma, R = výtěžnost extrakce

Tabulka 3: Přehled vybraných LC metod použitých pro analýzu vitamínu A a E v letech 2007-2017.

Analyt	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Metoda	Inj (μl)	LOD	Čas (min)	Ref
α-, γ-tokoferol, vit A, IS	Chromolith C18 100 x 4,6 mm monolit	ACN + AMAC	HPLC-DAD	20	α = 1,00 μM γ = 0,60 μM Ret = 0,03 μM	6,5	[79]
α-, γ-, δ-tokoferol, vit A, IS	ODS 250 x 3,0 mm 3 μm	MeOH + ACN + CH ₃ Cl	HPLC-FLD	20	α = 0,17 μM γ = 0,02 μM δ = 2,9 nM Ret = 8,3 nM	8	[63]
α-tokoferol, retinol	BEH C18 100 x 2,1 mm 1,7 μm	MeOH	UHPLC-FLD	5	α = 0,02 μM Ret = 0,01 μM	2	[75]
α-, δ-tokoferol, vit A, K, D	XBD C18 150 x 4,6 mm 5 μm	ACN + MeOH H ₂ O + AMFO	HPLC-MS/MS	20	α = 0,03 μM δ = 0,11 μM Ret = 0,05 nM	28	[80]
α-tokoferol, vit A, D	HSS T3 100 x 2,1 mm 1,8 μm	ACN + IPA + MeOH	UHPLC-UV	5	α = 5,00 μM Ret = 0,10 μM	4,5	[76]
α-, γ-tokoferol, vit A, D	ODS 150 x 4,6 mm 5 μm	MeOH + H ₂ O + ACN	HPLC-UV	20	α = 0,60 μM δ = 0,45 μM Ret = 0,04 μM	20 ¹	[62]
α-, γ-tokoferol, vit A	BEH C18 50 x 2,1 mm 1,7 μm	ACN + MeOH + H ₂ O + IPA	UHPLC-PDA	2	α = 0,18 μM γ = 0,04 μM Ret = 0,02 μM	1,6	[81]
α-tokoferol, retinol	Kinetex C18 100 x 4,6 mm 2,6 μm	MeOH	HPLC-UV	5	α = 0,08 μM Ret = 4,00 nM	1,7	[82]
α-tokoferol, retinol	Chromolith C18 100 x 4,6 mm	MeOH	HPLC-DAD	25	α = 0,09 μM Ret = 0,13 μM	2,0	[64]
α-tokoferol, retinol	Chromolith HR C18 100 x 4,6 mm	MeOH	UHPLC-FLD	1	α = 6,40 nM Ret = 2,30 nM	1,3	[24]

* inj = objem nastříkovaného vzorku, AMAC = octan amonný, ACN = acetonitril, MeOH = methanol, IPA = isopropanol, Ret = retinol, ¹ = včetně času potřebného k extrakci,

3.3.2 Biomarkery aktivace imunitního systému

Zánět je základní, komplexní a obranný mechanismus vyšších organismů, který vede k eliminaci a opravě následků způsobených nefyziologickými vlivy. Jedná se o soubor biochemických, imunologických a proliferativních procesů reagujících na patogenní podnět s cílem odstranění nevratně poškozené tkáně. V průběhu zánětu jsou vyplavovány proteiny akutní fáze podílející se na udržení hemostázy a homeostázy, regeneraci a reparaci tkání a orgánů, celulárních a humorálních imunitních reakcích. Pomocí stanovení proteinů akutní fáze je možné monitorovat úroveň obranných mechanismů, rozsah poškození tkání a orgánů a v neposlední řadě také účinnost a následky léčby. Proteiny akutní fáze dále dělíme na pozitivní reaktanty (zvýšené sérové hladiny) a negativní reaktanty (snížené sérové hladiny). Mezi pozitivní reaktanty patří například velmi dobře prostudovaný c-reaktivní protein. Stálé rozšiřování spektra diagnostických biomarkerů zánětu vedlo k objevení nových ukazatelů jako je neopterin (měřítko aktivace buněčné imunity), elastáza neutrofilů (diferenciální diagnostika zánětů) a prokalcitonin (určení septického stavu) [83, 84].

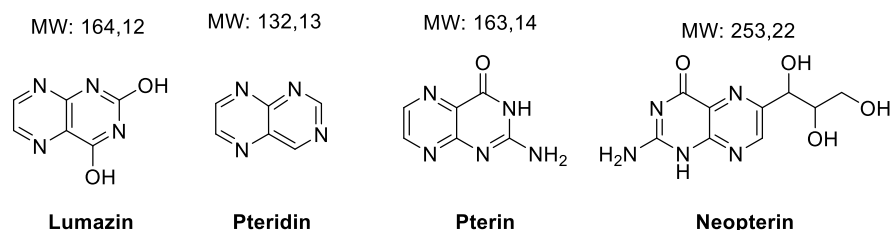
3.3.2.1 Neopterin

Neopterin byl objeven v roce 1963 v larvách včel a již čtyři roky po svém objevení byl izolován z lidské moči. Jedná se o krystalickou, ve vodě rozpustnou, nízkomolekulární látku, jejíž hladiny se zvyšují při probíhající imunitní reakci. Neopterin je biologicky stabilní analyt s dlouhým poločasem v lidském organismu, a proto je možné ho s jistotou určit v mnoha druzích biologických tekutin jako je krev, moč, synoviální tekutina a mozkomíšní mok. Dlouhodobá stabilita neopterinu, za předpokladu že je chráněn před světlem, umožňuje jeho komfortní stanovení v laboratořích a využití pro klinické studie, kde se předpokládá skladování vzorků před analýzou po dobu několika měsíců [85, 86].

Chemická struktura pteridinů a neopterinu

Neopterin patří do skupiny pteridinů. Pteridiny jsou fotosenzitivní aromatické sloučeniny původně objevené v roce 1889 jako žlutý pigment (xanthopterin) v křídlech motýlů druhu *Lepidoptera* [85]. Základní strukturou pteridinů je pteridin, bicyklická sloučenina tvořená pyrazinovým a pyrimidinovým jádrem. Od pteridinu jsou pak odvozeny další výchozí struktury jako je pterin a lumazin. Neopterin je odvozen od pterinu. Ve své struktuře má na rozdíl od pteridinu na pyrimidinovém kruhu navázanou amino a keto skupinu a na

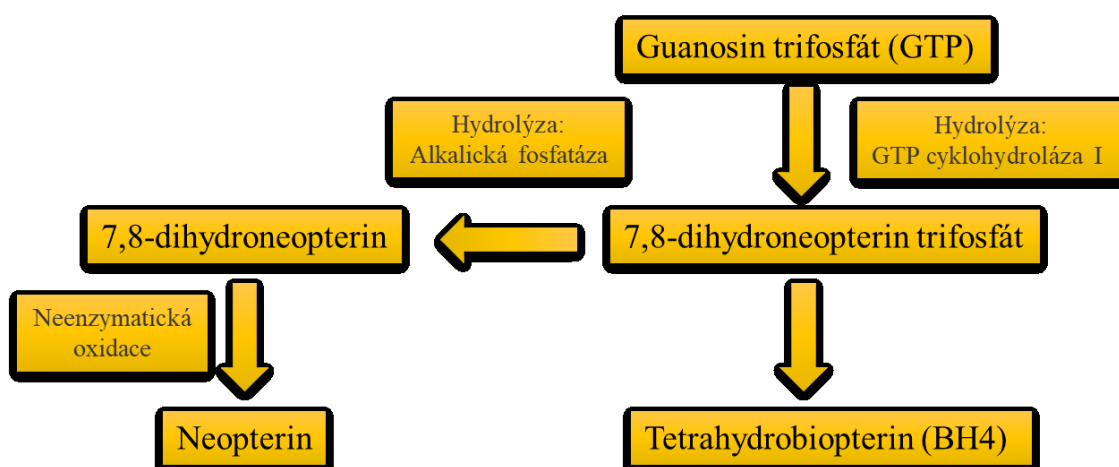
pyrazinovém kruhu v poloze 6 je vázaný 1,2,3-trihydroxypropylový řetězec [85, 87]. Základní struktury pteridinů jsou společně se strukturou neopterinu na obrázku 16.



Obrázek 16: Chemická struktura pteridinů.

Biosyntéza neopterinu

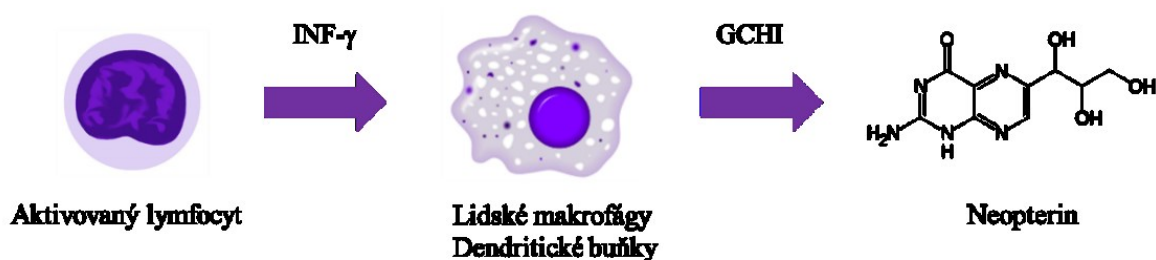
V průběhu evoluce si obratlovci a jiné živočišné druhy zachovali pouze schopnost biosyntézy nekonjugovaných pteridinů (neopterin, molybdopterin, tetrahydrobiopterin). Biosyntéza tetrahydrobiopterinu (BH4) *de novo*, začíná hydrolytickým štěpením guanosin trifosfátu (GTP) pomocí GTP cyklohydrolázy I. Po prvním kroku této biosyntézy vzniká 7,8-dihydroneopterin trifosfát. Tento intermediát může být buď dále využit pro biosyntézu neopterinu nebo BH4. Protože aktivita klíčového enzymu pro biosyntézu BH4, 6-pyruvoyltetrahydropterinsyntázy, je v lidských hepatocytech velmi nízká a v monocytech dokonce chybí úplně, dochází téměř výhradně k tvorbě a uvolňování 7,8-dihydroneopterinu a neopterinu [85, 87]. Schéma zkrácené biosyntézy neopterinu a BH4 je znázorněno na obrázku 17.



Obrázek 17: Stručná biosyntéza neopterinu a BH4 (převzato ze zdroje Ghisoni a kol. [88] a upraveno).

Imunitní reakce a produkce neopterinu

Pokud imunitní systém v lidském těle pomocí lymfocytů rozpozná cizí nebo vlastní modifikované buňky, pak dojde k produkci mediátorů zánětu tzv. cytokinů. Mezi tělu vlastní modifikované buňky stimulující produkci cytokinů patří alogenní, viry infikované a maligní nádorové buňky [85]. Jedním z významných cytokinů je interferon gama (INF- γ), který je uvolňován z aktivovaných TH1 lymfocytů na počátku imunologické odpovědi a ovlivňuje antimikrobiální i antivirovou aktivaci imunitního systému. Vyšší hladina INF- γ vede k aktivaci GTP cyklohydrolázy I (GCHI) a tím stimuluje produkci neopterinu. K syntéze neopterinu dochází téměř výhradně v lidských makrofázích a dendritických buňkách pocházejících z monocytů. Endoteliální buňky pupečníku a ledvin jsou také schopné produkovat neopterin ale ve výrazně nižších koncentracích než makrofágy [86, 89]. Schéma imunitní reakce vedoucí k produkci neopterinu je na obrázku 18.



Obrázek 18: Tvorba neopterinu v závislosti na imunitní reakci.

Klinický význam neopterinu

Signifikantně zvýšené hladiny neopterinu byly zaznamenány při infekci nebo poškození a aktivaci imunitního systému. V těchto případech, sledování hladin neopterinu v tělesných tekutinách napomáhá předvídat vývoj patologického stavu. Jedná se o velmi citlivý biomarker, zvláště proto že jeho reakce na imunitní impuls je časnější než například dobře známý c-reaktivní protein.

Funkce a působení neopterinu v mozku byly studovány v případě neurozánětlivých onemocnění. Zatím nebylo objasněno, jestli nervové buňky samy mohou syntetizovat neopterin, ale byla popsána jeho cytoprotektivní role. Cytoprotektivní role v celé centrální nervové soustavě a konkrétní úloha neopterinu při neurozánětlivých onemocněních však zůstává neobjasněna [88].

Vyplavení neopterinu v případě zánětlivých reakcí organismu vedlo ke studiu vztahu mezi hladinou neopterinu a post-transplantační reakcí organismu. Bylo zjištěno, že hladina neopterinu významně stoupá při post-transplantačních komplikacích. U pacientů s rejekcí štěpu po transplantaci ledvin byly prokázány signifikantně vyšší hladiny neopterinu v moči. V literatuře bylo navrženo, že monitorování hladin neopterinu může významně pomoci při rozpoznání odmítnutí transplantovaného orgánu již v časném stádiu reakce [90].

V případě autoimunitních onemocnění (např. systémový lupus erythematosus, revmatoidní artritida, tyreoiditida, celiakie a dalších) dochází k rozvoji imunitní reakce a tvorbě protilátek proti tělu vlastním buňkám. U těchto chorob se ukázalo sledování hladin neopterinu jako vhodné a dostatečně senzitivní pro monitorování závažnosti onemocnění i při neustálé fluktuaci zánětlivé aktivity. Hladiny neopterinu mohou být u výše zmíněných onemocnění stanoveny v séru, moči i synoviální tekutině [85]. V případě studie zabývající se korelací hladin neopterinu a stadia onemocnění systémový lupus erythematosus byly signifikantně vyšší hladiny neopterinu pozorovány u aktivní formy onemocnění. Hladina neopterinu u pacientů s neaktivní formou onemocnění byla nižší než u pacientů s aktivní formou, ale stále vyšší než u zdravých jedinců [91].

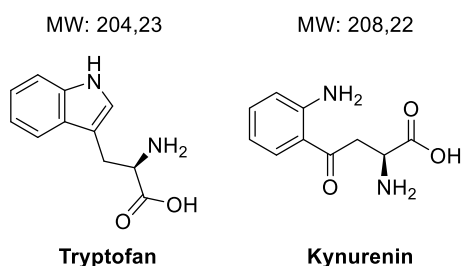
V souvislosti s hladinami neopterinu a nádorovými onemocněními byla prezentována široká škála odborných publikací. Nejčastěji byl studován vztah neopterinu ke kolorektálnímu karcinomu, nádorům prsu a vaječnicků. Všeobecně lze shrnout, že u nádorových onemocnění se vyskytují signifikantně vyšší hladiny sérového, močového či v některých studiích celkového neopterinu (součet neopterinu a 7,8-dihydroneopterinu [92]) v porovnání se zdravou populací. Studie zabývající se onkologickou tematikou dále například zkoumaly vztah mezi hladinou neopterinu a velikostí nádorů [89], prognózou pacientů [93] či typem operativního zákroku [94].

3.3.2.2 Kynurenin a tryptofan

Chemická struktura kynureninu a tryptofanu

Tryptofan patří mezi nepolární aromatické aminokyseliny. Jeho struktura je tvořena alfa-amino propanovou kyselinou s terminálně připojeným indolovým cyklem.

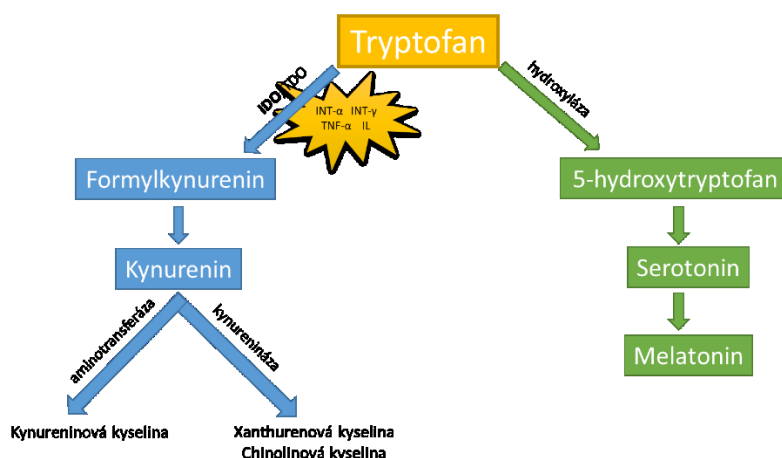
Kynurenin vzniká jako produkt katabolismu tryptofanu. Jedná se alfa-amino butanovou kyselinou s gama keto skupinou a terminálně připojeným aminofenylem. Chemická struktura je znázorněna na obrázku 19.



Obrázek 19: Chemická struktura kynureninu a tryptofanu.

Metabolismus tryptofanu a vznik kynureninu

Tryptofan, jako esenciální aminokyselina patří mezi významné biologicky aktivní látky v lidském organismu a jeho katabolismus se podílí na biosyntéze serotoninu, melatoninu a kynureninu. Více než 99% přijatého tryptofanu, který neslouží pro biosyntézu proteinů, je odbouráváno přes takzvanou kynureninovou metabolickou cestu. Schéma metabolické přeměny tryptofanu na kynurenin a melatonin je na obrázku 20. Mezi unikátní hem-dependentní enzymy, které jsou součástí kynureninové cesty patří tryptofan 2,3-dioxygenáza (TDO) a indolamin 2,3-dioxygenáza (IDO). Pomocí těchto enzymů dochází k iniciální přeměně tryptofanu na *N*-formylkynurenin, který je později hydrolyzován na samotný kynurenin. K indukci IDO enzymu dochází nejvíce pomocí INF- γ a mnohem slaběji pomocí interferonu alfa (INF- α). V závislosti na tkáni, kde proběhla přeměna tryptofanu na kynurenin dochází k dalším transformacím na metabolity kynureninu. V makroglíích dochází k tvorbě kynureninové kyseliny s neuroprotektivním účinkem a v mikroglíích xanthurenové a chinolinové kyseliny s neurotoxickým účinkem [95, 96]. Kvantifikovat katabolismus tryptofanu je možné na základě určení poměru kynurenin/tryptofan.



Obrázek 20: Katabolismus tryptofanu a tvorba kynureninu.

Klinický význam tryptofanu a kynureninu

Efekt produktů katabolismu tryptofanu na nervový systém byl v minulosti intenzivně studován ve spojitosti s Alzheimerovou a Huntingtonovou nemocí, demencí i schizofrenií [97]. Bylo prokázáno, že kynurenin a jeho metabolity nemohou ovlivňovat přímo neurony, ale nervový systém je ovládán díky jejich pro- a anti-oxidačním efektům. Například u pacientů s neurodegenerativním onemocněním byly zaznamenány zvýšené hladiny neurotoxické chinolinové kyseliny v mozkomíšním moku [95].

V literatuře bylo dále popsáno, že typ aktivace kynureninové cesty může ovlivnit míru poškození organismu. V případě aktivace pomocí INT- α byla zaznamenána vyšší produkce kynureninu, kynureninové a chinolinové kyseliny. Tyto produkty se poté mohou velmi aktivně podílet na zánětlivé reakci. U pacientů se zánětlivým stavem vzniklým právě tímto způsobem aktivace kynureninové cesty byla zaznamenána rezistence v léčbě deprese a chemoterapie. Výzkumy ukázaly také spojení mezi kynureninovou cestou a nádorovým onemocněním, kdy byl prokázán vliv na proliferaci a růst nádorů. Na základě tohoto zjištění bylo zahájeno klinické testování potencionálních léčiv na bázi inhibitorů IDO [95].

Stanovení neopterinu, kynureninu a tryptofanu

Mezi metody nejčastěji využívané ke stanovení neopterinu, kynureninu a tryptofanu patří imunologické metody ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), radioimunoanalýza (RIA) a kapalinová chromatografie.

Imunologické metody jsou velmi často využívány v rutinní laboratorní diagnostice, zvláště kvůli jednoduchosti jejich provedení. Metody RIA byly v bioanalýze v minulosti hojně využívány, a to zvláště pro detekci analytů ve velmi nízkých koncentracích. Tyto metody jsou schopné detekovat analyt na základě identifikace komplexu antigen/protilátka pomocí radioaktivního značení. Vzhledem k dnešní dostupnosti více bezpečných metod, krátkému poločasu rozpadu radioizotopů a vysokých nákladů spojených s jejich likvidací je tento typ metod pomalu eliminován. Naproti tomu imunologická metoda ELISA je dnes stále hojně využívána. Principem metody je vznik imunokomplexu v přítomnosti enzymy značených antigenů či protilátek. Ty jsou nejčastěji navázány v jamkách v plastových mikrotitračních destičkách nebo zkumavkách. Po přidavku biologického materiálu dojde v případě přítomnosti specifických protilátek nebo antigenů k vytvoření imunokomplexu. Ten po přidání chromogenního substrátu umožní spektrometrickou detekci enzymové aktivity (změna barvy).

Technika ELISA se provádí v komerčně dostupných soupravách. Mezi nevýhody patří vysoká cena za jedno vyšetření, nutnost porovnání výsledků s referenčním materiálem, možnost výskytu zkřížených reakcí a omezená doba expirace jednotlivých souprav [98].

Klinická data získaná z imunologických i chromatografických metod mezi sebou korelují, ale kvůli významným nedostatkům metod RIA a ELISA je chromatografické stanovení považováno za standardní a referenční techniku. Pro stanovení neopterinu a jiných pteridinových derivátů byl nejčastěji využit HPLC systém. Ve většině případů byla separace provedena na reverzní stacionární fázi typu C18. V oblasti technologie stacionárních fází byly využity plně porézní částice [99] a monolitické sorbenty [100]. Monolity jsou díky svým vlastnostem více než vhodné pro analýzu těchto derivátů z různých druhů biologického materiálu. Poskytují rychlé analýzy a i při použití komplexních matic si zachovávají vysokou životnost. Monolitická stacionární fáze byla využita autory Krčmová a kol. [100] k separaci kynureninu, neopterinu a tryptofanu v lidském séru pomocí dvou zapojených analytických kolon. V publikovaných metodách byla k eluci analytů převážně využita hydrofilní mobilní fáze s přídavkem organického rozpouštědla, jejíž vodná složka byl nejčastěji fosfátový pufr či voda s upraveným pH v rozmezí 4-7. Mobilní fáze byla v případě MS detekce tvořena acetonitrilem či methanolem a vodou s upraveným pH pomocí kyseliny mravenčí [99, 101] nebo trifluoroctové [102]. V literatuře jsou pro detekci daných analytů uvedeny techniky UV/VIS [103], FLD [52] a MS [101].

Pteridinové deriváty včetně tryptofanu a kynureninu byly nejčastěji stanovovány v séru [100, 104]. Mezi další použitý biologický materiál patřil například mozkomíšní mok, plasma, moč, mozková tkáň či plná krev [103, 105]. K analýze neopterinu byly unikátně použity i vzorky zaschlé krve v metodě autorů Santagata a kol. [106]. K extrakci analytů bylo často využito jednoduchých technik na bázi diluce a precipitace proteinů [100, 102, 107]. Odstranění bílkovin ze vzorku bylo dosaženo pomocí organického rozpouštědla a inkubací v chladu. Tento krok byl následován centrifugací, odpařením, rozpuštěním supernatantu a filtrací. Dále byla pro tuto aplikaci použita extrakce na pevnou fázi, jak v klasickém uspořádání, tak v on-line provedení. Autoři De Jong a kol. [101] publikovali on-line SPE metodu, která eliminovala manuální náročnost extrakce. Celkový čas analýzy včetně předúpravy vzorku byl 8 min.

Vybrané metody kapalinové chromatografie použité k analýze neopterinu, kynureninu a tryptofanu jsou včetně podmínek separace a extrakčních technik uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4: Metody využívané pro extrakci a separaci neopterinu, kynureninu a tryptofanu v biologickém materiálu.

Analyt	Technika	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Inj (μL)	LOD	Čas (min)	Extrakce (matrice)	V (μL)	R (%)	Ref
neopterin, biopterin, kreatinin	HPLC-FLD	C18 100 x 8 mm 10 μm	KH ₂ PO ₄ (15 mM, pH 7)	10	NA	20	oxidace s KI (MM)	500	NA	[108]
neopterin, kynurenin, tryptofan, kreatinin	HPLC-UV/FLD	C18 50 x 4,6 mm monolit 100 x 4,6 mm	KH ₂ PO ₄ (15 mM, pH 4,5)	1	Neo = 0,5 nM Kyn = 0,7 μM Kr = 0,2 μM Trp = 0,2 μM	8	PP (S)	200	Neo = 97-101 Kyn = 101-103 Kr = 97-99 Trp = 91-95	[100]
neopterin	HPLC-UV/FLD	C16 100 x 4 mm 5 μm	ACN + H ₂ O	20	N = 0,1 ng	6	SPE (S, M)	1000	Neo = 96-113	[103]
neopterin, kreatinin	HPLC-UV	OD 300 250 x 4,6 mm 5 μm	Na ₃ PO ₄ (150 mM, pH 4)	100	NA	20	Diluce (M)	NA	Neo = 79-82	[107]
kynurenin, tryptofan	HPLC-MS/MS	Synergi RP 75 x 4,6 mm 4 μm	ACN + MeOH + 0,1% FA	5	Kyn = 5 ng/ml Trp = 50 ng/ml	4,5	PP (P)	100	Kyn = 92-109 Trp = 90-100	[99]
neopterin, kynurenin, tryptofan	HPLC-MS/MS	GRACE C18 100 x 2,1 mm 3 μm	H ₂ O + MeOH + 0,01% TFA	20	Neo = 0,6 nM Kyn = 0,3 nM Trp = 1,5 nM	5,5	PP (P, MM)	10	Neo = 109-114 Kyn = 99-106 Trp = 97-111	[102]
neopterin	HPLC-FLD	C18 250 x 4,6 mm 5 μm	H ₂ O + ACN	30	Neo = 0,1 nM	7	PP (S)	100	Neo = 98-99	[104]
kynurenin, tryptofan	HPLC-MS/MS	C18 100 x 2,1 mm 3 μm	H ₂ O + ACN + 0,2% FA	50	Kyn = 1 nM Trp = 30 nM	8	on-line SPE (S)	250	Kyn = 37-48 Trp = 3-4	[101]

* PP = precipitace proteinů, inj = množství nastříkovaného vzorku, MM = mozkomíšní mok, S = sérum, M = moč, P = plasma, Neo = neopterin, Kyn = kynurenin, Trp = tryptofan, TFA = kyselina trifluoroctová, FA = kyselina mravenčí, V = objem vzorku, R = výtěžnost extrakce

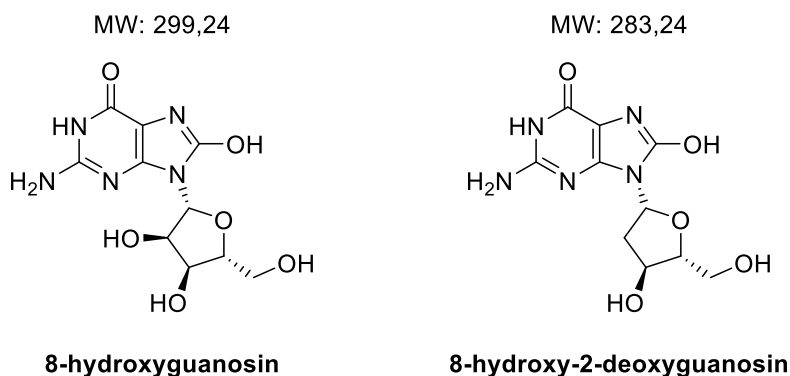
3.3.3 Produkty oxidačního poškození nukleových kyselin

Nukleové kyseliny, stejně jako ostatní biologické kompartmenty, jsou neustále napadány reaktivními formami kyslíku a dusíku. Bylo prokázáno, že nejvíce reaktivním a toxickým je hydroxylový radikál. Ten je mimo jiné pravděpodobně zodpovědný za oxidativní poškození většiny nukleových kyselin. K napadání nukleových kyselin a tím tvorbě modifikovaných bází dochází poměrně jednoduše kvůli jejich nemožnosti difundovat do okolního prostředí a produkce hydroxylových radikálů přímo v jejich okolí. Produkty oxidačního poškození je možné stanovit v tělních tekutinách a využít jako neinvazivní biomarkery pro monitorování závažných onemocnění [109–111].

3.3.3.1 8-hydroxy-2-deoxyguanosin a 8-hydroxy-guanosin

Chemická struktura

Chemická struktura 8-hydroxy-2-deoxyguanosinu (8OH2dG) a 8-hydroxy-guanosinu (8OHG) je odvozena od guanosinu. Základem této sloučeniny je nukleová báze guanin a pětiuhlíkatý sacharid. Od guanosinu se oba analyty liší přítomností hydroxy skupiny v poloze 8 guaninové struktury. Jako sacharid vázaný *N*-glykosidickou vazbou k bázi je v případě 8OH2dG deoxy-D-ribóza a 8OHG D-ribóza. Chemické struktury jsou uvedeny na obrázku 21.

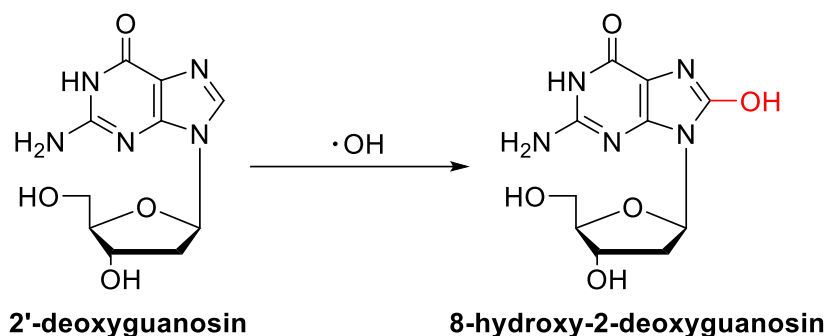


Obrázek 21: Chemická struktura 8OH2dG a 8OHG.

Vznik modifikovaných bází nukleových kyselin

V případě, že se již nukleová kyselina neubrání napadení reaktivními radikály, dochází k jejímu oxidativnímu poškození s následnou kontinuální enzymatickou reparací, při které jsou produkty vzniklé oxidačním poškození uvolněny do cirkulace. Takto vzniklých modifikovaných bází DNA bylo dnes identifikováno již přes 20 různých druhů. Naopak modifikovaných bází RNA

bylo identifikováno mnohem více (přes 100 druhů). Vyšší zastoupení oxidovaných RNA bází může být následkem její široké cytosolické distribuce a vyšší náchylností k oxidativnímu poškození. Nejvíce reaktivní bází v nukleových kyselinách je guanin, a proto se v tělních tekutinách a tkáních nejčastěji vyskytují jako produkty oxidačního poškození DNA 8OH2dG a RNA 8OHG. Schéma vzniku 8OH2dG je na obrázku 22, obdobným mechanismem vzniká i 8OHG. Tyto modifikované nukleosidy jsou běžně přítomné v lidské moči [109–111].



Obrázek 22: Vznik 8OH2dG.

Klinický význam biomarkerů oxidačního poškození DNA a RNA

Význam produktů oxidativního poškození nukleových kyselin byl v minulosti intenzivně studován, stejně tak jako jeho spojitost s řadou závažných onemocnění. Zásadní role procesu oxidace guaninu při onemocnění byla popsána již v roce 1962 a o více než dvacet let později byla potvrzena produkce 8OH2dG po ozařování myší. Od roku 1990 se tak vědci snaží objasnit a pochopit roli oxidačních produktů guaninu v patogenezi závažných onemocnění a také ho využít jako diagnostický biomarker [112]. Zvýšené hladiny biomarkerů 8OH2dG a 8OHG byly zaznamenány například u osob s rizikem metabolických onemocnění, malnutrice, stresu, po vystavení znečištěnému ovzduší a tabákovému kouři.

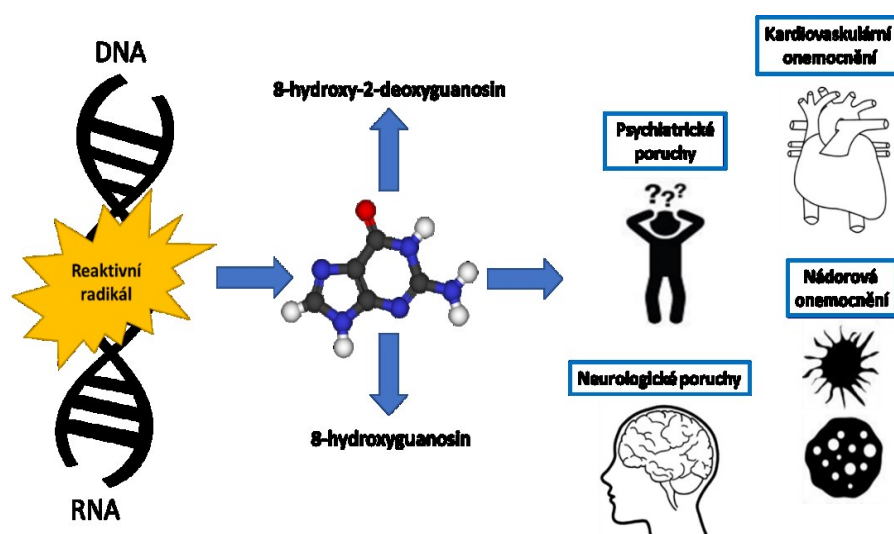
U neurodegenerativních onemocnění bylo prokázáno, že v časném stádiu jejich rozvoje dochází v průběhu patologických změn k oxidaci RNA. Bylo zjištěno, že v průběhu onemocnění dochází vlivem oxidačního působení k poškození mRNA i rRNA. K poškození DNA vlivem oxidace dochází až při rozvinuté formě neurodegenerativních onemocnění. Z tohoto důvodu bylo provedeno několik klinických studií zabývajících se vztahem 8OHG a Alzheimerovy nemoci (AN), Parkinsonovy choroby či demence [109]. Výzkumná skupina Abe a kol. [113] na základě oxidace RNA v časném stadiu Parkinsonovy choroby prokázala, že hladina 8OHG v cerebrospinálním moku koreluje s průběhem a stadiem onemocnění. Oxidace RNA byla také

pozorována u AN, kdy v mozkové tkáni pacientů s časným stadiem symptomatické formy byly zaznamenány zvýšené hladiny 8OHG. Dále bylo prokázáno, že hladina 8OHG nepřímo koreluje s depozity amyloidu a průběhem onemocnění [114]. Jak již bylo popsáno, 8OHG může být použit jako kvalitní biomarker u neurodegenerativních onemocnění, ale bohužel se nejedná o biomarker specifický.

Vztahem mezi hladinou 8OH2dG a rozvojem různých druhů onkologických onemocnění se zabývalo mnoho studií, z nichž vybrané jsou dále uvedeny. U skupiny přibližně 25 tisíc žen po menopauze s nádorovým onemocněním prsu autoři Loft a kol. [115] zaznamenali signifikantně zvýšené hladiny 8OH2dG. U pacientů s nádory žaludku byly pozorovány signifikantně zvýšené hladiny 8OH2dG v moči a žaludeční tkáni oproti zdravým jedincům [116]. Zvýšené hladiny 8OH2dG byly dále zaznamenány u onkologických onemocnění, jako jsou například lymfomy [117], akutní leukemie [117], nádory plic [118] či nádory dlaždicových buněk jícnu [119].

Další skupinou onemocnění, u kterého byl zkoumán vliv 8OH2dG na lidský organismus jsou kardiovaskulární poruchy. Výzkumná skupina Suzuki a kol. [120] zaznamenala ve své studii pozitivní vliv 8OH2dG právě na onemocnění srdce. Konkrétně bylo prokázáno, že jeho sérové hladiny mohou sloužit jako kvalitní prognostický biomarker při selhání srdce. Sledování močových hladin 8OH2dG bylo dále navrženo jako vhodný krok pro predikci stavu pacientů po cévní mozkové příhodě [121].

Vznik 8OH2dG a 8OHG v lidském organismu a jejich spojitost s vybranými onemocněními jsou znázorněny na obrázku 23.



Obrázek 23: Vznik 8OH2dG a 8OHG včetně klinického významu.

Stanovení 8OH2dG a 8OHG

V literatuře byly pro analýzu nukleosidů publikovány metody imunochemické a chromatografické. Imunochemické metody typu ELISA poskytují jednoduché, rychlé, robustní a snadno automatizované metody, ale pro detekci nukleosidů v moči se jeví nedostatečně selektivní vzhledem k přítomnosti zkřížených reakcí [122]. Za zlatý standard pro tyto analyty jsou dnes považovány metody na bázi chromatografie. Nejčastěji se jedná o metody kapalinové chromatografie, ale v literatuře můžeme najít aplikace i chromatografie plynové [123].

Autoři pro analýzu nukleosidů převážně využívali LC/MS instrumentace v kombinaci s reverzní stacionární fází. Nejčastěji se jednalo o fázi typu C18 [124, 125]. Jako další vhodné sorbenty poskytující vysoce selektivní separace byly prezentovány iontově výměnné [126], Hypercarb [127] či HILIC [122]. Podle našich informací byla HILIC fáze ojediněle použita pro separaci guanosinů v moči autory Hosozumi a kol. [122]. Tento typ chromatografie není všeobecně příliš doporučovaný pro bioanalytické aplikace, a to zvláště kvůli limitacím v oblasti nástřiku, složení mobilní fáze a ustalování rovnováhy v systému.

Nukleosidy jsou malé polární analyty, a proto byly nejčastěji eluovány pomocí vodné mobilní fáze. Ta byla ve většině případů tvořena pufrům octanu či mravenčanu amonného s upraveným pH a v kombinaci s organickým rozpouštědlem typu methanol či acetonitril. V případě metody publikované autory Domijan a kol. [128] byl použit 50 mM fosfátový pufr v kombinaci acetonitrilem a methanolem. Tento typ pufru není vhodný pro detekci MS.

Vzhledem k přítomnosti nízkých hladin nukleosidů v biologickém materiálu byla pro jejich detekci zvolena téměř výhradně tandemová hmotnostní spektrometrie. Publikované metody nejčastěji využívaly jako iontový zdroj elektrosprej. U starších metod byla pak využívána detekce elektrochemická (EC), která neumožňuje separaci izotopově značených vnitřních standardů a interferencí z biologického materiálu. Vysoké koncentrace nukleosidů je také možné detekovat pomocí UV/VIS. Vybrané metody kapalinové chromatografie spolu s jejich separačními podmínkami jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5: Vybrané LC metody použité pro analýzu biomarkerů oxidačního poškození nukleových kyselin.

Analyt	Stacionární fáze	Mobilní fáze	Metoda	Inj (μL)	Limity	Čas (min)	Ref
8OH2dG, IS	HILIC C18 150 × 2,1 mm 3,5 μm	AMAC (10mM) + MeOH	LC-ESI-MS/MS	20	0,05 nM ^a	10	[122]
8OH2dG, 8OHG, další guaniny	Fusion-RP 150 × 2,0 mm 3 μm	AMFO (20mM) + ACN	LC-ESI-MS/MS	20	2 nM ^c	10	[129]
8OH2dG, IS, další nukleosidy	Atlantis C18 100 × 2,1 mm 3 μm	AMAC (2mM, pH 5) + MeOH (AMAC 2mM)	LC-ESI-MS/MS	NA	NA	35	[130]
8OH2dG, IS, dG	Anion exchange 120 × 1,5 mm	H ₂ O (10mM AA) + ACN	LC-ESI-MS/MS	10	0,56 nM ^b	16	[126]
8OH2dG	Microsorb 100 × 5 BDS	KH ₂ PO ₄ (50mM) + ACN + KCl (2mM) + MeOH	LC-EC	20	3 nM ^a	15	[128]
8OH2dG, kreatinin, IS	Zorbax XBD 150 × 4,6 mm 5 μm	AMFO (5mM) + ACN	LC-ESI-MS/MS	40	1,12 nM ^b	3	[131]
8OH2dG, 8OHG, další nukleosidy	Kinetex C18 50 × 3,0 mm 2,6 μm	H ₂ O (0,1% FA) + ACN	LC-ESI-MS/MS	1	8OHG = 63 nM ^a 8OH2dG = 7 nM ^a	6	[132]
8OH2dG, parabeny, BPA, TCS	Atlantis C18 150 × 2,1 mm 5 μm	H ₂ O + MeOH	LC-ESI-MS/MS	10	0,17 nM ^a	18	[125]
8OH2dG, IS	Inertsil ODS 33 × 4,6 mm 5 μm	MeOH (0,1% FA) + ACN (0,1% FA)	LC-ESI-MS/MS	40	1 fM ^a	12	[133]

* inj = množství nastříkovaného vzorku, AMAC = octan amonný, AMFO = mravenčan amonný, ACN = acetonitril, MeOH = methanol, FA = kyselina mravenčí, AA = kyselina octová, LC = HPLC, BPA = bisfenol A, TCS = triklosan, a = LOD, b = LOQ, c = LLOQ

Vzhledem k tomu, že nukleosidy jsou polárního charakteru a jsou vylučovány z lidského organismu výhradně močí, byla většina publikovaných metod soustředěna na analýzu moči. Výjimku tvořilo stanovení v buňkách brzlíku [134], plasmě [133], slinách či dechu [127]. Jako extrakční technika byla nejčastěji zvolena SPE, charakterizována vysokou selektivitou s možností zakoncentrování. Spektrum použitých sorbentů bylo velice široké, od komerčně dostupných fází typu HLB, MCX, ABN či C18 po moderní MIP materiály [118, 135]. Extrakce na pevnou fázi byla pro tuto aplikaci využita jak v konvenčním uspořádání, tak miniaturizovaném (SPME) či on-line. Kvůli nevýhodám SPE jako jsou časová i manuální náročnost se někteří autoři zaměřili na vývoj jednodušších metod typu prosté precipitace proteinů, lyofilizace [127], filtrace [124] či centrifugace [129]. Výhodou manuálně jednodušších technik je zajisté úspora času. Na druhou stranu je zde velké riziko přítomnosti matricových efektů v případě MS detekce. Vybrané extrakční metody a jejich podmínky jsou sepsány v tabulce 6.

Tabulka 6: Metody publikované pro extrakci 8OH2dG a 8OHG.

Analyt	Technika	Matrice	V (μL)	R (%)	Ref
8OH2dG, IS	Filtrace	M	650	99-106	[124]
8OH2dG, IS	SPE: Oasis HLB	M	100	96-102	[122]
8OH2dG, 8OHG, guaniny	Zředění + PP + centrifugace	M	65	96-111	[129]
8OH2dG, nukleosidy	DNA extrakce	TB	NA	93-108	[134]
8OH2dG, IS, 8OH2dG, nukleosidy	SPE: Oasis MCX	M	1000	100 ± 9	[130]
8OH2dG, IS, dG	Zředění + PP + centrifugace	M	50	NA	[126]
8OH2dG	SPE: C8	M	2000	NA	[128]
8OH2dG	On-line SPME	M	10000	80-90	[131]
8OH2dG, IS, kreatinin	On-line SPME	M	100	91	[136]
8OH2dG, 8OH2dG, nukleosidy	Centrifugace + filtrace	M	100	NA	[132]
8OH2dG, 8OHG, 8OH2dG, nukleosidy	SPE: HLB+ABN+ENV	M	NA	74-125	[125]
8OH2dG, parabeny, BPA, TCS	Enzymatická hydrolýza + SPE: C18	M	4000	89-105	[133]
8OH2dG, IS	PP + ME + on-line SPE	P	250	95-106	[118]
8OH2dG, další markery oxidačního stresu	Lyofilizace/24h	D	1000	89-95	[127]

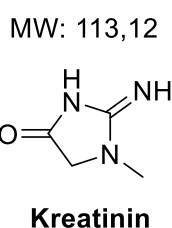
* SPE = extrakce na pevnou fázi, PP = precipitace proteinů, SPME = mikroextrakce na pevné fázi, R = výtěžnost, NA = neanalyzované, dG = deoxyguanosin, ME = membránová extrakce, TB = telecí brzlík, D = dech, M = moč, P = plasma, V = objem vzorku

3.3.4 Kreatinin

Analýza kreatininu může mimo jiné sloužit ke korekci diurézy. Kreatinin je ideální analyt sloužící k tomuto účelu, protože jeho exkrece močí je považována za konstantní. Vyjádření koncentrací analytů v poměru k močovému kreatininu bývá běžně uváděno v klinické praxi.

Chemická struktura

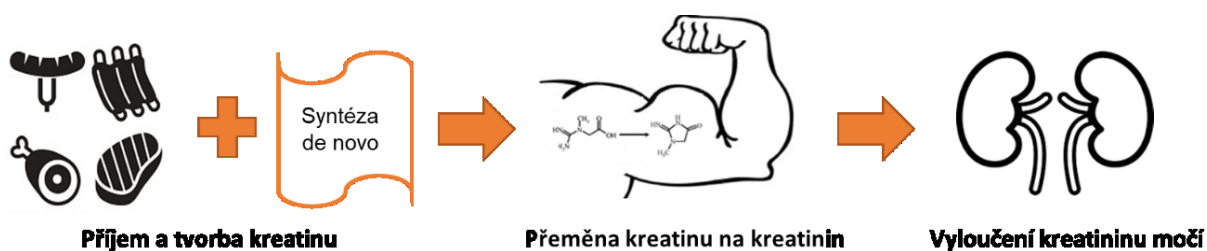
Kreatinin je cyklická dusíkatá organická sloučenina. Konkrétně se jedná o cyklický imid kreatinu (= kyseliny *N*-methylguanidinoctové), který je dobře rozpustný ve vodě. Struktura kreatininu je uvedena na obrázku 24.



Obrázek 24: Struktura kreatininu.

Metabolismus

Kreatinin vzniká jako odpadní produkt metabolismu kreatinu. K přeměně kreatinu na kreatinin dochází ve svalové tkáni jakožto největším úložišti kreatinu v lidském těle. Tato reakce je neenzymatická a nevratná. Později je kreatinin uvolněn ze svalové tkáně do cirkulace odkud vstupuje do parenchymu ledvin a poté do moče [137]. Schematický metabolismus kreatininu je znázorněn na obrázku 25.



Obrázek 25: Metabolismus kreatininu.

Klinický význam a stanovení kreatininu

Kreatinin je nejčastěji používaný jako biomarker ledvinových funkcí. Pokud jsou ledviny plně funkční, dochází v nich k plnohodnotné filtraci cizorodých látek, hladina močového kreatininu je konstantní a hladina sérového kreatininu je relativně nízká. Při ledvinových

onemocněných se schopnost ledvin filtrovat moč zhoršuje a hladina kreatininu v krvi se zvyšuje. Vysoká hladina sérového kreatininu svědčí o zhoršené funkci ledvin.

Jak již bylo zmíněno, koncentrace kreatininu v moči se také využívá ke korekci diurézy. Korekce diurézy je důležitým faktorem při stanovení dalších analytů v moči. Toho se využívá při interpretaci laboratorních výsledků. Praktické využití nachází také jako ukazatel, pokud bylo s močí manipulováno ještě před její analýzou (například naředěním před testy na omamné látky).

Stanovení „Renální clearance kreatininu“ se využívá k vyšetření glomerulární filtrace. Clearance se udává jako poměr mezi hladinou močového a sérového kreatininu vztažený na objem moči. V praxi je největším úskalím tohoto stanovení přesný sběr moči. Správnou interpretaci výsledků poté komplikuje fakt, že při postižení glomerulární filtrace dochází k intenzivnímu vstřebávání kreatininu tubulární sekrecí.

Mezi další využití hladin sérového kreatininu patří „Odhad clearance endogenního kreatininu“. Pro výpočet se využívá věk a hmotnost pacienta vztažená na hladinu sérového kreatininu. Odbornou veřejností je však toto vyšetření považováno za obsoletní a mělo by být nahrazeno „Odhadem glomerulární filtrace MDDR (modification of diet in renal disease)“. Vstupními informacemi tohoto stanovení je opět věk a sérový kreatinin, ale navíc se zde zohledňuje hodnota močoviny a albuminu v séru. Velkou výhodou těchto stanovení v praxi je možnost určení clearance bez sběru moči.

Ke stanovení kreatininu v séru je také možné využít Jaffého reakci známou již od roku 1886. Jedná se o reakci kreatininu a kyseliny pikrové v alkalickém prostředí za vzniku oranžového komplexu. Toto stanovení má spíše historický význam, protože dnes se jedná o metodu nespecifickou s velkou pravděpodobností falešně pozitivních výsledků.

Další skupinou technik sloužících ke stanovení kreatininu jsou metody enzymatické. Ty jsou rutinně využívány v klinické praxi. Principem této metody je přeměna kreatininu na kreatin pomocí enzymu kreatininázy. V porovnání s metodami chromatografickými nedosahují dostatečné specifity pro kreatinin [138].

Hladiny kreatininu je možné stanovit také pomocí chromatografických metod. Mezi jejich výhody patří rychlost, vysoká selektivita a spojení s extrakčními technikami. Právě pomocí extrakčních technik je možné ze vzorku odstranit proteiny a další možné interference. V literatuře najdeme celou řadu LC metod zaměřených na analýzu kreatininu buď samostatně nebo ve směsi dalších analytů [139–141]. Jedná se o metody spojené s UV/VIS nebo MS

detekcí. Porovnání chromatografických, enzymatických a Jaffého metod se věnovali autoři Ou a kol. [138]. V jejich studii byla použita jednoduchá extrakční technika pro vysrážení proteinů a byla vyvinuta nová LC-MS/MS metoda s celkovým časem 3 min. Tato metoda byla následně porovnána s ostatními výše jmenovanými. Porovnání proběhlo celkem na 360 vzorcích lidských sér. Na základě získaných výsledků bylo potvrzeno, že chromatografická analýza poskytuje srovnatelné výsledky s imunoanalýzou i Jaffého metodou. Na rozdíl od Jaffého metody je vysoce selektivní pouze na kreatinin a oproti enzymatickým metodám umožňuje spolehlivou analýzu kreatininu v hyperlipidemických a hemolytických vzorcích.

Všechna tato laboratorní vyšetření kreatininu jsou založená na konstantní exkreci kreatininu močí v průběhu dne a uplatňují se u relativně zdravých jedinců. U osob se zvýšeným příjmem kreatinu v podobně doplňků stravy nebo větším množstvím svalové hmoty dochází ke zvýšené exkreci kreatininu. Naopak při nedostatečném přísunu kreatinu potravou (vegetariáni, vegani) byla zaznamenána nízká hladina kreatininu v moči. Nízkou hladinu kreatininu mají také pacienti s poruchou funkcí jater, protože dochází k omezené tvorbě kreatinu. V takových případech je stanovení kreatininu nepřesným faktorem pro posouzení funkcí ledvin. Při interpretaci laboratorních výsledků je proto nutné brát zřetel na množství svalové hmoty v těle, na které je hladina kreatininu přímo závislá [137, 142, 143].

3.4 Zásady manipulace s vybraným biologickým materiálem

Správná manipulace s biologickým materiálem, jeho transport, skladování a likvidace jsou významné nejen z hlediska prevence přenosu nákaz, ale výrazně ovlivní i laboratorní diagnostiku. Každá z těchto čtyř složek má svá specifika nezbytná pro celkový úspěch laboratorního vyšetření.

Obecné zásady a strategie bezpečnosti práce s biologickým materiálem jsou obsaženy ve Vyhlášce Ministerstva zdravotnictví č. 306/2012 Sb.

3.4.1 Krev

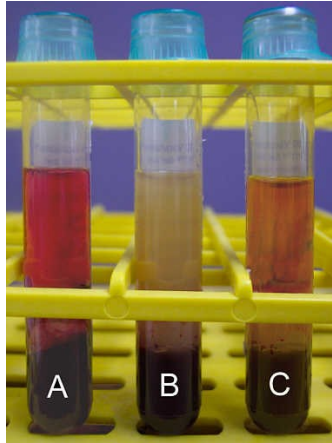
Nejčastěji vyšetřovaný biologický materiál je krev. Krev se podle místa odběru rozlišuje na arteriální, venózní a kapilární. Odběry jsou prováděny nejčastěji ráno na lačno a vždy do předem připravených štítkem označených zkumavek. Na základě požadavků laboratoře jsou při odběru krve zvoleny buď zkumavky s protisrážlivým činidlem pro získání nesrážlivé krve nebo naopak. Do laboratoře by měly být vzorky přepravovány ideálně v uzavřených zkumavkách vložených do stojánku pro bezpečný transport a zamezení znehodnocení vzorku. Po příjmu vzorku laboratoří, je buď krev ponechána jako tzv. plná krev anebo je následným zpracováním získána plasma či sérum.

3.4.1.1 Komplikace vyšetření krve

Jednou z nejčastějších komplikací při laboratorním zpracování krve je hemolýza. V závislosti na stupni hemolýzy je vzorek buď laboratoří odmítnut, nebo jsou výsledky vydané podle naměřeného hemolytického indexu. Aby nedošlo k rozvoji hemolýzy je nutné: vzorek šetrně třepat a zvolit vhodný transport s konstantní teplotou okolního prostředí. Na vzniku hemolýzy se dále může podílet použití jehly znečištěné od desinfekčního prostředku, nedostatečná doba srážení a pozdní dodání do laboratoře.

Mezi další komplikace patří výskyt ikterických a chylózních vzorků. Chylozita i iktericita vzorku jsou viditelné pouhým okem, ale přesnější údaje jsou získány měřením tzv. lipemického a ikterického indexu. Při hodnocení vzorků, jsou laboratorní výsledky uvedeny podle naměřených indexů. Reálné problematické vzorky jsou znázorněny na obrázku 26.

K potencionálnímu ovlivnění laboratorních výsledků může také dojít při použití odběrové zkumavky s gelovým separátem. Výhodou tohoto typu zkumavek je usnadnění práce se vzorkem. Nevýhodou je jejich vyšší cena a možnost vychytávání vybraných analytů na základě chemických a mechanických vlastností gelu [144, 145].



Obrázek 26: Komplikované vzorky krve: A hemolytický, B chylózní, C ikterický (převzato ze zdroje MediaLab Incorporated [146]).

3.4.2 Plodová voda

Plodová voda je získávána invazivním zákrokem s použitím jehly a ultrazvuku, kdy odběr provádí výhradně lékař-gynekolog nejčastěji na pracovišti prenatální diagnostiky. Odběr se provádí pouze u těhotných žen od ukončeného 15. týdne gravidity. Nejedná se o standardní rutinní odběr, ale lékařský zákrok pouze v indikovaných případech. Při zákroku je odebráno cca 5% celkového množství plodové vody tj. 60 ml. Toto množství je v průběhu následujících hodin znovu vytvořeno a doplněno. Pro experimentální účely může být plodová voda odebrána i při porodu.

Vzorky plodové vody lze v některých případech krátkodobě uchovávat při pokojové teplotě, ale nejčastěji je doporučená teplota 2-8°C.

Mezi komplikace laboratorního vyšetření plodové vody patří nejčastěji kontaminace vzorku s krví matky tzv. sangvinolentní voda a nedostatečné množství vzorku [147].

3.4.3 Moč

Moč, jako tekutý biologický materiál vzniká filtrací krve v ledvinových glomerulech. Do moči jsou vylučovány odpadní produkty, tak aby docházelo k udržení homeostázy, acidobazické a elektrolytické rovnováhy v organismu. Moč je složena převážně z vody s malým množstvím močoviny, glukózy a iontů. Obecně lze říci, že složení moči odráží složení krve. V případě, že je daný analyt ve zvýšené koncentraci v krvi, bude při správné funkci ledvin přítomen ve vyšší koncentraci i v moči. Analýzou moči je možné diagnostikovat a monitorovat onemocnění močového traktu a zjistit metabolické či systémové onemocnění organismu.

Rozlišujeme několik typů odebrané moči – první ranní moč, moč získaná v průběhu dne, moč sbíraná v určitém časovém okně a moč získaná pomocí cévkování či suprapubické punkce. Odběr a sběr moči je nejčastěji neinvazivní, tedy šetrný k pacientovi. V případě cévkování je vložen sterilní katetr skrze močovou trubici do močového měchýře. Tento odběr je využíván při neschopnosti pacienta vyloučit moč v daný časový moment. Odběr moči přímo z močového měchýře pomocí jehly je označován jako suprapubická punkce a té se využívá při diagnostice infekce močových cest. U novorozenců a malých dětí je prováděn odběr moči pomocí sterilních, adhezivních, polyethylenových sáčků přilepených okolo genitálií. Tato metoda je technicky jednoduchá, ale poměrně málo spolehlivá a zatížená vysokým procentem kontaminace.

Při hodnocení vzorku první ranní moči není nutné korigovat koncentrace vyloučených analytů, a to díky jejímu zakoncentrování v průběhu noci. Naopak hodnoty analytů v moči odebrané kdykoliv v průběhu dne je vhodné posoudit v poměru k močovému kreatininu.

Odběrové soupravy jsou komerčně vyráběné sterilní zkumavky nebo jednorázové plastové kontejnery (obrázek 27). Podle barvy uzávěru je většinou možné rozlišit, zda se jedná o sterilní (červená zátka) či nesterilní (žlutá zátka) odběrový materiál. Tyto nádoby mají ideálně šroubový uzávěr, který na rozdíl od zátky chrání moč před vylitím a tím vznikem infekčního aerosolu. Pro ochranu fotolabilních analytů jsou využívány tmavě zbarvené nádoby s širokým hrdlem [98, 144].



Obrázek 27: Odběrové nádoby na moč (převzato ze zdroje Gutta Czechia [148]).

3.4.4 Výpotek

Jedná se o vzorek tělní tekutiny odebrané z pleurální či peritoneální oblasti. Odběr vzorku je vždy provázen invazivním chirurgickým výkonem, který by měl být proveden

zkušeným chirurgem. Vyšetření tělních tekutin se nejčastěji využívá v cytodiagnostice. Dále je ve výpotku možné stanovit volné železo, protein, glukózu a cholesterol. Pro bioptické vyšetření je vzorek odeslán ve dvou formách – nativní tekutina v odběrové nádobce a nátěr na sklíčku. Nátěr se vytváří buď z nativní tekutiny nebo sedimentu po centrifugaci a je analogický s nátěrem krve.

Tento typ materiálu se nedoporučuje skladovat a je určen k přímé analýze. Pro transport do laboratoře, který by měl trvat maximálně 15 minut je doporučená teplota 20-25°C.

Komplikací laboratorního stanovení je nejčastěji malé množství vzorku a jeho kontaminace v důsledku zhmoždění tkáně při nešetrném odběru punkcí [149].

3.4.5 Exsudát z rány

Vzorek rány se nejčastěji odebírá pomocí stěru či výtěru sterilním tampónem z postiženého místa. Pro experimentální účely je k vyšetření možné využít i část krycího materiálu. V přítomnosti většího množství sekretu, krve či hnisu je možné jej odebrat do stříkačky. Odběr je lépe provádět z hlubších partií defektu a v případě krusty provést incizi či punkci rány. Při odběru vzorku je nutné ránu zhodnotit i pouhým okem, a to její velikost, zbarvení, pach a množství sekrece. Suchá zmenšující se rána bývá znakem hojení.

Nejčastěji se vzorky ran odebírají pro mikrobiologické vyšetření, identifikaci patogenů a zjištění citlivosti na antibiotika. Pro mikrobiologické vyšetření jsou vhodné hluboké dekubity, rány po onkologické operaci a dlouhodobě špatně se hojících rány (obrázek 28). Transport vzorků do laboratoře je doporučen nejdéle do 2 hodin.



Obrázek 28: Špatně hojící se rána s krytím (převzato ze zdroje Pharmcare CZ [150]).

3.4.6 Zásady správného transportu biologických vzorků

S každým vzorkem biologického materiálu je nutné zacházet jako s potenciálně infekčním materiálem. Transport všech vzorků do laboratoře musí být dostatečně rychlý a odpovídat stanoveným podmínkám v Laboratorní příručce. Kapalně vzorky by měly být přepravovány v kolmé poloze a uzavřených odběrových nádobkách ideálně umístěných ve stojánku odděleně od žádanek. Tento stojánek musí být umístěn bezpečně v termoboxu, aby během přepravy vzorku do laboratoře nemohlo dojít k rozlití, kontaminaci, potřísnění nebo jinému znehodnocení vzorku. Teplota v termoboxu je monitorována a průběžně zaznamenávána.


3.4.7 Důvody pro odmítnutí vzorů laboratoří

Pokud je do laboratoře dopraven neoznačený nebo neúplně označený, potřísněný či vylitý vzorek, laboratoř má právo vzorek odmítnout. Dále má laboratoř právo odmítnout vzorky – s neúplným popisem požadováno vyšetření, dodané mimo určený časový interval, s nedostatečným množstvím materiálu, dodané v nevhodné odběrové nádobce. V závažných případech může být vyšetřen materiál dodaný do laboratoře v nevhodné nádobce, ale pouze po předchozí domluvě s lékařem a na jeho zodpovědnost [144, 145]. Důvody, které vedou k odmítnutí nebo předčasné likvidaci biologických vzorků laboratoří jsou vyobrazeny na obrázku 29. V případě likvidace biologického materiálu musí být proces vykonán v souladu s předpisy a musí o něm být proveden zápis do interní laboratorní knihy záznamů o neshodě (obrázek 30).



Obrázek 29: Důvody pro odmítnutí vzorku laboratoří.

Výzkumná laboratoř III. interní gerontometabolické kliniky FN HK



Název dokumentu:

KNIHA ZÁZNAMŮ O NESHODĚ

vedena od: platnost do:

počet stran:

Každý zaměstnanec odpovídá za to, že pracuje s platnou verzí dokumentu.
Pořízené kopie jsou pouze informativní!

5 – 66 – SM 003 Strana 1 (celkem 25)

Výzkumná laboratoř III. interní gerontometabolické kliniky FN HK

Záznam o neshodě

Datum a čas:		Kód neshody:
Kód oddělení:	Jednáno s - jméno: Telefon:	
Druh biologického materiálu (zaškrtněte):	Krev - K3EDTA	Krev - oltrát
	Apokrinní pot	Plazma
	Krev - heparin	Sérum
	Jiné (uveďte):	Moč

Důvod neshody (označte křížkem příslušný čtvereček, popř. doplňte komentář*):

1) Neshoda v označení materiálu a žádanky
Krev: Jméno a RČ:
Žádanka: Jméno a RČ:

2) Nedodaný materiál Nedodaná žádanka
Jméno a RČ:

3) Nesprávný odběr
Jméno a RČ:

5) Znehodnoceno při transportu
Jméno a RČ:

6) Nedodržení časového intervalu mezi odběrem a dodáním materiálu do laboratoře
Jméno a RČ:

7) Jiné (uveďte)

* Komentář:

Odesláno zpět poštovní poštou: <input type="checkbox"/> Číslo:	Odesláno zpět po sanitě: <input type="checkbox"/>	Z oddělení zašlou novou žádanku: <input type="checkbox"/> Z oddělení zašlou novou zkumavku: <input type="checkbox"/>
---	---	---

V laboratoři řešil a zapsal: Datum:

zatrhněte

5 – 66 – SM 003 Strana 10 (celkem 25)

Obrázek 30: Příklad laboratorní knihy záznamů o neshodě (převzato z FNHK).

3.5 Vybrané validační parametry v bioanalýze

Validace je sled úkonů sloužících k ověření charakteristiky analytické metody pro zamýšlené použití. O validaci musí být poskytnut validační protokol. Ten formou záznamů prokáže, jestli testovaná metoda trvale poskytuje reprodukovatelné a spolehlivé výsledky s vysokou mírou jistoty. Dále je jejím cílem obeznámit se s praktickými limitacemi metody a zjistit, zda je zkušební postup použitelný i za mírně odlišných podmínek (například v jiné laboratoři). Validací prochází nově vyvinuté metody, nově pořízené přístroje, modifikované metody, přenesené metody a metody, u kterých byl zaznamenán problém v analytickém systému. Ve vybraných případech není nutné provádět validaci kompletní a postačí pouze revalidace. To se děje například při malé změně v analytickém postupu.

Procesu validace jsou podrobeny všechny analytické procedury jak z oblasti farmaceutické a rutinní analýzy tak bioanalýzy. Celkem je dostupné široké spektrum validačních norem například International Conference on Harmonization (ICH), A Focus for Analytical Chemistry in Europe (Eurachem), International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), European Pharmacopoeia (PhEur.), United States Pharmacopeia (USP), Český lékopis (ČL), European Medicines Agency (EMA), United States Food and Drug Administration (FDA) a Státní úřad pro kontrolu léčiv (SÚKL). Vždy je nutné vybrat nejvhodnější validační postup pro danou oblast [151]. V bioanalýze jsou nejčastěji využívány validační normy EMA [152] a FDA [153].

3.5.1 Test způsobilosti chromatografického systému

Test způsobilosti chromatografického systému (System Suitability Test, SST) prověří schopnost použitého přístrojového vybavení dosáhnout požadovaných výsledků. Tento test se provádí s použitím standardních roztoků nebo referenčního materiálu v koncentračním okně, které je blízké reálným vzorkům. V případě chromatografické analýzy slouží ke zhodnocení přiměřené účinnosti sestavy. Mezi faktory, které ovlivňují SST, patří složení, iontová síla, průtok, teplota a pH mobilní fáze, rozměry chromatografické kolony a stacionární fáze, teplota a tlak na koloně. Problematice SST se EMA nevěnuje. Podle norem FDA je doporučeno jeho provedení na začátku měření velkých sérií vzorků bez bližších specifikací [152, 153].

Tento test může zahrnovat následující parametry: kapacitní faktor (definice retence analytů), opakovatelnost nástřiku, symetrie píku a účinnost chromatografického systému.

3.5.2 Přesnost a opakovatelnost

Přesnost (Precision, Accuracy) je ve validačních normách často uváděna také jako opakovatelnost (Repeatability). Rozlišujeme, zda se jedná o opakovatelnost nástřiku nebo opakovatelnost extrakce.

V případě testování opakovatelnosti nástřiku je obecně doporučeno 10 x po sobě nastříknout do chromatografického systému roztok standardu, referenčního materiálu nebo případně biologického extraktu. Výsledky jsou vyjádřeny jako relativní směrodatná odchylka (RSD) všech měření. Požadavky na opakovatelnost nástřiku nejsou blíže specifikovány ani v EMA ani v FDA normách.

Při testování opakovatelnost extrakce je doporučeno extrahovat jedním analytikem v jeden čas ve stejné laboratoři totožný biologický vzorek. Koncentrační úrovně by měly být rovnoměrně rozloženy v celém okně očekávaných hladin u reálných vzorků. Výsledky jsou vyjádřeny jako variační koeficient všech měření. Norma FDA [153] uvádí, že by mělo být testováno alespoň pět vzorků na třech koncentračních úrovních a výsledky by se měly pohybovat v rozmezí $\pm 20\%$, s výjimkou extrémně nízkých hladin, kde je povoleno $\pm 25\%$. Podle normy EMA [152] by mělo být provedeno měření na čtyřech koncentračních úrovních a výsledky by se měly pohybovat v rozmezí $\pm 15-20\%$.

Jako další validační parametr je možné mezi sebou jednotlivé testy opakovatelnosti extrakce porovnat. Využívá se například porovnání opakovatelnosti extrakce mezi dvěma analytiky (inter-person repeatability), v rámci jedné analýzy (within-run accuracy), v rámci několika analýz (between-run accuracy), v průběhu jednoho dne (intra-day repeatability), v průběhu několika dní (inter-day repeatability) a v rámci několika laboratoří (inter-laboratory repeatability).

3.5.3 Selektivita a matricový efekt

Selektivita (Selectivity) je schopnost dané metody správně změřit a rozlišit stanovované analyty a vnitřní standard od ostatních látek různého původu a interferencí. Interference mohou zahrnovat například metabolity, rozkladné produkty a léčiva. Selektivitu je možné vyjádřit jako rozdíl mezi výsledky získanými analýzou pouze cílových analytů a analýzou komplexní matrice. Dle normy EMA [152] by pro určení selektivity měla být provedena analýza alespoň šesti různých vzorků dané matrice.

V rámci hodnocení selektivity zahrnuje FDA norma [153] také stanovení matricového efektu (Matrix Effect, ME). Matricový efekt by se měl podle této směrnice zhodnotit

porovnáním kalibračních křivek v biologickém a nebiologickém mediu, dále porovnáním výsledků měření naředěných biologických vzorků a standardních roztoků. Norma EMA [152] považuje stanovení matricového efektu za jeden z klíčových validačních parametrů při použití MS detekce. Je zde doporučeno využít k měření alespoň šest vzorků stejné matrice od různých dárců a provést porovnání výsledků s roztoky standardů. K výpočtu lze například využít i Matuszewskiho rovnici [154] viz obrázek 31. Člen „A“ v této rovnici zastupuje koncentraci analytu v roztoku standardu a člen „B“ koncentraci analytu v biologickém materiálu spikovaném po extrakci. Pokud se při analýze vzorků neprojeví matricový efekt větší než $\pm 15\%$, je toto považováno za vyhovující.

$$ME (\%) = 100 - \frac{B}{A} * 100$$

Obrázek 31: Matuszewskiho rovnice (převzato z Matuszewski a kol [154] a upraveno).

3.5.4 Linearita a limity metody

Linearita je schopnost analytické metody poskytovat správné hodnoty a výsledky analytů v určitém předem definovaném koncentračním rozsahu. Je vyjádřena kalibrační přímkou, která odpovídá závislosti odezvy detektoru na koncentraci analytu. Ta by měla být provedená metodou standardního přídavku roztoku standardu do biologickém materiálu a její koncentrační rozmezí by mělo odpovídat reálným vzorkům. V případě nedostupnosti blankové matrice je možné využít standardních roztoků nebo uměle vyrobené matrice. Kalibrační přímkou by mělo tvořit šest až osm koncentračních bodů, měřených v duplikátu včetně bodu odpovídajícím hodnotě nejnižšího limitu kvantifikace (LLOQ) s variačním koeficientem (CV) $\pm 25\%$ a nejvyššího limitu kvantifikace (ULOQ) s CV $\pm 20\%$. Těsnost jednotlivých bodů je vyjádřena korelačním koeficientem (R), jehož hodnota by se v ideálním případě měla blížit + 1. Všechny změřené hodnoty analytů použitých v kalibrační přímce by měly být v rozmezí $\pm 15-20\%$ v porovnání s teoretickými vypočítanými koncentracemi.

Limit detekce (Limit of Detection, LOD) není v normě FDA [153] ani EMA [152] zahrnut. Často je jeho hodnota považován za nevypovídající. V dalších normách, které nejsou specificky zaměřené na oblast bioanalýzy je uváděno, že hodnota LOD odpovídá 3 x poměru signál/šum.

Nejnižší limit kvantifikace (Lower Limit of Quantification, LLOQ) je shodně v obou normách FDA [153] i EMA [152] uváděn jako 5 x hodnota signál/šum a zároveň nejnižší

koncentrace analytu ve vzorku, která může být s jistotou a přesností kvantifikována. Jeho hodnota by měla být opakovatelná v rámci rozmezí $\pm 20\%$.

3.5.5 Stabilita

Stabilitní studie mohou být zaměřeny na mnoho různých faktorů – stabilita roztoků standardu, stabilita analytů v biologickém materiálu, stabilita analytů v jednotlivých fázích extrakce, stabilita finálního extraktu skladovaného po delší čas v autosampleru a další. Na stabilitu mají vliv chemické vlastnosti analytu a matrice, podmínky skladování a nádoby k tomu použité. Obě normy EMA [152] i FDA [153] požadují, aby podmínky stabilitní studie simulovaly podmínky zacházení a skladování s reálným vzorkem. Studie by měla zahrnovat hodnocení stability standardů i jejich pracovních roztoků, analytů v matrici, která byla vystavena několikanásobnému zmrazení a rozmrazení, analytů v průběhu jejich zpracování a při dlouhodobém skladování. Vždy by hodnoty analytů ve stabilitní studii měly být posuzovány s ohledem na hodnoty získané analýzou čerstvě připravených roztoků. Není možné extrapolovat výsledky ze stabilitní studie v jednom typu biologického materiálu na druhý.

3.5.6 Robustnost

Robustnost (Robustness, Ruggedness) je míra schopnosti dané metody produkovat přesné a správné výsledky i při menších změnách pracovních podmínek. Přestože tento parametr nepatří mezi požadované dle norem FDA [153] ani EMA [152], je velice užitečné z praktického hlediska znát úskalí a limitace používané metody. Mezi testované parametry mohou patřit změny ve složení a pH mobilní fáze, průtoku, teplotě na koloně, obsluze či umístění přístroje. Parametry volí odpovědný analytik, tak aby odpovídaly reálným změnám. Ideálně je testováno pět různých parametrů v nastavení metody [151].

4 KOMENTÁŘE K PUBLIKOVANÝM VÝSTUPŮM

V této části práce jsou uvedeny a komentovány analytické a biomedicínské práce publikované v mezinárodních časopisech s impakt faktorem v rámci postgraduálního studia autorky. Komentáře jsou rozděleny do dvou částí podle zaměření publikovaných prací. První kapitola se zabývá analytickou tematikou a je v ní popsána HPLC metoda pro stanovení časných biomarkerů zánětu, UHPLC metoda pro stanovení biomarkerů oxidačního poškození nukleových kyselin a UHPLC metoda pro stanovení lipofilních vitamínů včetně souhrnného článku. Ve druhé kapitole jsou komentovány práce s biomedicínskou tematikou zaměřené na studium vztahu mezi léčbou vybraných očních onemocnění a hladinou lipofilních vitamínů a dále na analýzu biomarkerů zánětu u onkologických onemocnění.

4.1 Komentáře k publikovaným pracím s analytickou tematikou

4.1.1 Stanovení biomarkerů oxidačního poškození DNA a RNA v moči

PŘÍLOHA 1: ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ, V. ŠESTÁKOVÁ, D. SOLICHOVÁ a P. SOLICH. A fully validated bioanalytical method using an UHPLC–MS/MS system for quantification of DNA and RNA oxidative stress biomarkers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2017, roč. 409, č. 14, s. 3611–3621. (IF₂₀₁₆ = 3,431)

4.1.1.1 Úvod

Modifikované nukleosidy, vzniklé poškozením nukleových kyselin volnými radikály, mohou sloužit jako kvalitní biomarkery oxidačního poškození. Tyto nukleosidy jsou později vylučovány do moči, kde mohou být stanoveny. V případě analýzy moči je více než vhodné současně určit i hodnotu kreatininu kvůli její zředovací schopnosti. V minulosti bylo prezentováno mnoho metod zaměřených na analýzu těchto biomarkerů nejčastěji pomocí UHPLC-MS/MS. Větší pozornost byla věnována biomarkeru poškození DNA – 8OH2dG. Současné stanovení biomarkerů poškození DNA i RNA může sloužit jako odraz oxidačního poškození v celém organismu. Analýza těchto biomarkerů má nejčastěji prognostický význam u onkologických a neurodegenerativních onemocnění.

Cílem této práce bylo vyvinout novou rychlou UHPLC metodu s citlivou MS/MS detekcí pro simultánní stanovení 8OH2dG, 8OHG a kreatininu v moči s využitím izotopově značeného vnitřního standardu. Nová metoda měla splňovat nároky na nízkou zátěž vůči pacientovi i životnímu prostředí a vhodnost použití v klinickém výzkumu a praxi.

4.1.1.2 Výsledky a diskuze

Úprava vzorku před analýzou

Moč byla poskytnuta pacienty hospitalizovanými ve FNHK v souladu s etickým protokolem. Získané vzorky byly okamžitě zamrazeny (-20°C) a analyzovány v čase potřeby.

V průběhu vývoje extrakční metody byl testován způsob úpravy vzorku pomocí jednoduché precipitace proteinů a extrakce na pevnou fázi. Při srážení bílkovin bylo využito různých organických rozpouštědel, tepelných podmínek i komplexotvorných kovů. Pomocí této jednoduché a rychlé techniky nebyly odstraněny balasty ze vzorku v dostatečné míře, a proto byla dále testována jiná extrakční metoda a to SPE. V rámci ní byly porovnávány různé

sorbenty (LiChrolut® EN, Speed™ Flow ABN, Oasis MCX a Oasis HLB), množství a pH vzorku i použitých rozpouštědel. Vhodným výběrem sorbentu a optimalizací postupu byly získány následující extrakční podmínky:

- Objem vzorku: 500 µl moči
- SPE fáze: Oasis HLB (200 mg, 6 ml, C18)
- Aktivace a kondicionace sorbentu: 1 ml MeOH a 1 ml H₂O
- Promývací roztok: 1 ml H₂O
- Eluční roztok: 1,6 ml MeOH + H₂O (50:50)
- Odpaření supernatantu: pod vakuem (za sníženého tlaku) při 60°C
- Zpracování odparku: rozpuštění v 250 µl H₂O s následnou filtrací

LC analýza

Analýza kreatininu, 8OH2dG, 8OHG a vnitřního standardu (¹⁵N5-8OH2dG) byla provedena pomocí systému UHPLC set Nexera s UV/VIS a tandemovou hmotnostní detekcí LC-MS 8030 (Shimadzu, Japonsko).

Podmínky analýzy:

- Mobilní fáze: H₂O (pH 3) + MeOH (0,2 mM FA), poměr 90:10 (v/v)
- Průtok mobilní fáze: 0,5 ml/min
- Stacionární fáze: Meteoric Core C18 BIO 4,6 × 50 mm, 2,7 µm (YMC, Německo)
- Teplota kolony: 25°C
- Objem nástřiku: 4 µl
- Ionizační zdroj: ESI+
- Podmínky detekce (MRM) pro 8OH2dG a IS: 284 > 167 > 140 > 112
- Podmínky detekce (MRM) pro 8OH2G: 300 > 167 > 130
- Podmínky detekce (UV/VIS) pro kreatinin: 235 nm
- Celkový čas analýzy: 3,2 min

Validace metody

Nově vyvinutá metoda byla validována podle norem EMA a FDA, speciálně určených pro validace v oblasti bioanalýzy.

V rámci validace metody byly hodnoceny následující parametry:

- Test vhodnosti analytického systému (SST)

Na základě výsledků uvedených v tabulce 8 bylo použití vybraného systému vyhodnoceno jako vhodné pro zmíněnou metodu.

Tabulka 8: Výsledky SST metody.

Parametry	Kreatinin	8OHG	8OH2dG
R	NA	5,24	
N	1196	3045	5960
HETP (mm)	0,042	0,016	0,008
T	0,97	1,03	1,07

* NA = neanalyzováno

- Linearita

Linearita byla vyhodnocena pomocí kalibrační přímky, analýzou standardních roztoků ve vodě na osmi koncentračních úrovních. Kalibrační křivka byla vytvořena v rozmezí 6-2000 nM pro 8OH2dG, 28-6000 nM pro 8OHG a 0,2-50 mM pro kreatinin.

- Výtěžnost

Výtěžnost extrakce byla hodnocena pomocí analýzy reálných vzorků před a po přidání standardních roztoků o různých koncentracích. Výtěžnost byla stanovena v rozmezí od 86 do 109% pro všechny analyty, a tudíž nepřekročila limit $100 \pm 15\%$.

- Opakovatelnost/přesnost

Opakovatelnost metody zahrnovala stanovení opakovatelnosti nástřiku a opakovatelnosti extrakce vyjádřené jako relativní směrodatná odchylka (RSD) plochy píku. Přesnost nástřiku v sérii nepřesáhla RSD 1,4% a extrakce nepřekročila RSD 9%.

- Limity

Limit detekce (LOD), nejnižší detekovatelné ale ne kvantifikovatelné množství analytu ve vzorku, byl vyhodnocen jako trojnásobek poměru signálu k šumu a odpovídal hodnotám 3,60 nM pro 8OH2dG, 16,69 nM pro 8OHG a 6,36 nM pro kreatinin. Nejnižší limit kvantifikace (LLOQ), nejnižší kvantifikovatelné množství analytu ve vzorku, byl vyhodnocen jako pětinašobek poměru signálu k šumu a odpovídal hodnotám 6,00 μM pro 8OH2dG, 27,77 μM pro 8OHG a 10,60 μM pro kreatinin.

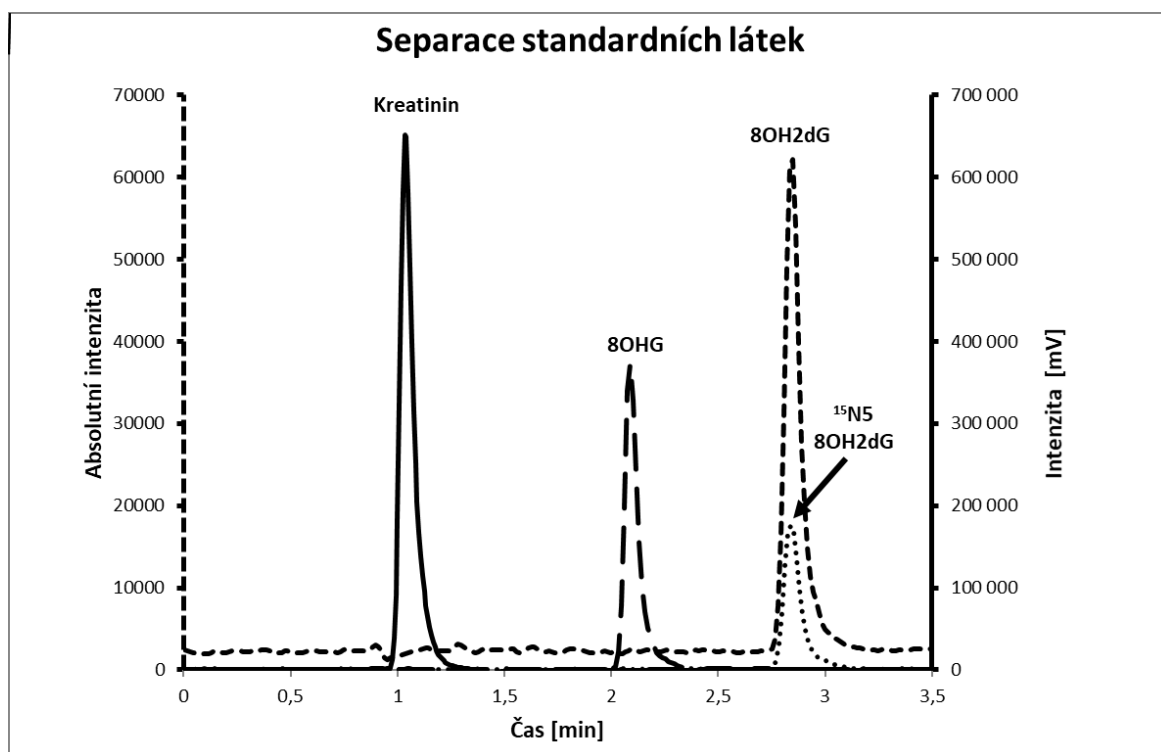
- Robustnost

Robustnost metody byla testována pomocí změny poměrů v mobilní fázi, teploty v kolonovém termostatu, pH vodné složky mobilní fáze a koncentrace kyseliny mravenčí v methanolu. Výsledky ukázaly, že zásadní vliv na separaci a intenzitu píků má pH vodné složky a její poměr s organickým rozpouštědlem v mobilní fázi. Naopak změna teploty kolonového

termostatu (23 a 25°C) ani množství kyseliny mravenčí v methanolu (0,1 a 0,2 mM) nijak výrazně metodu neovlivnily.

- **Selektivita**

Schopnost metody rozlišit cílové analyty od balastů a interferencí vyskytujících se v biologickém materiálu byla ověřena pomocí analýzy různých reálných vzorků lidské moči. Rozlišení jednotlivých píků analytů je možné vidět v chromatogramu na obrázku 32.



Obrázek 32: 8OH2dG $T_R = 2,9$ min, $c = 0,05 \mu\text{M}$, $^{15}\text{N5-8OH2dG (IS)}$ $T_R = 2,9$ min, $c = 0,2 \mu\text{M}$, 8OHG $T_R = 2,1$ min, $c = 5 \mu\text{M}$, kreatinin $T_R = 1,1$ min, $c = 8 \text{ mM}$. Detekce: kreatinin UV 235 nm, ostatní analyty MS/MS.

- **Matricový efekt**

Matricový efekt biologického vzorku při ESI+ ionizaci byl hodnocen pomocí Matuszewskiho rovnice. Testování bylo podrobena celkem šest vzorků lidské moči různé etiologie na dvou koncentračních úrovních. Efekt matrice nepřekročil stanovený limit $100 \pm 15\%$.

- **Stabilita**

V rámci validace byla stanovena stabilita konečných extraktů v průběhu 48 h při 4°C a stabilita odparků v průběhu 14 dní při 4 a -20°C. Na základě výsledků bylo potvrzeno, že

konečné extrakty je možné skladovat alespoň po dobu 48 h a odparky by měly být zpracovány okamžitě po jejich získání.

Využití metody v analýze reálných vzorků

Pro ověření použitelnosti vyvinuté metody v klinickém výzkumu byla provedena analýza celkem 30 vzorků lidských močí. Testované moče zahrnovaly vzorky od mužů i žen včetně zdravých dobrovolníků i onkologických pacientů. Přestože je nutné tyto výsledky potvrdit provedením klinické studie, na základě námi získaných dat bylo zjištěno, že vyšší hladiny biomarkerů oxidačního poškození se vyskytují u onkologických pacientů v porovnání se zdravou populací.

4.1.1.3 Závěr

V rámci této studie byla vyvinuta nová UHPLC-UV-MS/MS metoda pro stanovení 8OH2dG, 8OHG a kreatininu v lidské moči. Zvolená stacionární fáze s technologií core-shell a většími póry poskytla účinnou a rychlou separaci cílových analytů včetně vnitřního standardu v čase 3,2 min. Hmotnostní detekce se třemi MRM přechody pro 8OH2dG a dvěma pro 8OHG umožnila citlivé stanovení vybraných analytů v biologickém materiálu. Jako technika úpravy vzorku byla zvolena selektivní extrakce na pevnou fázi s HLB sorbentem. Celá metoda byla plně validována podle bioanalytických norem a použita pro analýzu klinických vzorků.

V porovnání s literaturou nabízí tato prezentovaná metoda rychlou analýzu biomarkerů oxidačního poškození obou druhů nukleových kyselin, DNA a RNA, v kombinaci se simultánním stanovením kreatininu, nutným ke korekci zředovací schopnosti moče.

4.1.2 Význam a možnosti stanovení vitamínu E v biologickém materiálu

PŘÍLOHA 2: ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ, D. SOLICHOVÁ, B. MELICHAR a P. SOLICH. Recent advances in the determination of tocopherols in biological fluids: from sample pretreatment and liquid chromatography to clinical studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016, roč. 408, č. 10, s. 2407–2424. (IF₂₀₁₆ = 3,431)

4.1.2.1 Úvod

Vitamín E byl objeven mezi prvními vitamíny již v roce 1922 a zahrnuje dvě skupiny látek – tokoferoly a tokotrienoly. Obě skupiny jsou tvořeny čtyřmi analogy označovanými jako α , β , γ a δ . Biologický význam všech izoform nebyl doposud zcela objasněn. Prostudovanější je skupina tokoferolů, zvláště α -tokoferol. Tento analog má v lidském těle specifický transportní protein (α -TTP) a jeho biologická dostupnost je vyšší proti zbylým analogům. Vitamín E patří mezi významné antioxidanty v lipidovém prostředí, který brání oxidaci LDL cholesterolu, chrání buňky před působením volných radikálů a vylučuje škodlivé nitroso sloučenin z potravy.

Na vztah mezi vitamínem E a celou řadou onemocnění bylo v minulosti i teď soustředěno velké množství klinických studií. U neurodegenerativních poruch, jako je například Alzheimerova choroba, nebyla prokázána žádná souvislost s hladinami vitamínu E. V případě kardiovaskulárních poruch bylo při krátkodobé suplementaci zaznamenáno snížení rizika vzniku ischemické choroby srdeční a dále kardioprotektivní efekt u úzké skupiny pacientů na hemodialýze a s diabetem genotypu haptoglobin 2-2. Obecný fakt, že by vitamín E chránil před vznikem nádorových onemocnění, byl v minulosti několikrát vyvrácen. Naopak byl v literatuře popsán význam jednotlivých derivátů u specifických maligních onemocnění například inhibice vzniku nádorů prsu pomocí δ -tokoferolu, snížení úmrtnosti při rakovině močového měchýře pomocí α -tokoferolu nebo inhibice karcinogeneze plic a střev pomocí γ -tokoferolu. Suplementace vitamínem E je doporučována zvláště u kuřáků, kde bylo prokázáno snížení rizika vzniku a úmrtnosti při maligním onemocnění prostaty a plic.

4.1.2.2 Možnosti stanovení tokoferolů

Stanovení tokoferolů není žádnou novinkou na poli analytické chemie. Studie se v minulosti soustředily nejčastěji na stanovení α -tokoferolu, popřípadě v kombinaci

s γ -tokoferolem. Vzhledem ke zvýšenému zájmu o studium dalších derivátů, byla největší komplikací separace strukturních izomerů β a γ .

Metody kapalinové chromatografie

Mezi metody první volby patří kapalinová chromatografie. V literatuře jsou popsány metody využívající HPLC i UHPLC systémy. Úplné separace bylo dosaženo v minulosti s použitím normální fáze. Ta byla postupem času, kvůli svým nedostatkům nahrazena fází reverzní. S použitím nejčastěji dostupné C18 fáze nebylo dosaženo separace strukturních izomerů ani v případě kombinace s UHPLC systémem a novými technologiemi kolon (monolit) či částic (core-shell). V roce 2012 byla autory Grebenstein a kol. [70] publikována první HPLC metoda zaměřená na separaci všech derivátů v čase 14 min. Jako detekční systémy se nejčastěji využívají fluorescenční detektory, které jsou dostatečně citlivé k hladinám analytů v biologickém materiálu a zároveň nejsou finančně náročné. Pro tuto aplikaci mohou být dále využity detektory hmotností, UV/VIS, elektrochemické a ELSD (Evaporative Light Scattering Detector).

Metody úpravy biologického materiálu

Stanovení tokoferolů bylo publikováno v širokém spektru biologického materiálu od krve až po kolostrum či erytrocyty. Tokoferoly se v biologickém materiálu vyskytují navázané na další buněčné struktury, a proto je před jejich extrakcí vhodné tuto vazbu rozrušit například pomocí precipitace proteinů či saponifikace. Nejčastěji se využívá krok odstranění proteinů, a to pomocí organických rozpouštědel typu methanol, ethyl acetát či acetonitril. Tento proces je možné podpořit ještě intenzivním třepáním, nízkou teplotou, ledovou lázní či ultrazvukem. Naopak saponifikace by měla být využívána pouze v případě komplexních matric jako je plodová voda, mateřské mléko či krvinky. Vzhledem k tomu, že saponifikace zahrnuje použití roztoku hydroxidu draselného a vysokých teplot (60-80°C), které ohrožují stabilitu tokoferolů, není nutné ji využívat v případě extrakce ze séra, moči či plazmy. Mezi další možnosti obohacení extrakce tokoferolů patří přidavek dalších antioxidantů či vnitřních standardů. Antioxidanty se výlučně využívají v případě saponifikace, aby zvýšili ochranu cílových analytů. Použití vnitřního standardu je naopak vhodné v případě více krokových extrakcí typu SPE či LLE. Jako vnitřní standard může být použit tokol, tokoferol acetát či xanthophyl.

Technikou volby extrakce tokoferolů z biologického materiálu je LLE. Principem je extrakce analytů do nepolárního rozpouštědla, které je později odpařeno, a odparek je rozpuštěn ideálně v mobilní fázi. Mezi její největší nevýhody patří velké spotřeby vzorků i

organických rozpouštědel, což se neslučuje s nároky na moderní extrakční techniky. V literatuře proto dnes najdeme miniaturizované metody, které využívají 20- 200 µl biologického materiálu a 0,5-2 ml organického činidla. Jako extrakční činidlo je v LLE téměř výlučně využíván hexan.

Druhou nejčastěji využívanou extrakční technikou je SPE. Tento typ extrakce v klasickém uspořádání neposkytuje pro extrakci tokoferolů z biologického materiálu žádné výhody oproti LLE, protože se jedná o techniku finančně, manuálně i přístrojově náročnější. Výhodná je její miniaturizace, automatizace a využití moderních přístupů. Miniaturizovaná SPE nabízí možnost zpracování velkých sérií vzorků se současnou nízkou spotřebou vzorků i rozpouštědel. Využití on-line extrakce na pevnou fázi minimalizuje manuální náročnost i čas extrakce.

4.1.2.3 Závěr

Vitamín E, přestože je znám již přes devadesát let, stále nebyl plně prozkoumán a stejně tak jeho role či suplementace v organismu. Dodnes bylo provedeno mnoho klinických studií, zabývajících se jeho vlivem na celou řadu onemocnění, které neposkytly jednoznačný závěr. Momentálně se ukazuje, že důležitější roli v případě onkologických onemocnění mají pravděpodobně jiné deriváty tokoferolu než α , jak se dříve předpokládalo. Z výsledků studií vyplývá pozitivní vliv suplementace vitamínem E u kuřáků, kde prokazatelně snižuje riziko vzniku nádorových onemocnění.

V případě analýzy vitamínu E v biologickém materiálu je upřednostňována metoda kapalinové chromatografie v kombinaci s fluorescenční detekcí. Úplné separace všech derivátů vitamínu E je možné dosáhnout s použitím normální stacionární fáze či fluorované reverzní fáze. Jako extrakční technika je nejčastěji využívána LLE, ideálně v miniaturizovaném provedení. Vitamín E je možné stanovit v široké škále biologického materiálu jako je krev, moč, plodová voda, erytrocyty, mozkomíšní mok a další.

4.1.3 Stanovení lipofilních vitamínů v séru

PŘÍLOHA 3: ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ, S. KLABAČKOVÁ, D. SOLICHOVÁ a P. SOLICH. Rapid determination of lipophilic vitamins in human serum by ultra-high-performance liquid chromatography using a fluorinated column and a high throughput miniaturized liquid-liquid extraction. Journal of Separation Science. Přijato k publikování 06/2017. (IF₂₀₁₆ = 2,557)

4.1.3.1 Úvod

Cílem této práce bylo vyvinout novou rychlou UHPLC metodu s citlivou fluorescenční detekcí pro simultánní stanovení retinolu a všech izoform tokoferolu v lidském séru s využitím vnitřního standardu. Při vývoji metody pro úpravu vzorku bylo vycházeno z podmínek publikace Urbánek a kol. [58] zaměřené na extrakci retinolu a α -tokoferolu ze séra. Cílem modifikace a miniaturizace této metody bylo extrahovat více analytů v kratším čase, vyžít vnitřní standard (tokol) a menší objemy organických rozpouštědel, tak aby metoda byla vhodná pro zpracování větších sérií vzorků a méně zatěžovala životní prostředí.

4.1.3.2 Výsledky a diskuze

Úprava vzorku před analýzou

Vzorky krve byly poskytnuty od pacientů hospitalizovaných ve FNHK a zdravých dárců v souladu s etickým protokolem. Získaná krev byla za účelem separace krevního séra centrifugována (1600 g/10 min/4°C). Sérum bylo poté okamžitě zamrazeno (-20°C) a analyzováno v čase potřeby.

V průběhu vývoje metody pro úpravu vzorku byly sledovány různé parametry extrakce z kapaliny do kapaliny. Byl testován vliv deproteinace, miniaturizace, intenzita a doba třepání, množství vzorku a organického rozpouštědla, intenzita a čas centrifugace.

Vhodným výběrem rozpouštědel a optimalizací postupu byly získány následující extrakční podmínky:

- Objem vzorku: 400 μ l séra
- Precipitační činidlo: 400 μ l denaturovaného EtOH (+ 5% MeOH)
- Podmínky precipitace: vortex 20 g/5 min/RT
- Extrakční činidlo: 1,2 ml hexanu
- Podmínky LLE: vortex 20 g/5 min/RT a centrifugace 21 380 g/90 s/4°C

- Odpaření supernatantu: pod vakuem (za sníženého tlaku) při 45°C
- Zpracování odparku: rozpuštění v 200 µl MeOH s následnou filtrací

LC analýza

Analýza retinolu, derivátů tokoferolu a vnitřního standardu (tokol) byla provedena pomocí systému UHPLC set Nexera s fluorescenční detekcí (Shimadzu, Japonsko).

Podmínky analýzy:

- Mobilní fáze: MeOH + octan amonný (pH 7, c = 129,7 mM), poměr 84:16 (v/v)
- Průtok mobilní fáze: gradient 2-3 ml/min
- Stacionární fáze: Kinetex F5 4,6 × 100 mm, 2,6 µm (Phoemenex, USA)
- Teplota kolony: 45°C
- Objem nástřiku: 10 µl
- Podmínky detekce (FLD) pro tokoferoly včetně IS: EX 295 nm a EM 325 nm
- Podmínky detekce (FLD) pro retinol: EX 325 nm a EM 480 nm
- Celkový čas analýzy: 4 min

Validace metody

Pro hodnocení validace této metody byly využity bioanalytické normy EMA a FDA.

V rámci validačního protokolu byly hodnoceny následující parametry:

- Test vhodnosti analytického systému (SST)

Na základě výsledků uvedených v tabulce 9 bylo použití vybraného systému vyhodnoceno jako vhodné pro zmíněnou metodu.

Tabulka 9: Výsledky SST metody.

Parametry	Retinol	α-tokoferol	β-tokoferol	γ-tokoferol	δ-tokoferol
R	8,43	1,69	1,68	1,35	8,43
N	5739	1214	1964	1591	1257
HETP (mm)	0,017	0,082	0,050	0,062	0,079
T	1,00	1,04	1,01	1,03	1,02

- Linearita

K hodnocení linearity byla využita kalibrační přímka, získaná analýzou standardních roztoků na šesti koncentračních úrovních. Kalibrační křivka pro retinol byla v rozmezí 0,18-6,00 µM, pro α-tokoferol 1,56-50,00 µM, pro β-tokoferol 0,18-6,00 µM, pro γ-tokoferol 0,18-6,00 µM a pro δ-tokoferol 0,01-1,00 µM.

- Výtěžnost

Výtěžnost extrakce byla hodnocena pomocí analýzy reálných vzorků před a po přidání standardních roztoků o známých koncentracích. Výtěžnost byla v rozmezí od 88 do 110% pro všechny analyty, a tudíž nepřekročila limit $100 \pm 15\%$.

- Opakovatelnost/přesnost

Opakovatelnost metody zahrnovala stanovení opakovatelnosti nástřiku a opakovatelnosti extrakce vyjádřené jako relativní směrodatná odchylka (RSD) plochy píku. Opakovatelnost nástřiku roztoku standardu i biologických extraktů v sérii nepřesáhla RSD 1,6% a extrakce nepřekročila RSD 8,8%.

- Limity

Limit detekce (LOD), nejnižší detekovatelné ale ne kvantifikovatelné množství analytu ve vzorku, byl vyhodnocen jako 0,008 μM pro retinol, 0,228 μM pro α - tokoferol, 0,113 μM pro β - tokoferol, 0,089 μM pro γ - tokoferol a 0,06 μM pro δ - tokoferol. Nejnižší limit kvantifikace (LLOQ) odpovídal hodnotám pro 0,013 μM retinol, 0,380 μM pro α - tokoferol, 0,188 μM pro β - tokoferol, 0,148 μM pro γ - tokoferol a 0,010 μM pro δ - tokoferol.

- Robustnost

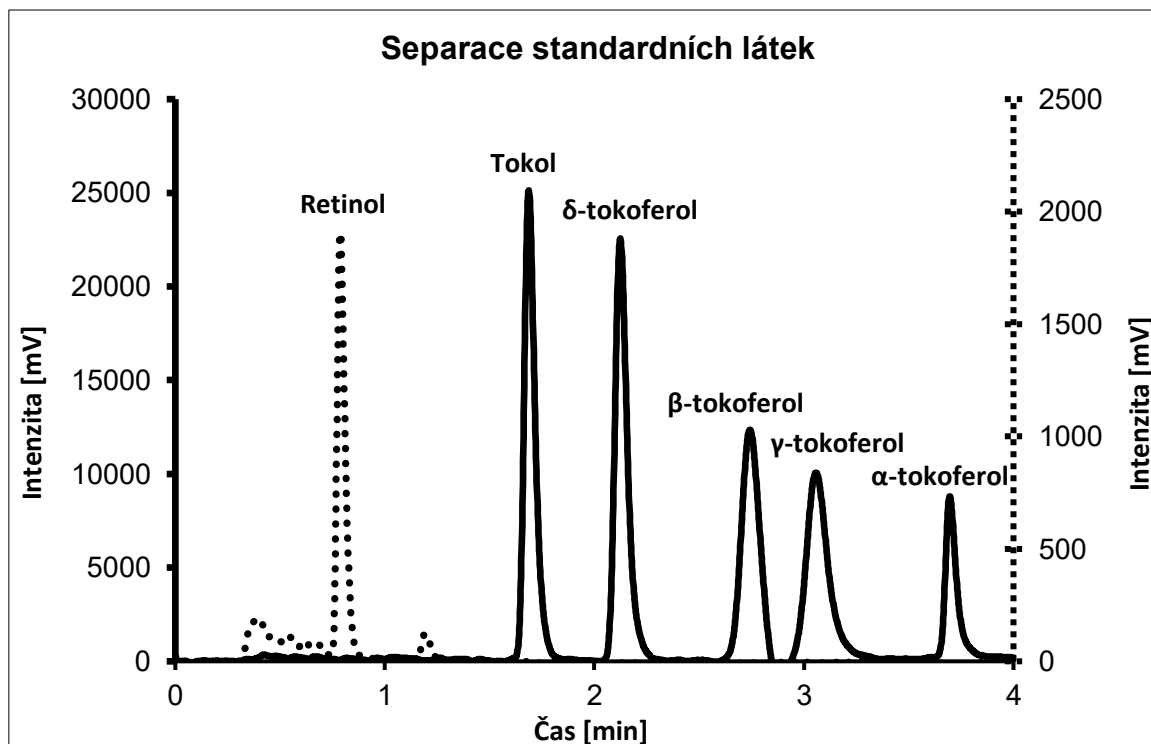
Robustnost metody byla testována pomocí změny poměrů v mobilní fázi, teploty v kolonovém termostatu a průtoku. Podle výsledků bylo zjištěno, že změna teploty $\pm 5^\circ\text{C}$ v kolonovém termostatu má zásadní vliv na separaci a reprodukovatelnost výsledků a dále množství methanolu v mobilní fázi a její průtok výrazně ovlivňují separaci strukturních izomerů β - a γ - tokoferolu.

- Stabilita

V rámci validace byla hodnocena stabilita LLE extraktů v průběhu 24 h při 4°C . Na základě výsledků bylo potvrzeno, že extrakty je možné za těchto podmínek skladovat.

- Selektivita

Schopnost metody separovat cílové analyty od interferencí vyskytujících se v biologickém extraktu byla ověřena pomocí analýzy reálných vzorků sér. Rozlišení jednotlivých píků analytů je možné vidět v chromatogramu na obrázku 33.



Obrázek 33: α -tokoferol $T_R = 3,7$ min, $c = 40 \mu\text{M}$, β -tokoferol $T_R = 2,7$ min, $c = 6 \mu\text{M}$, γ -tokoferol $T_R = 3,1$ min, $c = 3 \mu\text{M}$, δ -tokoferol $T_R = 2,1$ min, $c = 6 \mu\text{M}$, tokol (IS) $T_R = 1,6$ min, $c = 2,5 \mu\text{M}$, retinol $T_R = 0,8$ min, $c = 1 \mu\text{M}$. Detekce: retinol FLD EX 325 nm a EM 480 nm, ostatní analyty FLD EX 295 nm a EM 325 nm.

Využití metody v analýze reálných vzorků

Nově vyvinutá metoda byla použita k analýze vzorků lidských sér, aby se ověřila její použitelnost v klinické praxi. Vzorky testovaných sér byly poskytnuty zdravými dárci z řad mužů i žen. Na základě výsledků bylo potvrzeno, že metoda je vhodná a dostatečně citlivá pro analýzu všech analogů tokoferolu včetně retinolu přítomných v séru.

4.1.3.3 Závěr

Byla vyvinuta a plně validována nová bioanalytická UHPLC-FLD metoda pro stanovení retinolu, α -, β -, γ - a δ -tokoferolu v lidském séru. Rychlé a účinné separace analytů s blízkou strukturou bylo dosaženo pomocí fluorované stacionární fáze a technologie core-shell. Fluorescenční detekce umožnila citlivé stanovení vybraných analytů v biologickém materiálu. Jako technika úpravy vzorku byla zvolena selektivní extrakce z kapaliny do kapaliny v kombinaci s jednoduchou precipitací proteinů. Extrakce byla kompletně provedena v jednorázových Eppendorf zkumavkách a mikrotitračních destičkách s časovou náročností 1,3 min/vzorek. Ke korekci výsledků extrakce byl využit syntetický vnitřní standard tokol.

Analýzou série reálných vzorků bylo ověřeno, že prezentovaná metoda může být využita v klinickém výzkumu a praxi, kde by mohla napomoci objasnění role jednotlivých antioxidantů u závažných onemocnění.

4.1.4 Stanovení neopterinu, kynureninu a tryptofanu v plodové vodě, výpotku a exsudátu z dlouhodobě špatně se hojících ran

PŘÍLOHA 4: KRČMOVÁ, L. K., B. ČERVINKOVÁ, D. SOLICHOVÁ, L. SOBOTKA, L. HANSMANOVA, B. MELICHAR a P. SOLICH. Fast and sensitive HPLC method for the determination of neopterin, kynurenine and tryptophan in amniotic fluid, malignant effusions and wound exudates. *Bioanalysis* 2015, roč. 7, č. 21., s. 2751-2762 (IF₂₀₁₆= 2,673)

4.1.4.1 Úvod

Význam stanovení časných biomarkerů aktivace imunitního systému byl v literatuře již několikrát popsán u onemocnění různé etiologie. Nejčastěji se jedná o stanovení u pacientů s nefrotickým syndromem, infarktem myokardu, autoimunitních a nádorových onemocnění. Ve většině klinických studií byl použit běžně dostupný biologický materiál typu sérum či moč. V oblasti klinického výzkumu byly zánětlivé biomarkery nejčastěji stanovované pomocí metod ELISA, RIA či HPLC. Jak již bylo v této práci výše popsáno, využití kapalinové chromatografie nabízí nesporné výhody a je proto považováno za zlatý standard. Analýza časných biomarkerů zánětu typu neopterin, kynurenin a tryptofan má prognostický význam u řady onemocnění, zvláště v onkologii. Jejich hladina je v případech zánětu zvýšena v časovém předstihu a umožňuje tak včasnou diagnostiku s následnou terapií.

Cílem této práce bylo vyvinout novou rychlou jednoduchou HPLC metodu s citlivou detekcí pro stanovení neopterinu, kynureninu a tryptofanu v plodové vodě, výpotku a exsudátu z dlouhodobě špatně se hojících ran. Tato metoda by měla sloužit k analýze biomarkerů zánětu v různých druzích biologického materiálu v oblasti klinického výzkumu. Zároveň by měla být využita při provedení pilotní studie zaměřené na monitorování procesu hojení ran přímo v jejích ohnisku.

4.1.4.2 Výsledky a diskuze

Úprava vzorku před analýzou

Biologický materiál byl poskytnut pacienty hospitalizovanými ve FNHK a FNOL v souladu s etickým protokolem. Vzorky plodové vody a výpotku byly po odběru okamžitě zamrazeny (-20°C). Pro získání vzorku exsudátu z dlouhodobě nehojících se ran byla odebírána část obvazového krytí (1 x 2 cm) od ambulantních a hospitalizovaných pacientů z III. interní

gerontometabolické kliniky FNHK. Odebraný materiál byl společně s 1 ml fyziologického roztoku ultrazvukován po dobu 20 min při 25°C. Získané roztoky byly okamžitě zamrazeny (-20°C). Všechny vzorky byly v čas potřeby vytemperovány na 25°C a použity k analýze.

Jako extrakční technika byla použita jednoduchá precipitace proteinů pomocí chladu a organického rozpouštědla. Nejdříve byl vzorek (200 µl) zředěn 100 µl 15 mM fosfátového pufru s pH 6.5 a poté bylo přidáno 100 µl precipitačního činidla (ethanol -20°C). Deproteinace byla podpořena inkubací 10 min při -25°C. Následně byly vzorky centrifugovány (14000 g/10 min) a poté filtrovány pomocí mikrotitračních destiček s filtry o velikosti pórů 0,2 µm. Takto připravené vzorky byly použity pro následnou chromatografickou analýzu.

LC analýza

Analýza kynureninu, neopterinu a tryptofanu byla provedena pomocí HPLC systému Prominence LC 20 s fluorescenční a PDA detekcí (Shimadzu, Japonsko).

Podmínky analýzy:

- Mobilní fáze: směs KH_2PO_4 a $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (15 mM, pH 3) + ACN (gradient)
- Průtok mobilní fáze: 3 ml/min
- Stacionární fáze: Chromolith HR C18 100 x 4,6 mm (Merck, Německo)
- Teplota kolony: 40°C
- Objem nástřiku: 5 µl
- PDA detekce pro kynurenin: 230 nm
- FLD detekce pro neopterin: EX 353 nm a EM 438 nm
- FLD detekce pro tryptofan: EX 254 nm a EM 404 nm
- Celkový čas analýzy: 5,5 min

Validace metody

Aby mohla být prezentovaná metoda použita pro klinickou praxi, byla validována podle norem EMA a FDA, speciálně určených pro validace v oblasti bioanalýzy.

V rámci validace metody byly hodnoceny následující parametry:

- Test vhodnosti analytického systému (SST)

Vybraný chromatografický systém vyhověl požadavkům na SST a byl posouzen jako vhodný pro zmíněnou metodu. Hodnocené SST parametry jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10: Výsledky SST metody.

Parametry	Neopterin	Tryptofan	Kynurenin
R	6		NA
N	659	1345	4684
HETP (mm)	151	74	21
T	1,1	1,0	1,3

* NA = neanalyzováno

- **Linearita**

Linearita kalibrační přímky byla definována pomocí analýzy standardních roztoků ve vodě na šesti koncentračních úrovních. Kalibrační křivka byla vytvořena v rozmezí 1,25-100 nM pro neopterin, 2,5-100 µM pro tryptofan a 0,25–50 µM pro kynurenin.

- **Výtěžnost**

Účinnost extrakce byla hodnocena na základě výtěžnosti provedené pomocí analýzy reálných vzorků před a po přidání standardních roztoků o třech různých koncentracích. Celkem bylo pět vzorků od každého materiálu na jedné koncentrační úrovni. Výtěžnost byla stanovena 91-109% pro všechny analyty v plodové vodě, 83-100% ve výpotku a 92-104% v exsudátů z ran. Hodnoty pro plodovou vodu a exsudát z ran odpovídaly požadovanému rozmezí $100 \pm 15\%$. Nejnižší hodnota výtěžnosti ve výpotku se od tohoto rozmezí lišila pouze minimálně a byla vyhodnocena jako zanedbatelná.

- **Opakovatelnost/přesnost**

Přesnost metody byla hodnocena podle výsledků opakovatelnosti nástřiku a extrakce vyjádřené jako relativní směrodatná odchylka (RSD) plochy píku. Použité koncentrace odpovídaly kalibračnímu rozmezí. Přesnost nástřiku v sérii u všech testovaných biologických materiálů nepřesáhla RSD 1,0%. Výsledky opakovatelnosti extrakce poskytly RSD do 3,7%.

- **Limity**

Citlivost metody byla posouzena podle hodnot nejnižšího limitu kvantifikace (LLOQ). Ten je definován jako nejnižší kvantifikovatelné množství analytu ve vzorku, které odpovídá pětinasobku poměru signálu k šumu. Pro tuto metody byly stanoveny hodnoty LLOQ 1,25 nM pro neopterin, 2,5 µM pro tryptofan a 0,25 µM pro kynurenin.

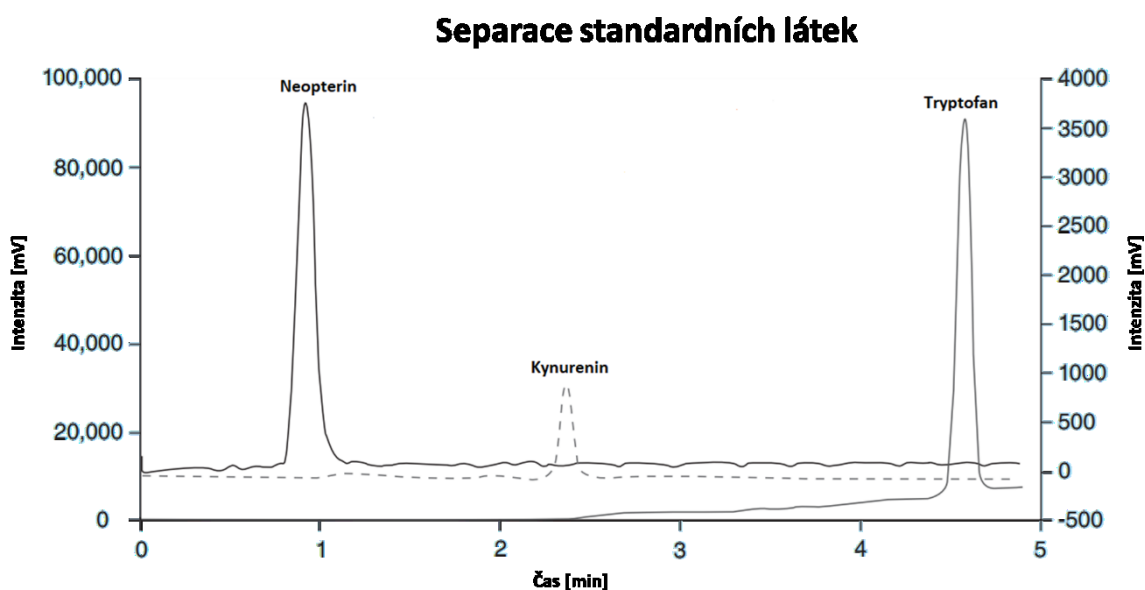
- **Robustnost**

Robustnost metody byla testována pomocí změny teploty v kolonovém termostatu, koncentrace a pH mobilní fáze. Malá změna teploty a koncentrace fosfátového pufru ovlivnila

výsledky analýzy v rozmezí 90-110%. Zásadní vliv na intenzitu píků kynureninu a tryptofanu byl pozorován při změně pH pufru (2,5).

- **Selektivita**

Selektivita metody k cílovým analytům byla hodnocena na základě analýzy série vzorků v každé matrici. Schopnost metody rozlišit analyty od interferencí vyskytujících se v plodové vodě, exsudátu a výpotku lze vidět v chromatogramu na obrázku 34.



Obrázek 34: neopterin $T_R = 0,9$ min, $c = 100$ nM, kynurenin $T_R = 2,3$ min, $c = 4,25$ μ M, tryptofan $T_R = 4,6$ min, $c = 54,16$ μ M. Detekce: neopterin FLD EX 353 nm a EM 438 nm, kynurenin PDA 230 nm, tryptofan FLD EX 254 nm a EM 404 nm.

- **Stabilita**

V rámci validace byla posouzena stabilita standardní roztoků při -25°C . Na základě analýz těchto roztoků byla potvrzena jejich stabilita po dobu 3 měsíců.

Využití metody v analýze reálných vzorků

Prezentovaná metoda byla využita pro analýzu reálných vzorků, aby se ověřila její použitelnosti pro klinický výzkum. Analyzováno bylo celkem 30 vzorků (10 výpotků, 10 plodových vod a 10 exsudátů z ran). Výsledky jednotlivých analytů byly dále vyjádřeny v poměr k hodnotám tryptofanu.

4.1.4.3 Závěr

V této práci byla prezentována nová HPLC metoda s využitím citlivé PDA a FLD detekce pro stanovení neopterinu, tryptofanu a kynureninu ve vzorcích plodové vody, výpotku a exsudátu z dlouhodobě špatně se hojících ran. Rychlé analýzy v čase 5,5 min bylo dosaženo s použitím nové monolitické kolony druhé generace (Chromolith HR). Analyty byly extrahovány z biologického materiálu pomocí jednoduché, rychlé a levné precipitace proteinů. Tato extrakční procedura byla provedena v jednorázových Eppendorf zkumavkách a mikrotitračních destičkách vhodných pro analýzy větších sérií vzorků. Celá metoda byla plně validována podle bioanalytických norem a použita v klinickém výzkumu.

V porovnání s literaturou nabízí tato prezentovaná metoda jednoduché a rychlé stanovení biomarkerů časného zánětu v plodové vodě a výpotku. Stanovení těchto biomarkerů v biologického materiálu z ran bylo provedeno jako pilotní studie unikátní svého druhu. Cílem této studie bylo monitorování hojení ran přímo v jejich ložisku s následnou odpovídající farmakoterapií a léčbou.

4.2 Komentáře k publikovaným pracím s biomedicínskou tematikou

4.2.1 Význam stanovení biomarkerů citrulinu a neopterinu při monitorování míry poškození střevní sliznice v důsledku chemoradioterapie

PŘÍLOHA 5: ZEZULOVÁ, M., M. BARTOUŠKOVÁ, E. HLÍDKOVÁ, T. ADAM, L. K. KRČMOVÁ, B. ČERVINKOVÁ, D. SOLICHOVÁ, M. ZLEVOROVÁ, K. CWIERTKA, D. FRIEDECKÝ, D. VRÁNA a B. MELICHAR. Citrulline as a biomarker of gastrointestinal toxicity in patients with rectal carcinoma treated with chemoradiation. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2016, roč. 54, č. 2, s. 305–14. (IF₂₀₁₆= 3,432)

4.2.1.1 Úvod

Citrulin je jako neesenciální aminokyselina produkován v tenkém střevě. Jeho stanovení je možné v tělních tekutinách, kam je vylučován z enterocytů. V laboratorní medicíně je citrulin využíván jako biomarker střevních funkcí. Jeho analýzou lze například monitorovat míru poškození sliznice tenkého střeva v důsledku chemoradioterapie. Při chemoradioterapii může dojít až ke ztrátě nebo atrofii slizničních buněk, která se projeví malabsorpcí mnoha látek a v neposlední řadě sníženou produkcí citrulinu.

Neopterin jako biomarker aktivace imunitního systému byl zaznamenán ve zvýšené koncentraci u mnoha onkologických onemocnění. V literatuře bylo také popsáno, že vyšší hladiny neopterinu svědčí pro horší prognózu nemoci. Při radioterapii a chemoterapii byla pozorována zvýšená hladina neopterinu na počátku léčby, ale jeho koncentrace v průběhu terapie nejsou doposud plně popsány.

Léčba pacientů s nádory konečníku ve většině případů zahrnuje chirurgické odstranění nádorové masy, lokální radiaci a systémovou farmakoterapii, tedy chemoterapii. Při této léčbě dochází k toxickému působení na buňky nádorové, ale i všechny ostatní tkáně s vyšší mitotickou aktivitou (například kostní dřeň a gastrointestinální sliznice). Stav kostní dřene je rutinně monitorován v hematologických laboratořích, ale stav sliznice je posuzován na základě subjektivní pacientovy anamnézy. Snahou proto je najít vhodný biomarker, který by mohl být využit k monitorování toxického poškození sliznice zažívacího traktu.

Studie si kladla za cíl pomocí monitorování hladin neopterinu a citrulinu u pacientů s nádory konečníku léčených objasnit jejich význam, vzájemnou korelaci a možnost použití jako biomarkery poškození střevní sliznice při chemoradioterapii.

4.2.1.2 Výsledky a diskuze

Do studie bylo zapojeno celkem 49 pacientů, včetně mužů a žen s věkovým průměrem 67 let, postižených nádory konečníku, nejčastěji typu adenokarcinomu. U této skupiny byla v týdenních intervalech monitorována hladina neopterinu v séru a moči a citrulinu v plazmě.

Koncentrace neopterinu v moči byly stanoveny pomocí metody HPLC s fluorescenční detekcí. Vzorky byly upraveny pouhým naředěním fosfátovým pufrům a po následné centrifugaci a filtraci použity pro chromatografickou analýzu. Celkový čas analýzy byl 6 min a k separaci byla využita stacionární fáze C18. Současně byla v této metodě stanovena i hladina močového kreatininu. Výsledky byly poté vyjádřeny jako poměr neopterinu a kreatininu ($\mu\text{M}/\text{M}$). Hladiny sérového neopterinu byly stanoveny pomocí radioimunoanalýzy.

Plazmatická koncentrace citrulinu byla stanovena pomocí přímého nástřiku upravených vzorků do hmotnostního spektrometru. Úprava vzorku byla provedena pomocí naředění plasmy roztokem vnitřního standardu, centrifugace a filtrace. Jako mobilní fáze byla zvolena kombinace methanolu a 0,1% kyseliny mravenčí.

U pacientů byla pozorována signifikantně snížená hladina citrulinu v plazmě v průběhu chemoradiaoterapie. Hladina neopterinu v moči byla signifikantně zvýšená ve druhém, pátém a šestém týdnu terapie. Oproti tomu signifikantně zvýšená sérová koncentrace neopterinu byla zaznamenána již po prvním, druhém, pátém, šestém a sedmém týdnu léčby.

4.2.1.3 Závěr

V této studii byla u pacientů s nádory konečníku léčených chemoradioterapií v týdenních intervalech analyzována hladina neopterinu v moči a séru a citrulinu v plazmě. Již po prvním týdnu chemoradioterapie byla zaznamenána signifikantně snížená hladina plazmatického citrulinu a zvýšená hladina sérového a močového neopterinu. Mezi analyty byla pozorována negativní korelace. Citrulin byl v této studii vyhodnocen jako vhodný biomarker pro monitorování poškození střevní sliznice. Jehož analýzou v pravidelných intervalech je možné lépe a dříve rozpoznat střevní toxicitu a tím snížit její dopad na organismus.

4.2.2 Prognostický význam stanovení neopterinu v moči a séru u pacientů s karcinomem konečnicku

PŘÍLOHA 6: ZEZULOVÁ, M., M. BARTOUŠKOVÁ, E. HLÍDKOVÁ, J. JURÁŇOVÁ, B. ČERVINKOVÁ, E. KASALOVÁ, T. ADAM, L. K. KRČMOVÁ, D. SOLICHOVÁ, K. CWIERTKA, D. VRÁNA a B. MELICHAR. Prognostic Significance of Serum and Urinary Neopterin Concentrations in Patients with Rectal Carcinoma Treated with Chemoradiation. *Anticancer research*. 2016, roč. 36, č. 1, s. 287–92. (IF₂₀₁₆= 1,937)

4.2.2.1 Úvod

Nádory konečnicku jsou v české populaci poměrně časté a jejich prognóza je spojena s vysokou mortalitou. Léčba nejčastěji spočívá v kombinaci chirurgického odstranění novotvaru s externí radiací a systémovou chemoterapií. V literatuře bylo popsáno, že kombinací radioterapie s chemoterapií je možné dosáhnout lepší prognózy u pacientů s adenokarcinomy.

Zatímco v minulosti byl v onkologii kladen velký důraz především na identifikaci faktorů a biomarkerů asociovaných se vznikem nádorových onemocnění, dnes vzrůstá potřeba laboratorních biomarkerů reflektujících prognózu již probíhajícího onemocnění s případnou predikcí komplikací s ním spojených. V případě kolorektálního karcinomu mohou být použity, jako prognostické biomarkery následující poměry: neutrofilů/lymfocytů, lymfocytů/monocytů a krevní destičky/lymfocytů.

Cílem této studie bylo objasnit prognostický význam sérového a močového neopterinu u pacientů s rakovinou konečnicku léčených chemoradioterapií.

4.2.2.2 Výsledky a diskuze

Celkem bylo do studie zapojeno 49 pacientů včetně mužů a žen, u kterých byla histologicky potvrzena diagnóza nádoru konečnicku. Pacienti byli rozděleni do dvou skupin podle úrovně radioterapie na adjuvantní a neoadjuvantní. U obou skupin byla analyzována hladina sérového a močového neopterinu, kreatininu a krevních buněk. Mezi hodnocené parametry patřil časový interval mezi počátkem terapie a recidivou/úmrťm (RFS) a interval od diagnostiky onemocnění po úmrtí (OS).

Na základě získaných výsledků nebyly pozorovány rozdíly v koncentracích neopterinu u pacientů s adjuvantní a neoadjuvantní terapií. Byla zaznamenána negativní korelace mezi

hodnotami neopterinu a hemoglobinu a dále korelace mezi hodnotou sérového neopterinu a počtu lymfocytů. Zhoršení intervalu RFS i OS bylo pozorováno u pacientů se sérovou hladinou neopterinu vyšší než 11,86 nM a u pacientů léčených neoadjuvantní terapií s vyšším poměrem neopterin/kreatinin než 146 $\mu\text{M}/\text{M}$ proti pacientům s nižšími hodnotami. V případě vyšších poměrů močového neopterinu ke kreatininu než 214 $\mu\text{M}/\text{M}$ bylo zaznamenáno nesignifikantní zhoršení intervalu RFS a OS. V této studii nebyl prokázán vliv věku, stadia nemoci, koncentrace hemoglobinu ani množství leukocytů a krevních destiček na prognózu onemocnění nádorů konečníku. Byl shledán velký rozdíl v hodnotách intervalu RFS a OS mezi skupinami léčenými neoadjuvantní a adjuvantní terapií.

4.2.2.3 Závěr

Podle dat prezentovaných v této studii byl vyhodnocen neopterin jako vhodný prognostický biomarker u pacientů s karcinomem konečníku léčených chemoradioterapií. Prognostický význam byl pozorován pouze u sérového, a ne u močového neopterinu. Predikce onemocnění pomocí analýzy sérového neopterinu byla spolehlivá pouze u pacientů léčených neoadjuvantní terapií. Výpovědní hodnota sérového neopterinu u pacientů s adjuvantní terapií byla pravděpodobně v této studii ovlivněna přítomností zánětlivé reakce v důsledku chirurgického odstranění nádoru. Obecně byla v případě neoadjuvantní terapie pozorována velmi nepříznivá prognóza onemocnění, konkrétně u této skupiny došlo k úmrtí všech pacientů s hodnotou sérového neopterinu vyšší než 11,86 nM. Tento fakt ukazuje na zvýšenou potřebu nových terapeutických metod. Jejich uplatnění by bylo vhodné studovat u populace se zvýšenou hladinou sérového neopterinu a současně pokročilým stadiem karcinomu konečníku s volbou neoadjuvantní terapie.

4.2.3 Vliv hemaferézy na hladiny lipofilních vitamínů u pacientů s věkem podmíněnou makulární degenerací sítnice

PŘÍLOHA 7: 7. AUFARTOVÁ, J., M. BLÁHA, E. KASALOVÁ, B. HONEGROVÁ, B. ČERVINKOVÁ, L. KUJOVSKÁ KRČMOVÁ, J. PLÍŠEK, M. LÁNSKÁ, L. SOBOTKA a D. SOLICHOVÁ. Blood levels of antioxidants during age-related macular degeneration treatment by rheohaemapheresis. Biomedical Papers. 2015, roč. 159, č. 3, s. 400–406. (IF₂₀₁₆= 0,894)

4.2.3.1 Úvod

Věkem podmíněná makulární degenerace (VPMD) je komplexní multifaktoriální onemocnění vedoucí k poškození sítnice a choroиду (cévnatky) oka. Vznik VPMD je mimo jiné ovlivněn predisponujícími geny a vlivy zevního prostředí. Toto onemocnění je z klinického a histopatologického hlediska děleno na dvě formy, suchou (atrofickou) a vlhkou (exsudativní). Většina pacientů (až 80-90%) je postižena pomalu se rozvíjející suchou formou s charakteristickou přítomností malých tvrdých drúz na sítnici. Výskyt tohoto onemocnění stoupá s věkem a zapříčiňuje rozvoj slepoty u populace starší 65 let.

Bylo prokázáno, že signifikantní redukce drúz a dalších shluků pigmentu je možné dosáhnout pomocí hemaferézy. Mezi další benefity tohoto zákroku při VPMD patří zlepšení metabolických procesů na sítnici a snížení koncentrace vysokomolekulárních látek (lipidy, imunoglobuliny, fibrinogen). Při hemaferéze je krev odebírána z žíly jedné ruky pacienta, vháněna do mimotělního oběhu, aby poté mohla být vrácena zpět do organismu pacienta pomocí žíly na druhé ruce. Odebraná krev prochází v mimotělním oběhu filtrační kaskádou s použitím speciálně navržených filtrů pro odstranění látek způsobujících její vysokou hustotu. Na základě klinických studií bylo potvrzeno, že takto upravená krev je znovu schopna proudit lehce i velmi tenkými kapilárami, jaké se nachází například v oku.

Cílem této studie bylo objasnit, zda dochází při hemaferéze společně s lipidy také k odstranění v tucích rozpustných antioxidantů typu vitamín A a E.

4.2.3.2 Výsledky a diskuze

Do této studie bylo zahrnuto celkem 23 pacientů, včetně mužů a žen s potvrzenou diagnózou suché VPMD alespoň u jednoho oka. U těchto pacientů bylo provedeno osm procedur hemaferézy v rámci deseti týdnů, kdy hladina antioxidantů byla analyzována vždy před a po zákroku.

Vitamín A (retinol) a vitamín E (α -tokoferol) byly stanoveny v séru, lipoproteinových frakcích a erythrocytech. Lipoproteinové frakce byly ze séra získány pomocí ultracentrifugace, při které došlo k separaci vrstev LDL, VLDL a HDL. Erythrocyty byly z plné krve izolovány pomocí centrifugace s následným odstraněním plazmy. Pro extrakci antioxidantů byla využita metoda LLE a k jejich stanovení kapalinová chromatografie na reverzní fázi.

Mezi další monitorované analyty v této studii patřily také triacylglyceroly (TAG), cholesterol, glutation peroxidáza, malondialdehyd a superoxiddismutáza. Tyto analyty byly stanoveny v nemocniční rutinní laboratoři pomocí komerčních kitů.

Studie potvrdila signifikantní snížení TAG a cholesterolu o 31-65 % v séru i lipoproteinových frakcích u pacientů léčených hemaferézou. Po této terapii byl také zaznamenán signifikantně zvýšený poměr α -tokoferol/cholesterol jak v séru, tak v lipoproteinových frakcích. Dále bylo u pacientů pozorováno zvýšení α -tokoferolu v erythrocytárních membránách o 2%, nejednalo se však o signifikantní rozdíl. Po sériích hemaferézy byl sledován signifikantní pokles koncentrace retinolu v séru a nesignifikantní pokles všech sledovaných enzymů. Hladiny retinolu však stále odpovídaly fyziologickému rozmezí.

4.2.3.3 Závěr

V této studii byl prokázán pozitivní účinek hemaferézy na snížení hladin vysoko molekulárních látek v krvi, způsobujících její vyšší hustotu a s tím spojený rozvoj VPMD. Bylo potvrzeno, že hladina antioxidantů ve tkáních není touto terapií ovlivněna, přestože dochází k výrazné redukci lipidů a jiných makromolekul. Hladiny všech antioxidantů po terapii odpovídaly fyziologickému rozmezí. U monitorovaných pacientů nebyly pozorovány známky vitamínové nedostatečnosti. Tento fakt byl potvrzen laboratorní analýzou vitamínu A a E.

5 ZÁVĚR

Předložená disertační práce se zabývala problematikou analýzy biologického materiálu a vývojem nových separačních metod pro stanovení vybraných biomarkerů. Výzkumu v oblasti bioanalytických metod je dnes věnována velká pozornost se snahou definovat nové specifické biomarkery. K tomuto účelu s výhodou slouží moderní a vysoce selektivní analytické techniky na bázi kapalinové chromatografie v kombinaci s citlivou detekcí.

V současné době jsou na analýzu biologicky aktivních látek kladeny stále vyšší požadavky, jak na její rychlost, citlivost, finanční a materiálovou náročnost, tak na využitelnost v klinickém výzkumu a praxi. Moderní instrumentace v bioanalytických laboratořích spolu s pomocí nových extrakčních technik umožňují splnit tyto požadavky a poskytnout tak citlivou analýzu biomarkerů ve velmi krátkém čase. Z moderních trendů v separačních metodách lze jmenovat například systém UHPLC, tandemovou hmotnostní detekci, nové stacionární fáze typu PFP či HILIC a jejich technologie (monolity, povrchově porézní částice). V oblasti extrakčních technik je snaha vyžít jednoduché a manuálně nenáročné metody s možností automatizace či miniaturizace pro rychlé zpracování velkých sérií vzorků.

V této práci byly prezentovány tři nové analytické metody pro stanovení vybraných biomarkerů v reálných matricích jako je sérum, moč, výpotek, plodová voda a exsudát. Nejprve byla popsána HPLC-FLD-UV metoda pro stanovení časných biomarkerů zánětu, mezi které patří neopterin, kynurenin a tryptofan. K extrakci analytů byla využita jednoduchá, rychlá a levná precipitace proteinů a k následné separaci monolitická kolona druhé generace. Druhou prezentovanou metodou byla UHPLC-UV-MS/MS metoda pro stanovení kreatininu a oxidačních produktů nukleových kyselin. Zde bylo využito selektivní extrakce na pevnou fázi s následnou rychlou separací analytů pomocí C18 stacionární fáze s povrchově porézními částicemi speciálně navrženými pro analýzu biologického materiálu. Jako poslední bylo popsáno UHPLC-FLD stanovení retinolu (vitamin A) a všech derivátů tokoferolu (vitamin E). K úpravě vzorků byla zvolena miniaturizovaná extrakce z kapaliny do kapaliny a separace bylo dosaženo s použitím PFP stacionární fáze nové generace s povrchově porézními částicemi. Všechny tyto metody byly plně validovány dle požadavků bioanalytických norem FDA a EMA.

Dále byly v práci okomentovány tři biomedicínské studie zaměřené na prognostický význam neopterinu, monitorování toxicity chemoradiační terapie pomocí biomarkerů aktivity imunitního systému a stanovení antioxidantů u pacientů při hemaferéze. Součástí byl také

souhrnný článek poskytující informace o klinickém významu a možnostech stanovení vitamínu E.

Všechny prezentované metody byly vyvinuty a validovány ve Výzkumné laboratoři III. interní gerontometabolické kliniky FNHK a rozšířily tím spektrum poskytovaných analýz. Dále byly tyto nové metody úspěšně aplikovány při analýze reálných lidských vzorků a budou sloužit ve FNHK a FNOL pro monitorování vybraných biomarkerů. Metody komentované v této práci byly publikovány v odborných mezinárodních časopisech s impakt faktorem.

6 PŘEHLED PUBLIKOVANÝCH VÝSTUPŮ

1. ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ, V. ŠESTÁKOVÁ, D. SOLICHOVÁ a P. SOLICH. A fully validated bioanalytical method using an UHPLC–MS/MS system for quantification of DNA and RNA oxidative stress biomarkers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2017, roč. 409, č. 14, s. 3611–3621. (IF₂₀₁₆ = 3,431)
2. ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ, D. SOLICHOVÁ, B. MELICHAR a P. SOLICH. Recent advances in the determination of tocopherols in biological fluids: from sample pretreatment and liquid chromatography to clinical studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016, roč. 408, č. 10, s. 2407–2424. (IF₂₀₁₆ = 3,431)
3. ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ, S. KLABAČKOVÁ, D. SOLICHOVÁ a P. SOLICH. Rapid determination of lipophilic vitamins in human serum by ultra-high-performance liquid chromatography using a fluorinated column and a high throughput miniaturized liquid-liquid extraction. *Journal of Separation Science*. Přijato k publikování 06/2017. (IF₂₀₁₆ = 2,557)
4. KRČMOVÁ, L. K., B. ČERVINKOVÁ, D. SOLICHOVÁ, L. SOBOTKA, L. HANSMANOVA, B. MELICHAR a P. SOLICH. Fast and sensitive HPLC method for the determination of neopterin, kynurenine and tryptophan in amniotic fluid, malignant effusions and wound exudates. *Bioanalysis* 2015, roč. 7, č. 21., s. 2751-2762 (IF₂₀₁₆= 2,673)
5. ZEZULOVÁ, M., M. BARTOUŠKOVÁ, E. HLÍDKOVÁ, T. ADAM, L. K. KRČMOVÁ, B. ČERVINKOVÁ, D. SOLICHOVÁ, M. ZLEVOROVÁ, K. CWIERTKA, D. FRIEDECKÝ, D. VRÁNA a B. MELICHAR. Citrulline as a biomarker of gastrointestinal toxicity in patients with rectal carcinoma treated with chemoradiation. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2016, roč. 54, č. 2, s. 305–14. (IF₂₀₁₆= 3,432)
6. ZEZULOVÁ, M., M. BARTOUŠKOVÁ, E. HLÍDKOVÁ, J. JURÁŇOVÁ, B. ČERVINKOVÁ, E. KASALOVÁ, T. ADAM, L. K. KRČMOVÁ, D. SOLICHOVÁ, K. CWIERTKA, D. VRÁNA a B. MELICHAR. Prognostic Significance of Serum and Urinary Neopterin Concentrations in Patients with Rectal Carcinoma Treated with Chemoradiation. *Anticancer research*. 2016, roč. 36, č. 1, s. 287–92. (IF₂₀₁₆= 1,937)
7. AUFARTOVÁ, J., M. BLÁHA, E. KASALOVÁ, B. HONEGROVÁ, B. ČERVINKOVÁ, L. KUJOVSKÁ KRČMOVÁ, J. PLÍŠEK, M. LÁNSKÁ, L. SOBOTKA a D. SOLICHOVÁ. Blood levels of antioxidants during age-related macular degeneration treatment by rheohaemapheresis. *Biomedical Papers*. 2015, roč. 159, č. 3, s. 400–406. (IF₂₀₁₆= 0,894)

7 PŘEHLED OSTATNÍCH VÝSTUPŮ, GRANTOVÝCH PROJEKTŮ A STÁŽÍ

7.1 Přednášky

Prezentující autor:

1. ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ a P. SOLICH. Novel UHPLC method with miniaturized liquid-liquid extraction for determination of lipophilic vitamins in human serum. 24th Annual RACI R&D Topics Conference in Analytical and Environmental Chemistry, Sydney, Austrálie, 5.12. 2016
2. ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ, M. HUTNÍKOVÁ, D. SOLICHOVÁ a P. SOLICH. UHPLC method development for determination of important antioxidants. 5. Postgraduální a 3. Postdoktorandská vědecká konference, Hradec Králové, Česká republika, 4.2. 2015
3. ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ, D. ČECHLOVSKÝ, D. SOLICHOVÁ, B. MELICHAR a P. SOLICH. UHPLC/MS/MS method development for determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in clinical research. 4. Postgraduální a 2. Postdoktorandská vědecká konference, Hradec Králové, Česká republika, 28.1. 2014
4. ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ, D. ČECHLOVSKÝ, D. SOLICHOVÁ, B. MELICHAR, L. SOBOTKA a P. SOLICH. Development of UHPLC/MS/MS method for determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine. 9th International Students Conference „Modern Analytical Chemistry“, Praha, Česká republika, 23.9. 2013

Spoluautor:

1. KRČMOVÁ, L. K., B. ČERVINKOVÁ, D. SOLICHOVÁ, B. MELICHAR, L. SOBOTKA, a P. SOLICH. Determination of neopterin, kynurenine and tryptophan as immune system activation markers in various biological fluids. 9th International Conference of Anticancer Research (IIAR), Sithonie, Řecko, 6.-10.10. 2014
2. KRČMOVÁ, L. K., B. ČERVINKOVÁ, L. SOBOTKA, D. SOLICHOVÁ, B. MELICHAR a P. SOLICH. The new HPLC method for monitoring of wound healing straight in wound. 14th International Nutrition & Diagnostics Conference (INDC), Praha, Česká republika, 2.-5.9. 2014

3. AUFARTOVÁ, J., J. PLÍŠEK, L. K. KRČMOVÁ, E. KASALOVÁ, B. ČERVINKOVÁ, M. BLÁHA, L. SOBOTKA, D. SOLICHOVÁ a P. SOLICH. Monitoring of 25-hydroxy vitamin D by UHPLC-ESI-MS/MS method in human serum. 3. Postgraduální a 1. Postdoktorandská vědecká konference, Hradec Králové, Česká republika, 30.1. 2013

7.2 Plakátová sdělení

Prezentující autor:

1. ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ, J. PLÍŠEK a P. SOLICH. Current sample preparation procedures used in clinical research and clinical routine practice. ACROSS International Symposium on Advances in Separation Science (ASASS 2), Hobart, Tasmánie, Austrálie, 30.11.-2.12. 2016
2. ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ, D. ČECHLOVSKÝ, S. KLABAČKOVÁ, D. SOLICHOVÁ a P. SOLICH. Miniaturization in sample pre-treatment and its application for routine analysis. 21st International Symposium on Separation Sciences (ISSS), Lublaň, Slovinsko, 29.6.-3.7. 2015
3. ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ, J. PLÍŠEK, E. KASALOVÁ, D. SOLICHOVÁ a P. SOLICH. Recent sample preparation techniques for clinical research and routine practice. 42nd International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC), Ženeva, Švýcarsko, 21.6.-26.6. 2015
4. ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ, D. SOLICHOVÁ a P. SOLICH. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) in clinical practice for analysis of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine 4. Česká konference hmotnostní spektrometrie, Hradec Králové, Česká republika, 15-17.4. 2015
5. ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ, D. SOLICHOVÁ a P. SOLICH. Determination of important antioxidants by UHPLC technique. 20. Gerontologický sjezd, Hradec Králové, Česká republika, 26.-27.11. 2014
6. ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ, J. PLÍŠEK, D. SOLICHOVÁ a P. SOLICH. Determination of important biomarkers using modern UHPLC technology. 9th International Conference of Anticancer Research (IIAR), Sithonie, Řecko, 6.-10.10. 2014
7. ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ, D. SOLICHOVÁ a P. SOLICH. Modern UHPLC stationary phases for separation of important antioxidants. 14th International Nutrition & Diagnostics Conference (INDC), Praha, Česká republika, 2.-5.9. 2014
8. ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ, D. ČECHLOVSKÝ, D. SOLICHOVÁ, B. MELICHAR a P. SOLICH. Determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine using UHPLC/MS-MS method for monitoring of cancer patients. 24th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA), Boloň, Itálie, 30.6.-3.7. 2013

Spoluautor:

1. KLABAČKOVÁ, S., L. K. KRČMOVÁ a B. ČERVINKOVÁ. Application of miniaturized extraction techniques for analysis of tocopherols in clinical practice - first results. 45th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC), Praha, Česká republika, 18-22.6. 2017
2. KRČMOVÁ, L. K., L. JAVORSKÁ, B. ČERVINKOVÁ, E. KASALOVÁ, D. SOLICHOVÁ a P. SOLICH. Bioanalytical UHPLC-MS/MS methods development – key problems. 42nd International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC), Ženeva, Švýcarsko, 21-26.6. 2015
3. KRČMOVÁ, L. K., J. PLÍŠEK, E. KASALOVÁ, B. ČERVINKOVÁ, D. SOLICHOVÁ a P. SOLICH. Determination of vitamin D metabolites using UHPLC-MS/MS. 4. Česká konference hmotnostní spektrometrie, Hradec Králové, Česká republika, 15-17.4. 2015
4. KRČMOVÁ, L. K., B. ČERVINKOVÁ, L. SOBOTKA, D. SOLICHOVÁ, B. MELICHAR a P. SOLICH. The new HPLC method for determination of neopterin, kynurenine and tryptophan for monitoring of wound healing process straight in the wound. 31. Mezinárodní kongres SKVIMP a 1. Česko-slovenský kongres klinické výživy, Hradec Králové, Česká republika, 5-7.3. 2015
5. MATYSKOVÁ, K. M., J. VÍŠEK, P. NAVRÁTIL, L. K. KRČMOVÁ, B. ČERVINKOVÁ, M. MERTA, L. SOBOTKA, M. BLÁHA a S. S. DUSILOVÁ Stanovení sérového neopterinu, kynureninu a tryptofanu u pacientů po transplantaci ledvinného štěpu. 35. Český nefrologický kongres, Praha, Česká republika, 25-27.6. 2014
6. SOLICHOVÁ, D., KRČMOVÁ, L. K., J. PLÍŠEK, J. AUFARTOVÁ, E. KASALOVÁ, B. ČERVINKOVÁ, B. HONEGROVÁ, P. SOLICH a L. SOBOTKA. Modern Sample Preparation Tools for Clinical Research. 16th International Symposium on Advances in Extraction Technologies, Kréta, Řecko, 25-28.5. 2014
7. KRČMOVÁ, L., D. SOLICHOVÁ, J. PLÍŠEK, B. ČERVINKOVÁ, B. KUČEROVÁ, J. AUFARTOVÁ, L. SOBOTKA, a P. SOLICH. UHPLC technique for determination of biologically active compounds in clinical research. 40th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC), Hobart, Tasmánie, Austrálie, 18-21.12. 2013

8. KRČMOVÁ, L., B. ČERVINKOVÁ, D. SOLICHOVÁ, B. MELICHAR, L. SOBOTKA, a P. SOLICH. Monolithic columns in HPLC separation of neopterin, kynurenine and tryptophan in various human fluids in high-throughput laboratory. 24th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA), Boloň, Itálie, 30.6.-3.7. 2013
9. KRČMOVÁ, L., M. KUBIŠOVÁ, J. VÍŠEK, B. ČERVINKOVÁ, E. KASALOVÁ, D. SOLICHOVÁ, B. MELICHAR, P. SOLICH a L. SOBOTKA. Determination of neopterin, kynurenine and tryptophan as immune system activation markers in various biological fluids. 29. Mezinárodní kongres SKVIMP, Hradec Králové, Česká republika, 7-9.3. 2013
10. AUFARTOVÁ, J., J. PLÍŠEK, L. KRČMOVÁ, E. KASALOVÁ, B. ČERVINKOVÁ, B. KUČEROVÁ, P. HEGEROVÁ, Z. DĚDKOVÁ, D. SOLICHOVÁ, L. SOBOTKA a P. SOLICH. Importance of vitamin A, E and D monitoring in elderly. 29. Mezinárodní kongres SKVIMP, Hradec Králové, Česká republika, 7-9.3. 2013
11. PLÍŠEK, J., L. KRČMOVÁ, J. AUFARTOVÁ, E. KASALOVÁ, B. KUČEROVÁ, B. ČERVINKOVÁ, M. BLÁHA, D. SOLICHOVÁ a L. SOBOTKA. Determination of vitamin D by LC-MS/MS method in clinical research. 18. Gerontologický sjezd, Hradec Králové, Česká republika, 6-7.12. 2012

7.3 Řešené grantové projekty

1. Spoluřešitel grantu **GAUK 860216** (2016-2017): Vytvoření nového typu biokompatibilních hemodialyzovaných membrán pro oddělení biomolekul
Hlavní řešitel: Mgr. Michaela Kohlova
2. Řešitel **Interního grantu Karlovy Univerzity v Praze** (2015): Využití mikrotitračních destiček pro zpracování a chromatografickou analýzu biologických vzorků v klinickém výzkumu
Hlavní řešitel: Mgr. Barbora Červinková
3. Člen řešitelského kolektivu grantu **IGA MZ ČR NT14265** (2013-2015): Využití ultra vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení vitamínu D a jeho metabolitů pro klinickou praxi
Hlavní řešitel: RNDr. Lenka Krčmová, Ph.D.
4. Člen řešitelského kolektivu grantu **IGA MZ ČR NT13564** (2013-2015): Prediktivní faktory patologické odpovědi na neoadjuvantní chemoterapii u nemocných s karcinomem prsu a HER-2 pozitivním nebo triple negativním fenotypem
Hlavní řešitel ve FNHK: doc. RNDr. Dagmar Solichová, Ph.D.
5. Člen řešitelského kolektivu grantu **IGA MZ ČR NT13566** (2013-2015): Tkáňové trauma a pooperační stres u pacientek s chirurgicky léčenými časnými stádii karcinomu endometria
Hlavní řešitel ve FNHK: doc. RNDr. Dagmar Solichová, Ph.D.
6. Člen řešitelského kolektivu grantu **Interní soutěže Fakultní nemocnice Hradec Králové 00179906** (2013): Vliv hojení rány na koncentraci metabolitů v sekretu
Hlavní řešitel: prof. MUDr. Luboš Sobotka, CSc.

7.4 Absolvované stáže

2016/2017 Zahraniční stáž na Australian Centre for Research on Separation Science, University of Tasmania, Tasmánie, Austrálie (**6 měsíců**, vědecký pracovník)

2016 Zahraniční stáž na School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Cardiff University, Wales, Velká Británie (**5 měsíců**, program Erasmus Practical Placement)

2014 Zahraniční stáž na College of Medicine and Veterinary Medicine, The University of Edinburgh, Skotsko, Velká Británie (**1 týden**, projekt CEPIN)

2014 Tuzemská odborná stáž v Laboratoři klinické biochemie, Železniční poliklinika, Medika Hradec Králové s.r.o. (**1 týden**, projekt CEPIN)

2013 Zahraniční stáž na Biomedical Sciences Research Complex, University of St Andrews, Skotsko, Velká Británie (**3 týdny**, stážista)

2013 Zahraniční stáž na School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Cardiff University, Wales, Velká Británie (**1 měsíc**, projekt FAFIS)

8 LITERATURA

- [1] NOVÁKOVÁ, L. a M. DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. 1. vyd. Praha: Europrint a.s., 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [2] MAJORS, R. E. *Sample Preparation Fundamentals for Chromatography*. B.m.: Agilent Technologies, 2013. ISBN 9783110289169. DOI 10.1515/9783110289169
- [3] WELLS, D. A. *High throughput bioanalytical sample preparation*. B.m.: Elsevier, 2003. ISBN 9780444510297.
- [4] SIMPSON, N. J. K. *Solid-phase extraction : principles, techniques, and applications*. B.m.: Marcel Dekker, 2000. ISBN 9780824700218.
- [5] *Sopachem analytical*. [online] [cit. 2017-06-26]. Dostupné z: <http://www.sopachem.com/analytical/portfolio/isolute-sle-supported-liquid-extraction/>
- [6] FREI, M. Centrifugation. *Biofiles*. 2011, roč. 6, č. 5. Dostupné z: http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/articles/biofiles/biofiles-pdf/biofiles_v6_n5.pdf
- [7] *Merck Millipore*. [online] [cit. 2017-06-26]. Dostupné z: http://www.merckmillipore.com/CZ/cs/life-science-research/chromatography-sample-preparation/filtrationproducts/O3Wb.qB.CnUAAAFBw_plvzl_nav?ReferrerURL=https%3A%2F%2Fwww.google.cz%2F
- [8] *Dot Scientific*. [online] [cit. 2017-06-26]. Dostupné z: https://www.dotscientific.com/Products.aspx?G_Id=42&C_Id=191&SC_Id=550&T_Id=2290
- [9] *Pall Corporation*. [online] [cit. 2017-06-26]. Dostupné z: https://shop.pall.com/INTERSHOP/web/WFS/PALL-PALLUS-Site/en_US/-/USD/ViewProductStart?SKU=gri78m40
- [10] ABDEL-REHIM, M. New trend in sample preparation: On-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2004, roč. 801, č. 2, s. 317–321. ISSN 15700232. DOI 10.1016/j.jchromb.2003.11.042
- [11] BICCHI, C., E. LIBERTO, C. CORDERO, B. SGORBINI a P. RUBIOLO. Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) and Headspace Sorptive Extraction (HSSE): An Overview. *LGC North America*. 2009, roč. 27, č. 5, s. 376–390.
- [12] LI, W., J. ZHANG a F. L. S. TSE. *Handbook of LC-MS bioanalysis : best practices, experimental protocols, and regulations*. B.m.: John Wiley & Sons, 2013. ISBN 9781118159248. DOI 10.1002/9781118671276
- [13] MAHONY, J. O., K. NOLAN, M. R. SMYTH a B. MIZAIKOFF. Molecularly imprinted polymers - Potential and challenges in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*. 2005, roč. 534, č. 1, s. 31–39. ISSN 00032670. DOI 10.1016/j.aca.2004.07.043
- [14] *Waters - HPLC*. [online] [cit. 2017-06-26]. Dostupné z: http://www.waters.com/waters/en_CZ/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_CZ
- [15] CIELECKA-PIONTEK, J., P. ZALEWSKI, A. JELIŃSKA a P. GARBACKI. UHPLC: The greening face of liquid chromatography. *Chromatographia*. 2013, roč. 76, č. 21–22, s. 1429–1437. ISSN 00095893. DOI 10.1007/s10337-013-2434-6
- [16] ROGE, A. B., S. N. FIRKE, R. M. DHANE, V. J. GUNJKAR a S. M. VADVALKAR. Novel achievement of HPLC:

- UPLC. *International Journal of PharmTech Research*. 2011, roč. 3, č. 3, s. 1423–1429. ISSN 09744304.
- [17] Shimadzu. [online] [cit. 2017-06-26]. Dostupné z: http://www.shimadzu.com/an/hplc/component/auto_sampler.html
- [18] CIBIČEK, N. a J. VACEK. *Principy a využití vybraných analytických metod v laboratorní medicíně*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2014. ISBN 9788024439518.
- [19] FUREY, A., M. MORIARTY, V. BANE, B. KINSELLA a M. LEHANE. Ion suppression; A critical review on causes, evaluation, prevention and applications. *Talanta*. 2013, roč. 115, č. 1, s. 104–122. ISSN 00399140. DOI 10.1016/j.talanta.2013.03.048
- [20] HAYES, R., A. AHMED, T. EDGE a H. ZHANG. Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2014, roč. 1357, č. 1, s. 36–52. ISSN 18733778. DOI 10.1016/j.chroma.2014.05.010
- [21] PRETI, R. Core-shell columns in high-performance liquid chromatography: Food analysis applications. *International Journal of Analytical Chemistry*. 2016, roč. 2016, č. 1, s. 1–9. ISSN 16878779. DOI 10.1155/2016/3189724
- [22] WALSH, Z., B. PAULL a M. MACKA. Inorganic monoliths in separation science: A review. *Analytica Chimica Acta*. 2012, roč. 750, č. 1, s. 28–47. ISSN 00032670. DOI 10.1016/j.aca.2012.04.029
- [23] COLON, L. A. Monolithic columns in liquid phase separations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2013, roč. 405, č. 7, s. 2093–2094. ISSN 16182642. DOI 10.1007/s00216-012-6694-z
- [24] KUČEROVÁ, B., L. KRČMOVÁ, D. SOLICHOVÁ, J. PLÍŠEK a P. SOLICH. Comparison of a new high-resolution monolithic column with core-shell and fully porous columns for the analysis of retinol and α -tocopherol in human serum and breast milk by ultra-high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*. 2013, roč. 36, č. 14, s. 2223–2230. ISSN 16159306. DOI 10.1002/jssc.201300242
- [25] EELTINK, S., S. WOUTERS, J. L. DORES-SOUSA a F. SVEC. Advances in organic polymer-based monolithic column technology for high-resolution liquid chromatography-mass spectrometry profiling of antibodies, intact proteins, oligonucleotides, and peptides. *Journal of Chromatography A*. 2016, roč. 1498, č. 1, s. 8-21. ISSN 18733778. DOI 10.1016/j.chroma.2017.01.002
- [26] SVEC, F. a J. M. J. FRECHET. Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media. *Analytical Chemistry*. 1992, roč. 64, č. 7, s. 820–822. ISSN 0003-2700. DOI 10.1021/ac00031a022
- [27] SANTASANIA, C. T. . a D. S. BELL. Mechanisms of Interaction Responsible for Alternative Selectivity of Fluorinated Stationary Phases. *Lc-Gc N. Am*. 2016, roč. 34, č. 2, s. 92–105. ISSN 15275949.
- [28] BACALUM, E. a M. CHEREGI. Recent analytical applications of fluorinated hydrocarbon-based stationary phases in HPLC. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 2017, roč. 40, č. 2, s. 59–68. ISSN 1082-6076. DOI 10.1080/10826076.2017.1284676
- [29] TAYLOR, B. T. Getting the Most from Phenyl Stationary Phases for HPLC. *LCGC magazine*. 2016.
- [30] BOCIAN, S. a B. BUSZEWSKI. Phenyl-bonded stationary phases-The influence of polar functional groups on retention and selectivity in reversed-phase liquid chromatography. *Journal of Separation Science*. 2014, roč. 37, č. 23, s. 3435–3442. ISSN 16159314. DOI 10.1002/jssc.201400764
- [31] HEMSTRÖM, P. a K. IRGUM. Hydrophilic interaction chromatography. *Journal of Separation Science*.

- 2006, roč. 29, č. 12, s. 1784–1821. ISSN 16159306. DOI 10.1002/jssc.200600199
- [32] BUSZEWSKI, B. a S. NOGA. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, roč. 402, č. 1, s. 231–247. ISSN 16182642. DOI 10.1007/s00216-011-5308-5
- [33] *Waters - HILIC*. [online] [cit. 2017-06-26]. Dostupné z: http://www.waters.com/waters/en_CZ/Atlantis-Columns/nav.htm?cid=513211&locale=en_CZ
- [34] EVANS, H. a K. S. BISHOP. *On the Existence of a Hitherto Unrecognized Dietary Factor Essential for Reproduction: On the Existence of a Hitherto Unrecognized Dietary Factor Essential for Reproduction*. *Science*. 1922, roč. 56, č. 1, s. 650-1.
- [35] NIKI, E. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. *Free Radical Biology and Medicine*. 2014, roč. 66, č. 1, s. 3–12. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2013.03.022
- [36] COLOMBO, M. L. An update on vitamin E, tocopherol and tocotrienol-perspectives. *Molecules*. 2010, roč. 15, č. 4, s. 2103–2113. ISSN 14203049. DOI 10.3390/molecules15042103
- [37] TRABER, M. G. a J. ATKINSON. Vitamin E, antioxidant and nothing more. *Free Radical Biology and Medicine*. 2007, roč. 43, č. 1, s. 4–15. ISSN 08915849. DOI 10.1016/j.freeradbiomed.2007.03.024
- [38] HOSOMI, A., M. ARITA, Y. SATO, C. KIYOSE, T. UEDA, O. IGARASHI, H. ARAI a K. INOUE. Affinity for α -tocopherol transfer protein as a determinant of the biological activities of vitamin E analogs. *FEBS Letters*. 1997, roč. 409, č. 1, s. 105–108. ISSN 00145793. DOI 10.1016/S0014-5793(97)00499-7
- [39] WAGNER, K. H., A. KAMAL-ELDIN a I. ELMADFA. Gamma-tocopherol--an underestimated vitamin? *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2004/07/17. 2004, roč. 48, č. 3, s. 169–188. DOI 10.1159/000079555
- [40] CERVINKOVA, B., L. K. KRCMOVA, D. SOLICHOVA, B. MELICHAR a P. SOLICH. Recent advances in the determination of tocopherols in biological fluids: From sample pretreatment and liquid chromatography to clinical studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016, roč. 408, č. 10, s. 2407–2424. ISSN 16182650. DOI 10.1007/s00216-015-9214-0
- [41] ULATOWSKI, L. a D. MANOR. Vitamin E trafficking in neurologic health and disease. *Annual review of nutrition*. 2013, roč. 33, č. 1, s. 87–103. ISSN 1545-4312. DOI 10.1146/annurev-nutr-071812-161252
- [42] SMOLAREK, A. K. a N. SUH. Chemopreventive activity of vitamin e in breast cancer: A focus on γ - and δ -tocopherol. *Nutrients*. 2011, roč. 3, č. 11, s. 962–986. ISSN 20726643. DOI 10.3390/nu3110962
- [43] MYUNG, S.-K., Y. KIM, W. JU, H. J. CHOI a W. K. BAE. Effects of antioxidant supplements on cancer prevention: meta-analysis of randomized controlled trials. *Annals of Oncology*. 2010, roč. 21, č. 1, s. 166–179. ISSN 0923-7534. DOI 10.1093/annonc/mdp286
- [44] GUAN, F., G. LI, A. B. LIU, M.-J. LEE, Z. YANG, Y.-K. CHEN, Y. LIN, W. SHIH a C. S. YANG. delta- and gamma-Tocopherols, but not alpha-Tocopherol, Inhibit Colon Carcinogenesis in Azoxymethane-Treated F344 Rats. *Cancer Prevention Research*. 2012, roč. 5, č. 4, s. 644–654. DOI 10.1158/1940-6207.capr-11-0521
- [45] NAYEEM, F., M. NAGAMANI, K. E. ANDERSON, Y. HUANG, J. J. GRADAY a L.-J. W. LU. Dietary beta-Tocopherol and Linoleic Acid, Serum Insulin, and Waist Circumference Predict Circulating Sex Hormone-Binding Globulin in Premenopausal Women. *Journal of Nutrition*. 2009, roč. 139, č. 6, s. 1135–1142. DOI 10.3945/jn.108.103291
- [46] SALDEEN, K. a T. SALDEEN. Importance of tocopherols beyond alpha-tocopherol: evidence from animal

- and human studies. *Nutrition Research*. 2005, roč. 25, č. 10, s. 877–889. DOI 10.1016/j.nutres.2005.09.019
- [47] YANG, C. S. a N. SUH. Cancer prevention by different forms of tocopherols. *Topics in Current Chemistry*. 2013, roč. 329, č. 1, s. 21–34. ISSN 03401022. DOI 10.1007/128-2012-345
- [48] BLOMHOFF, R. a H. K. BLOMHOFF. Overview of retinoid metabolism and function. *Journal of Neurobiology*. 2006, roč. 66, č. 7, s. 606–630. ISSN 00223034. DOI 10.1002/neu.20242
- [49] INSEL, P., D. ROSS, K. MCMAHON a M. BERNSTEIN. *Nutrition*. 5. vyd. Burlington: Jones & Bartlett Learning, 2013. ISBN-13: 978-1284064650.
- [50] INSTITUTE OF MEDICINE (U.S.). PANEL ON MICRONUTRIENTS. *DRI : dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc : a report of the Panel on Micronutrients and the Standing Committee on the Scientific*. B.m.: National Academy Press, 2001. ISBN 0309072794.
- [51] DAWSON, M. I. The importance of vitamin A in nutrition. *Current pharmaceutical design*. 2000, roč. 6, č. 3, s. 311–325. ISSN 13816128. DOI 10.2174/1381612003401190
- [52] RUSSELL, M. R. a M. P. SUTER. *Vitamin and Trace Mineral Deficiency and Excess | Harrison's Principles of Internal Medicine, 18e | AccessMedicine | McGraw-Hill Medical*. 15. vyd. 2001.
- [53] GILBERT, C. How to manage children with the eye signs of vitamin A deficiency. *Community Eye Health Journal*. 2013, roč. 26, č. 84, s. 68–68. ISSN 09536833.
- [54] ABDELMALEK, M. a J. SPENCER. Retinoids and wound healing. *Dermatologic Surgery*. 2006, roč. 32, č. 10, s. 1219–1230. ISSN 10760512. DOI 10.1111/j.1524-4725.2006.32280.x
- [55] ALIZADEH, F., A. BOLHASSANI, A. KHAVARI, S. Z. BATHAIE, T. NAJI a S. A. BIDGOLI. Retinoids and their biological effects against cancer. *International Immunopharmacology*. 2014, roč. 18, č. 1, s. 43–49. ISSN 15675769. DOI 10.1016/j.intimp.2013.10.027
- [56] PATTERSON, R. E., E. WHITE, A. R. KRISTAL, M. L. NEUHOUSER a J. D. POTTER. Vitamin supplements and cancer risk: The epidemiologic evidence. *Cancer Causes and Control*. 1997, roč. 8, č. 5, s. 786–802. ISSN 09575243. DOI 10.1023/A:1018443724293
- [57] LAI, J. F. a A. A. FRANKE. Analysis of circulating lipid-phase micronutrients in humans by HPLC: Review and overview of new developments. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2013, roč. 931, s. 23–41. ISSN 15700232. DOI 10.1016/j.jchromb.2013.04.031
- [58] URBÁNEK, L., D. SOLICHOVÁ, B. MELICHAR, J. DVOŘÁK, I. SVOBODOVÁ a P. SOLICH. Optimization and validation of a high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of vitamins A and E in human serum using monolithic column and diode-array detection. *Analytica Chimica Acta*. 2006, roč. 573–574, č. 1, s. 267–272. ISSN 00032670. DOI 10.1016/j.aca.2006.02.032
- [59] ABIDIN, S. Z., M. J. IBAHIM a M. H. RAJIKIN. Determination of vitamin E isomers in plasma using ultra performance liquid chromatography. *The Malaysian Journal of Analytical Sciences*. 2012, roč. 16, č. 1, s. 71–78.
- [60] MOLTO-PUIGMARTI, C., A. I. CASTELLOTE a M. C. LOPEZ-SABATER. Ultra-High-Pressure Liquid Chromatographic method for the analysis of tocopherols in human colostrum and milk. *Journal of*

- Chromatography A*. 2009, roč. 1216, č. 20, s. 4388–4394. DOI 10.1016/j.chroma.2009.02.088
- [61] SHARPLESS, K. S. a D. L. DUEWER. Population distributions and intralaboratory reproducibility for fat-soluble vitamin-related compounds in human serum. *Analytical chemistry*. 1995, roč. 67, č. 23, s. 4416–22. ISSN 0003-2700. DOI 10.1021/ac00119a034
- [62] MATA-GRANADOS, J. M., J. M. QUESADA GÓMEZ a M. D. LUQUE DE CASTRO. Fully automatic method for the determination of fat soluble vitamins and vitamin D metabolites in serum. *Clinica Chimica Acta*. 2009, roč. 403, č. 1–2, s. 126–130. ISSN 00098981. DOI 10.1016/j.cca.2009.01.029
- [63] THIBEAULT, D., H. SU, E. MACNAMARA a H. M. SCHIPPER. Isocratic rapid liquid chromatographic method for simultaneous determination of carotenoids, retinol, and tocopherols in human serum. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2009, roč. 877, č. 11–12, s. 1077–1083. ISSN 15700232. DOI 10.1016/j.jchromb.2009.02.051
- [64] KAŠPAROVÁ, M., J. PLÍŠEK, D. SOLICHOVÁ, L. KRČMOVÁ, B. KUČEROVÁ, M. HRONEK a P. SOLICH. Rapid sample preparation procedure for determination of retinol and α -tocopherol in human breast milk. *Talanta*. 2012, roč. 93, č. 1, s. 147–152. ISSN 00399140. DOI 10.1016/j.talanta.2012.01.065
- [65] FRANKE, A. A., C. M. MORRISON, L. J. CUSTER, X. N. LI a J. F. LAI. Simultaneous analysis of circulating 25-hydroxy-vitamin D3, 25-hydroxy-vitamin D2, retinol, tocopherols, carotenoids, and oxidized and reduced coenzyme Q10 by high performance liquid chromatography with photo diode-array detection using C18 and C30 column. *Journal of Chromatography A*. 2013, roč. 1301, č. 1, s. 1–9. DOI 10.1016/j.chroma.2013.05.027
- [66] RUPEREZ, F. J., D. MARTIN, E. HERRERA a C. BARBAS. Chromatographic analysis of alpha-tocopherol and related compounds in various matrices. *Journal of Chromatography A*. 2001, roč. 935, č. 1–2, s. 45–69. DOI 10.1016/S0021-9673(01)01101-3
- [67] ANDREOLI, R., P. MANINI, D. POLI, E. BERGAMASCHI, A. MUTTI a W. M. A. NIESSSEN. Development of a simplified method for the simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol, and beta-carotene in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2004, roč. 378, č. 4, s. 987–994. DOI 10.1007/s00216-003-2288-0
- [68] LIU, Z., X. KANG a F. FANG. Solid phase extraction with electrospun nanofibers for determination of retinol and α -tocopherol in plasma. *Microchimica Acta*. 2010, roč. 168, č. 1–2, s. 59–64. ISSN 00263672. DOI 10.1007/s00604-009-0263-y
- [69] OF, J., H. U. MELCHERT a E. PABEL. Quantitative determination of α -, β -, γ - and δ -tocopherols in human serum by high-performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry as trimethylsilyl derivatives with a two-step sample preparation. *Journal of Chromatography A*. 2000, roč. 896, č. 1–2, s. 209–215. ISSN 00219673. DOI 10.1016/S0021-9673(00)00682-8
- [70] GREBENSTEIN, N. a J. FRANK. Rapid baseline-separation of all eight tocopherols and tocotrienols by reversed-phase liquid-chromatography with a solid-core pentafluorophenyl column and their sensitive quantification in plasma and liver. *Journal of Chromatography A*. 2012, roč. 1243, č. 1, s. 39–46. ISSN 00219673. DOI 10.1016/j.chroma.2012.04.042
- [71] KAND'AR, R., P. NOVOTNA a P. DRABKOVA. Determination of Retinol, alpha-Tocopherol, Lycopene, and

- beta-Carotene in Human Plasma Using HPLC with UV-Vis Detection: Application to a Clinical Study. *Journal of Chemistry*. 2013. DOI 10.1155/2013/460242
- [72] VATASSERY, G. T., ADITYANJEE, H. T. QUACH, W. E. SMITH, M. a KUSKOWSKI a D. MELNYK. Alpha and gamma tocopherols in cerebrospinal fluid and serum from older, male, human subjects. *Journal of the American College of Nutrition*. 2004, roč. 23, č. 3, s. 233–8. ISSN 0731-5724. DOI 10.1080/07315724.2004.10719366
- [73] ŘIMNÁČOVÁ, L., P. HUŠEK a P. ŠIMEK. A new method for immediate derivatization of hydroxyl groups by fluoroalkyl chloroformates and its application for the determination of sterols and tocopherols in human serum and amniotic fluid by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2014, roč. 1339, č. 1, s. 154–167. ISSN 18733778. DOI 10.1016/j.chroma.2014.03.007
- [74] MACCREHAN, W. A. Determination of retinol, alpha-tocopherol, and beta-carotene in serum by liquid-chromatography. *Methods in Enzymology*. 1990, roč. 189, č. 1, s. 172–181.
- [75] CITOVÁ, I., L. HAVLÍKOVÁ, L. URBÁNEK, D. SOLICHOVÁ, L. NOVÁKOVÁ a P. SOLICH. Comparison of a novel ultra-performance liquid chromatographic method for determination of retinol and α -tocopherol in human serum with conventional HPLC using monolithic and particulate columns. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007, roč. 388, č. 3, s. 675–681. ISSN 16182642. DOI 10.1007/s00216-007-1237-8
- [76] GRANADO-LORENCIO, F., C. HERRERO-BARBUDO, I. BLANCO-NAVARRO a B. PÉREZ-SACRISTÁN. Suitability of ultra-high performance liquid chromatography for the determination of fat-soluble nutritional status (vitamins A, E, D, and individual carotenoids). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010, roč. 397, č. 3, s. 1389–1393. ISSN 16182642. DOI 10.1007/s00216-010-3655-2
- [77] KHAN, M. I., A. KHAN, Z. IQBAL, L. AHMAD a Y. SHAH. Optimization and Validation of RP-LC/UV-VIS Detection Method for Simultaneous Determination of Fat-Soluble Anti-Oxidant Vitamins, all-trans-Retinol and α -Tocopherol in Human Serum: Effect of Experimental Parameters. *Chromatographia*. 2010, roč. 71, č. 7–8, s. 577–586. ISSN 0009-5893. DOI 10.1365/s10337-010-1486-0
- [78] AGUILÓ, A., P. TAULER, E. FUENTESPINA, J. A. TUR, A. CÓRDOVA a A. PONS. Antioxidant response to oxidative stress induced by exhaustive exercise. *Physiology & Behavior*. 2005, roč. 84, č. 1, s. 1–7. ISSN 00319384. DOI 10.1016/j.physbeh.2004.07.034
- [79] KRCMOVA, L., L. URBANEK, D. SOLICHOVA, M. KASPAROVA, H. VLCKOVA, B. MELICHAR, L. SOBOTKA a P. SOLICH. HPLC method for simultaneous determination of retinoids and tocopherols in human serum for monitoring of anticancer therapy. *Journal of Separation Science*. 2009, roč. 32, č. 15–16, s. 2804–2811. DOI 10.1002/jssc.200900239
- [80] CAPOTE, F. P., J. R. JIMÉNEZ, J. M. M. GRANADOS a M. D. L. DE CASTRO. Identification and determination of fat-soluble vitamins and metabolites in human serum by liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry with multiple reaction monitoring. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. 2007, roč. 21, č. 11, s. 1745–1754. ISSN 09514198. DOI 10.1002/rcm.3014
- [81] PALIAKOV, E. M., B. S. CROW, M. J. BISHOP, D. NORTON, J. GEORGE a J. A. BRALLEY. Rapid quantitative determination of fat-soluble vitamins and coenzyme Q-10 in human serum by reversed phase ultra-high pressure liquid chromatography with UV detection. *Journal of Chromatography B: Analytical*

- Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2009, roč. 877, č. 1–2, s. 89–94. ISSN 15700232. DOI 10.1016/j.jchromb.2008.11.012
- [82] PLÍŠEK, J., M. KAŠPAROVÁ, D. SOLICHOVÁ, L. KRČMOVÁ, B. KUČEROVÁ, L. SOBOTKA a P. SOLICH. Application of core-shell technology for determination of retinol and alpha-tocopherol in breast milk. *Talanta*. 2013, roč. 107, č. 1, s. 382–388. ISSN 00399140. DOI 10.1016/j.talanta.2013.01.031
- [83] HODA, S. A. *Rubin's Pathology: Clinicopathologic Foundations of Medicine*. B.m.: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2004. ISBN 978-1-60547-968-2. DOI 10.1001/jama.292.11.1376
- [84] PORTH, C. M. a G. MATFIN. *Pathophysiology: Concepts of Altered Health States, 8th Edition*. B.m.: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2009. ISBN 9781605473901.
- [85] WACHTER, H., D. FUCHS, A. HAUSEN, G. REIBNEGGER, G. WEISS, E. R. WERNER a G. WERNER-FELMAYER. *Neopterin. Biochemistry—methods—clinical application*. H. Wachter, D. Fuchs, A. Hausen, G. Reibnegger, G. Weiss, E. R. Werner and G. Werner-Felmayer. Walter de Gruyter: Berlin and New York. xiii + 294 pages. *DM188 (1992)*. New York: Walter de Gruyter & Co., 1992. ISBN 3110117908. DOI 10.1002/cbf.290100415
- [86] CANO, O. D., G. NEURAUTER, D. FUCHS, G. M. SHEARER a A. BOASSO. *Differential effect of type I and type II interferons on neopterin production and amino acid metabolism in human astrocyte-derived cells*. 2008. DOI 10.1016/j.neulet.2008.04.046
- [87] TOMANDL, J. Pteriny. *Chemická Listy*. 1998, roč. 92, č. 1, s. 689–697.
- [88] GHISONI, K., R. de P. MARTINS, L. BARBEITO a A. LATINI. Neopterin as a potential cytoprotective brain molecule. *Journal of Psychiatric Research*. 2015, roč. 71, č. 1, s. 134–139. ISSN 18791379. DOI 10.1016/j.jpsychires.2015.10.003
- [89] SCHROECKSNADEL, K., C. MURR, C. WINKLER, B. WIRLEITNER, L. C. FUITH a D. FUCHS. Neopterin to monitor clinical pathologies involving interferon- γ production. *Pteridines*. 2004, roč. 15, č. 3, s. 75–90. ISSN 09334807. DOI 10.1515/pteridines.2004.15.3.75
- [90] REIBNEGGER, G., C. AICHBERGER, D. FUCHS, A. HAUSEN, M. SPIELBERGER, E. R. WERNER, R. MARGREITER a H. WACHTEHR. Posttransplant neopterin excretion in renal allograft recipients--a reliable diagnostic aid for acute rejection and a predictive marker of long-term graft survival. *Transplantation*. 1991, roč. 52, č. 1, s. 58–63. ISSN 0041-1337 (Print).
- [91] LIM, K. L., a C. JONES, N. S. BROWN a R. J. POWELL. Urine neopterin as a parameter of disease activity in patients with systemic lupus erythematosus: comparisons with serum sIL-2R and antibodies to dsDNA, erythrocyte sedimentation rate, and plasma C3, C4, and C3 degradation products. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 1993, roč. 52, č. 6, s. 429–435. ISSN 0003-4967. DOI 10.1136/ard.52.6.429
- [92] ALEKSANDROVA, K., S. C. CHUANG, H. BOEING, H. ZUO, G. S. TELL, T. PISCHON, M. JENAB, B. BUENO-DE-MESQUITA, S. E. VOLLSET, Øivind MIDTTUN, P. M. UELAND, V. FEDIRKO, M. JOHANSSON, E. WEIDERPASS, G. SEVERI, A. RACINE, M. C. BOUTRON-RUAULT, R. KAAKS, T. KUHN, A. TJØNNELAND, K. OVERVAD, J. R. QUIROS, P. JAKSZYN, M. J. SANCHEZ, M. DORRONSORO, M. D. CHIRLAQUE, E. ARDANAZ, K. T. KHAW, N. J. WAREHAM, R. C. TRAVIS, A. TRICHOPOULOU, P. LAGIOU, D. TRICHOPOULOS, D. PALLI, S. SIERI, R. TUMINO, S. PANICO, A. M. MAY, R. PALMQVIST, I. LJUSLINDER, S. Y. J. KONG, H. FREISLING, M. J. GUNTER, Y. LU, A. J. CROSS, E. RIBOLI a P. VINEIS. A prospective study of the immune system activation biomarker neopterin and colorectal cancer risk. *Journal of the National Cancer Institute*. 2015, roč. 107, č. 4,

s. djv010-djv010. ISSN 14602105. DOI 10.1093/jnci/djv010

- [93] VOLGGER, B. M., G. H. WINDBICHLER, A. G. ZEIMET, A. H. GRAF, G. BOGNER, L. ANGLEITNER-BOUBENIZEK, M. ROHDE, U. DENISON, G. SLIUTZ, L. C. FUITH, D. FUCHS a C. MARTH. Long-term significance of urinary neopterin in ovarian cancer: a study by the Austrian Association for Gynecologic Oncology (AGO). *Annals of Oncology*. 2016, roč. 27, č. 9, s. 1740–1746. ISSN 0923-7534. DOI 10.1093/annonc/mdw248
- [94] PILKA, R., R. MAREK, T. ADAM, M. KUDELA, D. ONDROVÁ, D. NEUBERT, J. HAMBÁLEK, M. MADRKA, D. SOLICHOVÁ, L. K. KRMOVÁ a B. MELICHAR. Systemic inflammatory response after open, laparoscopic and robotic surgery in endometrial cancer patients. *Anticancer Research*. 2016, roč. 36, č. 6, s. 2909–2922. ISSN 02507005.
- [95] DAVIS, I. a A. LIU. What is the tryptophan kynurenine pathway and why is it important to neurotherapeutics? *Expert Review of Neurotherapeutics*. 2015, roč. 15, č. 7, s. 719–721. ISSN 1473-7175. DOI 10.1586/14737175.2015.1049999
- [96] OXENKRUG, G. F. Tryptophan-kynurenine metabolism as a common mediator of genetic and environmental impacts in major depressive disorder: The serotonin hypothesis revisited 40 years later. *Israel Journal of Psychiatry and Related Sciences*. 2010, roč. 47, č. 1, s. 56–63. ISSN 03337308. DOI 10.1016/j.neulet.2010.11.003.Melatonin
- [97] CHEN, Y. a G. J. GUILLEMIN. Kynurenine pathway metabolites in humans: Disease and healthy states. *International Journal of Tryptophan Research*. 2009, roč. 2, č. 1, s. 1–19. ISSN 11786469. DOI 10.4137/ijtr.s2097
- [98] PAGANA, K. D. a T. J. PAGANA. *Mosby's Manual of Diagnostic and Laboratory Tests*. 5. vyd. Missouri: Elsevier Inc., 2009. ISBN 978-0-323-08949-4. DOI HSC 616.0756 PAG
- [99] HUANG, Y., A. LOUIE, Q. YANG, N. MASSENKOFF, C. XU, P. W. HUNT a W. GEE. A simple LC–MS/MS method for determination of kynurenine and tryptophan concentrations in human plasma from HIV-infected patients. *Bioanalysis*. 2013, roč. 5, č. 11, s. 1397–1407. ISSN 1757-6180. DOI 10.4155/bio.13.74
- [100] KRCMOVA, L., D. SOLICHOVA, B. MELICHAR, M. KASPAROVA, J. PLISEK, L. SOBOTKA a P. SOLICH. Determination of neopterin, kynurenine, tryptophan and creatinine in human serum by high throughput HPLC. *Talanta*. 2011, roč. 85, č. 3, s. 1466–1471. ISSN 00399140. DOI 10.1016/j.talanta.2011.06.027
- [101] DE JONG, W. H. A., R. SMIT, S. J. L. BAKKER, E. G. E. DE VRIES a I. P. KEMA. Plasma tryptophan, kynurenine and 3-hydroxykynurenine measurement using automated on-line solid-phase extraction HPLC-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2009, roč. 877, č. 7, s. 603–609. ISSN 15700232. DOI 10.1016/j.jchromb.2009.01.015
- [102] FUERTIG, R., A. CECI, S. M. CAMUS, E. BEZARD, A. H. LUIPPOLD a B. HENGERER. LC-MS/MS-based quantification of kynurenine metabolites, tryptophan, monoamines and neopterin in plasma, cerebrospinal fluid and brain. *Bioanalysis*. 2016, roč. 8, č. 18, s. 1903–1917. ISSN 1757-6199. DOI 10.4155/bio-2016-0111
- [103] DUTOV, A. A., D. A. NIKITIN, Z. T. RINCHINOV, P. P. TERESHKOV, P. P. TSYDENDAMBAEV a A. A. FEDOTOVA. HPLC determination of neopterin in biological liquids for clinical purposes. *Russian Journal of Physical Chemistry A*. 2007, roč. 81, č. 3, s. 421–423. ISSN 0036-0244. DOI 10.1134/S0036024407030223

- [104] CARRU, C., A. ZINELLU, S. SOTGIA, R. SERRA, M. F. USAI, G. F. PINTUS, G. M. PES a L. DEIANA. A new HPLC method for serum neopterin measurement and relationships with plasma thiols levels in healthy subjects. *Biomedical Chromatography*. 2004, roč. 18, č. 6, s. 360–366. ISSN 02693879. DOI 10.1002/bmc.325
- [105] GUIBAL, P., N. LEÉ, D. DOUMMAR, N. GIRAUD, E. ROZE, D. RODRIGUEZ, R. COUDERC, T. BILLETTE, D. VILLEMEUR a F. MOUSSA. Simultaneous Determination of All Forms of Biopterin and Neopterin in Cerebrospinal Fluid. *ACS Chem Neurosci*. 2014, roč. 5, č. 7, s. 534–541. DOI 10.1021/cn4001928
- [106] SANTAGATA, S., E. DI CARLO, C. CARDUCCI, V. LEUZZI, A. ANGELONI a C. CARDUCCI. Development of a new UPLC-ESI-MS/MS method for the determination of biopterin and neopterin in dried blood spot. *Clinica Chimica Acta*. 2017, roč. 466, č. 1, s. 145–151. ISSN 18733492. DOI 10.1016/j.cca.2017.01.019
- [107] DE CASTRO, M. R., G. S. DI MARCO, D. Y. ARITA, L. C. TEIXEIRA, A. B. PEREIRA a D. E. CASARINI. Urinary neopterin quantification by reverse-phase high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 2004, roč. 59, č. 3, s. 275–283. ISSN 0165022X. DOI 10.1016/j.jbbm.2004.03.004
- [108] DALE, R. C., F. BRILOT, E. FAGAN a J. EARL. Cerebrospinal fluid neopterin in paediatric neurology: A marker of active central nervous system inflammation. *Developmental Medicine and Child Neurology*. 2009, roč. 51, č. 4, s. 317–323. ISSN 00121622. DOI 10.1111/j.1469-8749.2008.03225.x
- [109] SULTANA, R., G. CENINI a D. A. BUTTERFIELD. Biomarkers of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases. In: *Molecular Basis of Oxidative Stress*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013, s. 359–376. ISBN 9781118355886. DOI 10.1002/9781118355886.ch14
- [110] HALLIWELL, B. Why and how should we measure oxidative DNA damage in nutritional studies? How far have we come? *The American journal of clinical nutrition*. 2000, roč. 72, č. 5, s. 1082–7. ISSN 0002-9165.
- [111] NUNOMURA, A., G. PERRY, M. A. PAPPOLLA, R. WADE, K. HIRAI, S. CHIBA a M. A. SMITH. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *The Journal of neuroscience*. 1999, roč. 19, č. 6, s. 1959–1964. ISSN 0270-6474.
- [112] LENNARZ, W. J., M. D. LANE a D. O. ZHARKOV. DNA Oxidation. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013, s. 77–81. ISBN 978-0-12-443710-4. DOI 10.1016/B978-0-12-378630-2.00240-1
- [113] ABE, T., C. ISOBE, T. MURATA, C. SATO a H. TOHGI. Alteration of 8-hydroxyguanosine concentrations in the cerebrospinal fluid and serum from patients with Parkinson's disease. *Neuroscience Letters*. 2003, roč. 336, č. 2, s. 105–108. ISSN 03043940. DOI 10.1016/S0304-3940(02)01259-4
- [114] FAGAN, A. M. a R. J. PERRIN. Upcoming candidate cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. *Biomarkers in Medicine*. 2012, roč. 6, č. 4, s. 455–476. ISSN 1752-0363. DOI 10.2217/bmm.12.42
- [115] LOFT, S., A. OLSEN, P. MØLLER, H. E. POULSEN a A. TJØNNELAND. Association between 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine excretion and risk of postmenopausal breast cancer: Nested case - Control study. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 2013, roč. 22, č. 7, s. 1289–1296. ISSN 10559965. DOI 10.1158/1055-9965.EPI-13-0229
- [116] BORREGO, S., A. VAZQUEZ, F. DASÍ, C. CERDA, A. IRADI, C. TORMOS, J. M. SANCHEZ, L. BAGAN, J. BOIX, C. ZARAGOZA, J. CAMPS a G. SAEZ. Oxidative stress and DNA damage in human gastric carcinoma: 8-Oxo-

- 7'-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) as a possible tumor marker. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, roč. 14, č. 2, s. 3467–3486. ISSN 16616596. DOI 10.3390/ijms14023467
- [117] HONDA, M., Y. YAMADA, M. TOMONAGA, H. ICHINOSE a S. KAMIHIRA. Correlation of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), a biomarker of oxidative DNA damage, and clinical features of hematological disorders: A pilot study. *Leukemia Research*. 2000, roč. 24, č. 6, s. 461–468. ISSN 01452126. DOI 10.1016/S0145-2126(00)00006-0
- [118] ZHANG, S. W., J. XING, L. S. CAI a C. Y. WU. Molecularly imprinted monolith in-tube solid-phase microextraction coupled with HPLC/UV detection for determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in urine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, roč. 395, č. 2, s. 479–487. ISSN 16182642. DOI 10.1007/s00216-009-2964-9
- [119] KHADEM-ANSARI, M.-H., Z. SHAHSAVARI, Y. RASMI a R. MAHMOODLO. Elevated levels of urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 8-isoprostane in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Carcinogenesis*. 2011, roč. 10, č. 1, s. 14. ISSN 1477-3163. DOI 10.4103/1477-3163.79683
- [120] SUZUKI, S., T. SHISHIDO, M. ISHINO, S. KATOH, T. SASAKI, S. NISHIYAMA, T. MIYASHITA, T. MIYAMOTO, J. NITOE, T. WATANABE, Y. TAKEISHI a I. KUBOTA. 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine is a prognostic mediator for cardiac event. *European Journal of Clinical Investigation*. 2011, roč. 41, č. 7, s. 759–766. ISSN 00142972. DOI 10.1111/j.1365-2362.2010.02465.x
- [121] NAKAJIMA, H. The Relation of Urinary 8-OHdG, A Marker of Oxidative Stress to DNA, and Clinical Outcomes for Ischemic Stroke. *The Open Neurology Journal*. 2012, roč. 6, č. 1, s. 51–57. ISSN 1874205X. DOI 10.2174/1874205X01206010051
- [122] HOSOZUMI, C., A. TORIBA, T. CHUESAARD, T. KAMEDA, N. TANG a K. HAYAKAWA. Analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human urine using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2012, roč. 893–894, č. 1, s. 173–176. ISSN 15700232. DOI 10.1016/j.jchromb.2012.02.043
- [123] COOKE, M. S., L. BARREGARD, V. MISTRY, N. POTDAR, R. ROZALSKI, D. GACKOWSKI, A. SIOMEK, M. FOKSINSKI, P. SVOBODA, H. KASAI, J. C. KONJE, G. SALLSTEN, M. D. EVANS a R. OLINSKI. Interlaboratory comparison of methodologies for the measurement of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Biomarkers*. 2009, roč. 14, č. 2, s. 103–110. ISSN 1354-750X. DOI 10.1080/13547500802706012
- [124] CROW, B., M. BISHOP, K. KOVALCIK, D. NORTON, J. GEORGE a J. A. BRALLEY. A simple and cost effective method for the quantification of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine from urine using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Biomedical Chromatography*. 2008, roč. 22, č. 4, s. 394–401. ISSN 02693879. DOI 10.1002/bmc.946
- [125] REN, L., J. FANG, G. LIU, J. ZHANG, Z. ZHU, H. LIU, K. LIN, H. ZHANG a S. LU. Simultaneous determination of urinary parabens, bisphenol A, triclosan, and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016, roč. 408, č. 10, s. 2621–2629. ISSN 1618-2642. DOI 10.1007/s00216-016-9372-8
- [126] HARRI, M., H. KASAI, T. MORI, J. TORNAEUS, K. SAVELA a K. PELTONEN. Analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in urine using high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2007, roč. 853, č. 1–2, s. 242–246. ISSN 15700232. DOI

10.1016/j.jchromb.2007.03.016

- [127] SYSLOVÁ, K., P. KAČER, M. KUZMA, A. PANKRÁCOVÁ, Z. FENCLOVÁ, Š. VLČKOVÁ, J. LEBEDOVÁ a D. PELCLOVÁ. LC-ESI-MS/MS method for oxidative stress multimarker screening in the exhaled breath condensate of asbestosis/silicosis patients. *Journal of Breath Research*. 2010, roč. 4, č. 1, s. 17104. ISSN 1752-7155. DOI 10.1088/1752-7155/4/1/017104
- [128] DOMIJAN, A.-M. a M. PERAICA. Determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in Urine Using HPLC With Electrochemical Detection. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2008, roč. 59, č. 4, s. 277–282. ISSN 0004-1254. DOI 10.2478/10004-1254-59-2008-1879
- [129] MALAYAPPAN, B., T. J. GARRETT, M. SEGAL a C. LEEUWENBURGH. Urinary analysis of 8-oxoguanine, 8-oxoguanosine, fapy-guanine and 8-oxo-2'-deoxyguanosine by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry as a measure of oxidative stress. *Journal of Chromatography A*. 2007, roč. 1167, č. 1, s. 54–62. ISSN 00219673. DOI 10.1016/j.chroma.2007.08.024
- [130] HSU, W.-Y., W. T.-L. CHEN, W.-D. LIN, F.-J. TSAI, Y. TSAI, C.-T. LIN, W.-Y. LO, L.-B. JENG a C.-C. LAI. Analysis of urinary nucleosides as potential tumor markers in human colorectal cancer by high performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*. 2009, roč. 402, č. 1–2, s. 31–37. ISSN 00098981. DOI 10.1016/j.cca.2008.12.009
- [131] KATAOKA, H., K. MIZUNO, E. ODA a A. SAITO. Determination of the oxidative stress biomarker urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2016, roč. 1019, č. 1, s. 140–146. ISSN 1873376X. DOI 10.1016/j.jchromb.2015.08.028
- [132] RODRÍGUEZ-GONZALO, E., L. HERRERO-HERRERO a D. GARCÍA-GÓMEZ. Development, validation and application of a fast analytical methodology for the simultaneous determination of DNA- and RNA-derived urinary nucleosides by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*. 2016, roč. 1019, č. 1, s. 132–139. ISSN 15700232. DOI 10.1016/j.jchromb.2015.10.044
- [133] WANG, C. J., N. H. YANG, C. C. CHANG, S. H. LIOU a H. L. LEE. Rapid and simple one-step membrane extraction for the determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in human plasma by a combination of on-line solid phase extraction and LC-MS/MS. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2011, roč. 879, č. 30, s. 3538–3543. ISSN 15700232. DOI 10.1016/j.jchromb.2011.09.038
- [134] HU, J., W. ZHANG, H. MA, Y. CAI, G. SHENG a J. FU. Simultaneous determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and 5-methyl-2'-deoxycytidine in DNA sample by high performance liquid chromatography/positive electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2010, roč. 878, č. 28, s. 2765–2769. ISSN 15700232. DOI 10.1016/j.jchromb.2010.08.017
- [135] ZHANG, S., X. SONG, W. ZHANG, N. LUO a L. CAI. Determination of low urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine excretion with capillary electrophoresis and molecularly imprinted monolith solid phase microextraction. *Science of the Total Environment*. 2013, roč. 450–451, č. 1, s. 266–270. ISSN 00489697.

DOI 10.1016/j.scitotenv.2013.02.025

- [136] CHO, S. H., B. H. JUNG, S. H. LEE, W. Y. LEE, G. KONG a B. C. CHUNG. Direct determination of nucleosides in the urine of patients with breast cancer using column-switching liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Biomedical chromatography : BMC*. 2006, roč. 20, č. 11, s. 1229–1236. ISSN 0269-3879. DOI 10.1002/bmc.689
- [137] GREENHAFF, P. The nutritional biochemistry of creatine. *Journal of Nutritional Biochemistry*. 1997, roč. 8, č. 11, s. 610–618. ISSN 09552863. DOI 10.1016/S0955-2863(97)00116-2
- [138] OU, M., Y. SONG, S. LI, G. LIU, J. JIA, M. ZHANG, H. ZHANG a C. YU. LC-MS/MS method for serum creatinine: Comparison with enzymatic method and Jaffe method. *PLoS ONE*. 2015, roč. 10, č. 7, s. 1–13. ISSN 19326203. DOI 10.1371/journal.pone.0133912
- [139] HOU, H., W. XIONG, X. ZHANG, D. SONG, G. TANG a Q. HU. LC-MS-MS measurements of urinary creatinine and the application of creatinine normalization technique on cotinine in smokers' 24 hour urine. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2012, roč. 1, č. 1, s. 1–8. ISSN 20908865. DOI 10.1155/2012/245415
- [140] DODDER, N. G., S. S. C. TAI, L. T. SNIEGOSKI, N. F. ZHANG a M. J. WELCH. Certification of creatinine in a human serum reference material by GC-MS and LC-MS. *Clinical Chemistry*. 2007, roč. 53, č. 9, s. 1694–1699. ISSN 00099147. DOI 10.1373/clinchem.2007.090027
- [141] DASH, A. K. a A. SAWHNEY. A simple LC method with UV detection for the analysis of creatine and creatinine and its application to several creatine formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2002, roč. 29, č. 5, s. 939–945. ISSN 07317085. DOI 10.1016/S0731-7085(02)00167-X
- [142] ZIMA, T., V. TEPLAN, V. TESAŘ, J. RACEK, O. SCHUCK, J. JANDA, B. FRIEDECKÝ, Z. KUBÍČEK a J. KRATOCHVÍLA. Doporučení České nefrologické společnosti a České společnosti klinické biochemie ČLS JEP k vyšetřování glomerulární filtrace. *Česká společnost klinické biochemie*. 2009.
- [143] PEAKE, M. a M. WHITING. Measurement of Serum Creatinine – Current Status and Future Goals. *Clinical Biochemist Reviews*. 2006, roč. 27, č. 4, s. 173–184. ISSN 0159-8090.
- [144] ŠPIRKOVÁ, J., R. HYŠPLER a L. PAVLÍKOVÁ. *Laboratorní příručka UKBD, Fakultní nemocnice Hradec Králové*. 2015.
- [145] TICHÁ, A., R. HYŠPLER, L. KUJOVSKÁ KRČMOVÁ a D. SOLICHOVÁ. *Laboratorní příručka Výzkumné laboratoře III. interní gerontometabolické kliniky, Fakultní nemocnice Hradec Králové*. 2014.
- [146] *MediaLab Incorporated*. [online] [cit. 2017-06-26]. Dostupné z: https://www.medialabinc.net/minimizinig_reanalytical_variability_during_venipuncture.aspx
- [147] KOSAŘOVÁ, M. a T. MARDEŠIC. *Laboratorní příručka pro genetickou laboratoř, společnost Pronatal*. 2017.
- [148] *GUTTA Czechia*. [online] [cit. 2017-06-26]. Dostupné z: <http://guttacz.cz/portfolio/systemy-na-odbermoci/>
- [149] DVOŘÁK, K. *Všeobecná pravidla pro odběr bioptického materiálu a druhy bioptických odběrů, Masarykova Univerzita*. 2017.
- [150] *Pharmcare CZ*. [online] [cit. 2017-06-26]. Dostupné z: https://www.pharmcare.cz/cerdak_pece_o_rany/jak_aplikovat_na_ranu/
- [151] TAVERNIERS, I., M. DE LOOSE a E. VAN BOCKSTAELE. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2004, roč. 23,

č. 8, s. 535–552. ISSN 01659936. DOI 10.1016/j.trac.2004.04.001

- [152] *European Medicines Agency - Guideline on bioanalytical method validation, London 2011.* [online] [cit. 2017-06-26]. Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf
- [153] *U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Guidance for Industry, Bioanalytical method validation, May 2001.* [online] [cit. 2017-06-26]. Dostupné z: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidance/ucm070107.pdf>
- [154] MATUSZEWSKI, B. K., M. L. CONSTANZER a C. M. CHAVEZ-ENG. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*. 2003, roč. 75, č. 13, s. 3019–3030. ISSN 00032700. DOI 10.1021/ac020361s

9 PŘÍLOHY

1. ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ, V. ŠESTÁKOVÁ, D. SOLICHOVÁ a P. SOLICH. A fully validated bioanalytical method using an UHPLC–MS/MS system for quantification of DNA and RNA oxidative stress biomarkers. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2017, roč. 409, č. 14, s. 3611–3621. (IF₂₀₁₆ = 3,431)
2. ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ, D. SOLICHOVÁ, B. MELICHAR a P. SOLICH. Recent advances in the determination of tocopherols in biological fluids: from sample pretreatment and liquid chromatography to clinical studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2016, roč. 408, č. 10, s. 2407–2424. (IF₂₀₁₆ = 3,431)
3. ČERVINKOVÁ, B., L. K. KRČMOVÁ, S. KLABAČKOVÁ, D. SOLICHOVÁ a P. SOLICH. Rapid determination of lipophilic vitamins in human serum by ultra-high-performance liquid chromatography using a fluorinated column and a high throughput miniaturized liquid-liquid extraction. *Journal of Separation Science*. Přijato k publikování 06/2017. (IF₂₀₁₆ = 2,557)
4. KRČMOVÁ, L. K., B. ČERVINKOVÁ, D. SOLICHOVÁ, L. SOBOTKA, L. HANSMANOVA, B. MELICHAR a P. SOLICH. Fast and sensitive HPLC method for the determination of neopterin, kynurenine and tryptophan in amniotic fluid, malignant effusions and wound exudates. *Bioanalysis* 2015, roč. 7, č. 21., s. 2751-2762 (IF₂₀₁₆= 2,673)
5. ZEŽULOVÁ, M., M. BARTOUŠKOVÁ, E. HLÍDKOVÁ, T. ADAM, L. K. KRČMOVÁ, B. ČERVINKOVÁ, D. SOLICHOVÁ, M. ZLEVOROVÁ, K. CWIERTKA, D. FRIEDECKÝ, D. VRÁNA a B. MELICHAR. Citrulline as a biomarker of gastrointestinal toxicity in patients with rectal carcinoma treated with chemoradiation. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2016, roč. 54, č. 2, s. 305–14. (IF₂₀₁₆= 3,432)
6. ZEŽULOVÁ, M., M. BARTOUŠKOVÁ, E. HLÍDKOVÁ, J. JURÁŇOVÁ, B. ČERVINKOVÁ, E. KASALOVÁ, T. ADAM, L. K. KRČMOVÁ, D. SOLICHOVÁ, K. CWIERTKA, D. VRÁNA a B. MELICHAR. Prognostic Significance of Serum and Urinary Neopterin Concentrations in Patients with Rectal Carcinoma Treated with Chemoradiation. *Anticancer research*. 2016, roč. 36, č. 1, s. 287–92. (IF₂₀₁₆= 1,937)
7. AUFARTOVÁ, J., M. BLÁHA, E. KASALOVÁ, B. HONEGROVÁ, B. ČERVINKOVÁ, L. K. KRČMOVÁ, J. PLÍŠEK, M. LÁNSKÁ, L. SOBOTKA a D. SOLICHOVÁ. Blood levels of antioxidants during age-related macular degeneration treatment by rheohaemapheresis. *Biomedical Papers*. 2015, roč. 159, č. 3, s. 400–406. (IF₂₀₁₆= 0,894)