

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST  
2008 / 2009

Obor: O3 – Chemie

Detekce biomarkerů v kondenzátu  
vydechovaného vzduchu

–

Nová cesta diagnostiky plicních  
onemocnění

Erika Gedeonová  
Septima B  
Sportovní gymnázium Kladno  
Plzeňská, 3103, Kladno  
Středočeský kraj

Místo vypracování: VŠCHT Praha, ÚOT  
Vedoucí práce: Ing. Kamila Syslová  
Doc. Ing. Petr Kačer, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem předloženou práci vypracovala samostatně pod vedením Doc. Ing. Petra Kačera, Ph.D. a Ing. Kamily Syslové a uvedla jsem veškerou použitou literaturu v seznamu literatury.

.....

Poděkování:

Zde bych ráda poděkovala všem, kteří mi s vypracováním práce jakýmkoli způsobem pomohli.

Můj dík patří na prvním místě **Ing. Kamile Syslové** a **Doc. Ing. Petru Kačerovi, Ph.D.** za vedení práce a všestrannou pomoc při jejím zpracování.

Dále bych chtěla poděkovat **prof. Ing. Liboru Červenému, DrSc.** za možnost pracovat v jeho kolektivu.

Nemohu opominout **RNDr. Marii Pokornou**, organizátorku školního kola, která mi pomohla s administrativními záležitostmi a **RNDr. Hanu Vokounovou**, mou učitelku chemie.

## Anotace

Analýza kondenzátu vydechaného vzduchu (KVV) spočívá v kvantifikaci přítomných specifických látek, tzv. „biomarkerů“, jejichž koncentrační hladina je v důsledku probíhajících patologických dějů v dýchacích cestách a plicích významně zvýšena (oproti fyziologickému stavu), což je signálem pro zahájení terapie.

Předkládaná práce se zabývá vývojem multimarkerového screeningu KVV pro identifikaci a kvantifikaci řady významných biomarkerů oxidativního stresu - 8-isoprostan, prostaglandin E<sub>2</sub>, prostaglandin D<sub>2</sub>, malondialdehyd a 4-hydroxynonenal.

Principem vyvinutých metod je kombinace vhodné separační techniky – imunoextrakce a extrakce na pevné fázi (SPE) s vysoce selektivní a citlivou detekční metodou hmotnostní spektrometrií. Vyvinuté metody pro stanovení jednotlivých markerů v KVV lze charakterizovat vysokou přesností a správností nízkou chybou stanovení a nízkými limity detekce a kvantifikace.

Nedílnou součástí práce byla i klinická studie (realizovaná ve spolupráci s 1. LF UK), která ověřila vhodnost metody pro diferenciální neinvazivní diagnostiku oxidativního stresu.

# Obsah

Obsah.....	4
1 Seznam zkratek.....	5
2 Úvod.....	6
3 Teoretická část.....	7
3.1 Kondenzát vydechovaného vzduchu (KVV).....	7
3.1.1 Složení KVV.....	7
3.1.2 Odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu.....	8
3.2 Oxidativní stres.....	9
3.2.1 Markery oxidativního stresu.....	9
3.2.2 Oxidativní stres a poškození organismu.....	15
3.3 Metody stanovení biomarkerů v KVV.....	17
3.3.1 Extrakce biomarkerů.....	17
3.3.2 Hmotnostní spektrometrie (MS = mass spectrometry).....	18
3.4 Pracovní hypotéza.....	19
4 Metodika práce.....	20
4.1 Chemikálie a pomůcky.....	20
4.2 Syntéza standardu malondialdehydu a methylmalondialdehydu.....	21
4.3 Odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu.....	21
4.4 Stanovení $\alpha$ -amylasy v kondenzátu vydechovaného vzduchu.....	21
4.5 Stanovení koncentrace biomarkerů v KVV.....	21
4.5.2 LC-ESI-MS/MS analýza.....	22
4.6 Klinická studie.....	24
5 Výsledky a Diskuze.....	25
5.1 Odběr KVV.....	26
5.2 Stanovení kontaminace kondenzátu vydechovaného vzduchu slinami.....	26
5.3 HPLC/MS metoda.....	26
5.3.1 Extrakční metody.....	29
5.3.2 Extrakce afinitními sorbenty.....	29
5.3.3 Extrakce na pevné fázi - SPE.....	31
5.4 Stabilita markerů v kondenzátu vydechovaného vzduchu.....	31
5.4.1 Klinická studie.....	32
6 Závěr.....	33
7 Seznam literatury.....	34

## 1 Seznam zkratek

8-iso-PGF <sub>2α</sub>	8-isoprostan, 8-iso prostaglandin F <sub>2α</sub>
API	atmospheric pressure ionization (ionizace za atmosferického tlaku)
A <sub>λ</sub>	absorbance při vlnové délce λ
b	tloušťka vrstvy (cm)
c	látkové koncentrace (mol l <sup>-1</sup> ).
CID	Collision Induced Dissociation (kolizně indukovaná disociace)
COX	enzym cyklooxygenáza
ESI	electrospray ionization (elektrosprejová ionizace)
GC-MS	plynová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem
HNE	4-hydroxynonenal
HPLC-MS	vysokoučinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem
HPLC-UV	vysokoučinná kapalinová chromatografie s UV detekcí
KVV	kondenzát vydechaného vzduchu
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MDA	malondialdehyd
MeMDA	methylmalondialdehyd
MRM	Multiple Reaction Monitoring
PG	Prostaglandin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandin D <sub>2</sub>
RE	relative error (relativní chyba)
RSD	relative standard deviation (relativní směrodatná odchylka)
ROS	reactive oxygen species (reaktivní kyslíkové částice)
SPE	Solid Phase Extraction (extrakce na pevné fázi)
TMP	1,1,3,3-tetramethoxypropan
TXA <sub>2</sub>	thromboxan A <sub>2</sub>
VFN	všeobecná fakultní nemocnice
ε	molární absorpční koeficient (l mol <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup> )
μ	skutečné přidané množství
$\bar{x}$	průměr stanovené koncentrace

## 2 Úvod

Sledování specifických molekul produkovaných organismem při patologických procesech je v dnešní době součástí moderní lékařské diagnostiky. Běžně se setkáváme s analýzou látek v krevní plazmě a moči. Výsledky získané analýzou těchto tělních tekutin jsou odrazem procesů odehrávajících se v rámci celého organismu a k lokalizaci patologického procesu se využívají jen v omezené míře, případně pouze jako doplněk dalších diagnostických metod. K vyšetření nemocí plic a dýchacích cest (např. diagnostika bronchiálního astmatu, asbestózy, silikózy ad.) se v běžné praxi používá celá řada diagnostických metod, které jsou v naprosté většině metodami invazivními (bronchiální biopsie, bronchoalveolární laváž), případně *semi*-invazivními (metoda indukovaného sputa), ty jsou pro pacienta zatěžující, u dětí a seniorů mohou být dokonce až stresovou záležitostí. Včasná diagnostika plicních onemocnění ovšem hraje důležitou roli z hlediska zahájení účinné terapie a minimalizace poškození organismu pacienta.

Analýza kondenzátu vydechaného vzduchu je poměrně novou metodou, jež představuje alternativní cestu, kterou lze charakterizovat jako zcela neinvazivní a pro pacienta nezatěžující. Složení kondenzátu vydechaného vzduchu koresponduje s ději odehrávajícími se bezprostředně v plicích a dýchacích cestách, odkud se do něj dostává celá řada specifických látek.

Princip analýzy kondenzátu vydechaného vzduchu spočívá v kvantifikaci specifických látek pro uvedená onemocnění – tzv. „biomarkerů“, které se vyskytují v uvedené tělní tekutině a jejichž koncentrační hladina je v důsledku probíhajícího patologického procesu v dýchacích cestách a plicích významně zvýšena. K analýze dechového kondenzátu se používají biochemické metody, nebo metody využívající vysoce citlivé a specifické techniky na bázi hmotnostní spektrometrie. V současné době se problematika využití kondenzátu vydechaného vzduchu jako zdroje biomarkerů plicních onemocnění nachází ve stavu, kdy byla popsána celá řada metodik stanovení biomarkerů, ovšem výsledky uvedených studií vykazují značný rozptyl, daný opomenutím důležitých specifických faktorů, které je nutné respektovat při zpracování a následné analýze této tělní tekutiny.

Předkládaná práce si kladla za cíl postihnout a kvantifikovat parametry, které mohou být zdrojem v literatuře uváděných rozporuplných výsledků, a vypracovat protokol zpracování dechového kondenzátu a stanovení specifických biomarkerů oxidativního stresu (8-isoprostan, malondialdehyd, 4-hydroxynonenal, prostaglandin D<sub>2</sub> a prostaglandin E<sub>2</sub>) metodou hmotnostní spektrometrie. Výsledkem experimentální činnosti v této oblasti je vypracování metody kombinující extrakci biomarkerů s dostatečně citlivou a selektivní detekční metodou – hmotnostně-spektrometrickou analýzou, která umožňuje kvantifikaci těchto specifických látek.

### 3 Teoretická část

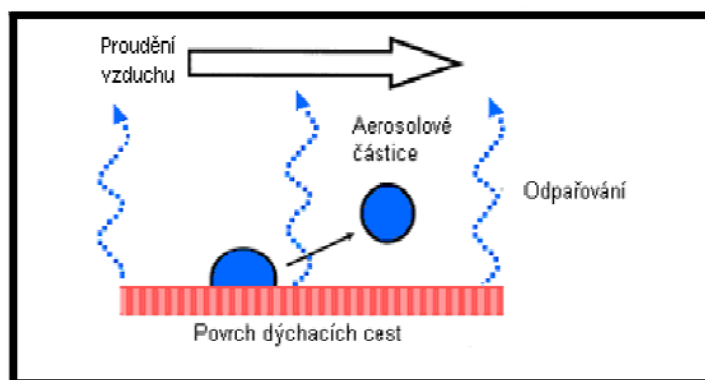
#### 3.1 Kondenzát vydechaného vzduchu (KVV)

##### 3.1.1 Složení KVV

Každý člověk během dne vydechne 15-25 m<sup>3</sup> vzduchu. Látky obsažené ve vydechaném vzduchu se nacházejí ve dvou fázích – v plynné a v kapalně (ve formě aerosolů) [1]. V plynné fázi jsou vedle dusíku, kyslíku, oxidu uhličitého, oxidu uhelnatého a oxidu dusnatého přítomny látky s dostatečnou tenzí par při tělesné teplotě a atmosférickém tlaku - voda, peroxid vodíku, uhlovodíky a řada dalších organických látek. V plynné frakci se nachází i ve vodě nerozpustné biomolekuly, které na epitelu plic a dýchacích cest spolu s vodou vytvářejí binární systém. Tenze par biomolekul a vody se v tomto případě sčítají, a tím se odpaří i látky, které jsou za normálních podmínek málo těkavé. Příkladem látek obohacující KVV touto cestou jsou leukotrieny a prostanoidy. Molekuly málo těkavých látek rozpustných ve vodě (vazoaktivní peptidy, enzymy, DNA, proteiny a soli) se do KVV dostávají jako aerosolové částice, které jsou strhávány z povrchu sliznice turbulentním prouděním vzduchu v bronších a bronchiolech (obrázek 1).

Zkondenzováním tohoto vzduchu se získá kapalná matrice označovaná jako kondenzát vydechaného vzduchu (KVV), která odráží složení bronchoalveolární extracelulární plicní tekutiny, jež koresponduje s ději odehrávajícími se bezprostředně v plicích a dýchacích cestách [2].

KVV obsahuje celou řadu z medicínského hlediska zajímavých látek - eikosanoidy (metabolity kyseliny arachidonové), peptidy, enzymy, DNA ad., kterých bylo k dnešnímu dni identifikováno více než 200 [3].



**Obrázek 1: Schéma obhacení vydechaného vzduchu látkami z organismu**

Z povrchu plicních sklípků a dýchacích cest se odpařují těkavé látky (plynná fáze) a strhávají malé kapičky, které unášejí proud vydechaného vzduchu (kapalná fáze – aerosolové kapičky)

V KVV byly detekovány specifické biomolekuly (tzv. biomarkery), které se vyskytují ve zvýšené koncentraci při patologických procesech, odehrávajících se v plicích. Jejich zvýšená hladina může signalizovat plicní onemocnění (např. *asthma bronchiale*, oxidativní stres, rakovinu plic,

cystickou fibrózu a další). Včasná diagnostika uvedených onemocnění hraje důležitou roli z hlediska zahájení účinné terapie a minimalizace poškození pacienta.

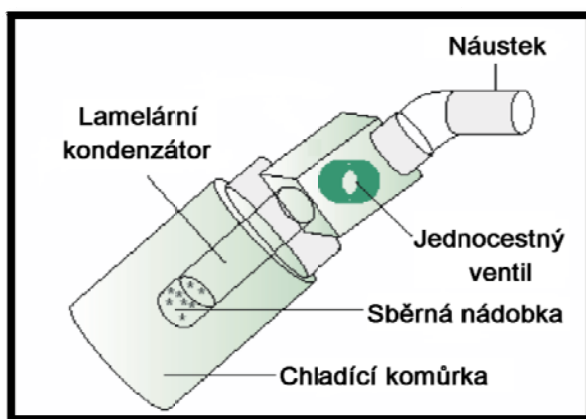
Výhodou KVV je, že odráží procesy odehrávající se výlučně v plicích, případně dýchacích cestách, a nikoliv v celém těle, jak je tomu v případě jiných tělních tekutin (v moči, krevní plazmě).

### 3.1.2 Odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu

Na specializovaných klinických pracovištích se získává KVV pomocí kondenzátoru vydechovaného vzduchu (obrázek 2), který zkapalní aerosolové částice a látky z plynné fáze. Hlavní částí kondenzátoru vydechovaného vzduchu je náustek, lapač slin, jednocestný ventil, sběrná nádobka a chladicí aparatura. Úkolem lapače slin je zamezení kontaminace slinami, neboť v nich byly stanoveny vysoké koncentrace biomarkerů (např. leukotrieny, 8-iso Prostaglandin  $F_{2\alpha}$  ad.) [4] přítomných v KVV. Možná kontaminace slinami se zjišťuje stanovením aktivity slinné  $\alpha$ -amylasy. Jednocestný ventil slouží k oddělení vdechovaného a vydechovaného vzduchu, a tím se eliminuje potencionální znečištění kondenzovaného vzduchu částicemi z vnějšího prostředí. Jednou z nejdůležitějších částí kondenzátoru je chladicí systém, který může podle typu použitého chladicího média dosahovat různých teplot, které pak ovlivňují množství zachycených látek.

K dosažení nižších teplot se používá chladicí protiproudový okruh [5], umožňující provádět odběr při teplotě  $-10^{\circ}\text{C}$  až  $-20^{\circ}\text{C}$ . Tato nízká teplota je důležitá pro kvantitativní uchování tepelně labilních látek, jakými jsou prostaglandiny, leukotrieny, aldehydy ad.

Během odběru, který trvá obvykle 15 – 20 minut, lze získat 2 – 3 ml KVV. Aby se zamezilo vydechování nosem, je pacientovi nasazen nosní klips.



Obrázek 2: Schéma kondenzátoru pro odběr KVV



## 3.2 Oxidativní stres

Oxidativní stres je proces spojený se vznikem velkého množství ROS (reaktivní kyslíkové částice - reactive oxygen species), které atakují biomolekuly přítomné v organismu a následně způsobují jejich oxidaci. Mezi ROS se řadí volné radikály kyslíku s volným nepárovým elektronem ( $\cdot\text{HO}^-$ ,  $\text{HO}_2\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ ,  $\text{RO}_2\cdot$ ,  $\text{O}_2^-$ ) a látky, které nemají nepárový elektron a vznikají přeměnami z volných radikálů - peroxid vodíku a kyselina chlorná. Volné radikály jsou v organismu tvořeny přirozenou metabolickou drahou (likvidace fagocytovaných organismů, signalizační význam v buňce, mitochondriální dýchání), při patologických poškozeních (narušení antioxidační ochrany), nebo jako důsledek působení xenobiotik (exhalace z průmyslu, kouření) [6].

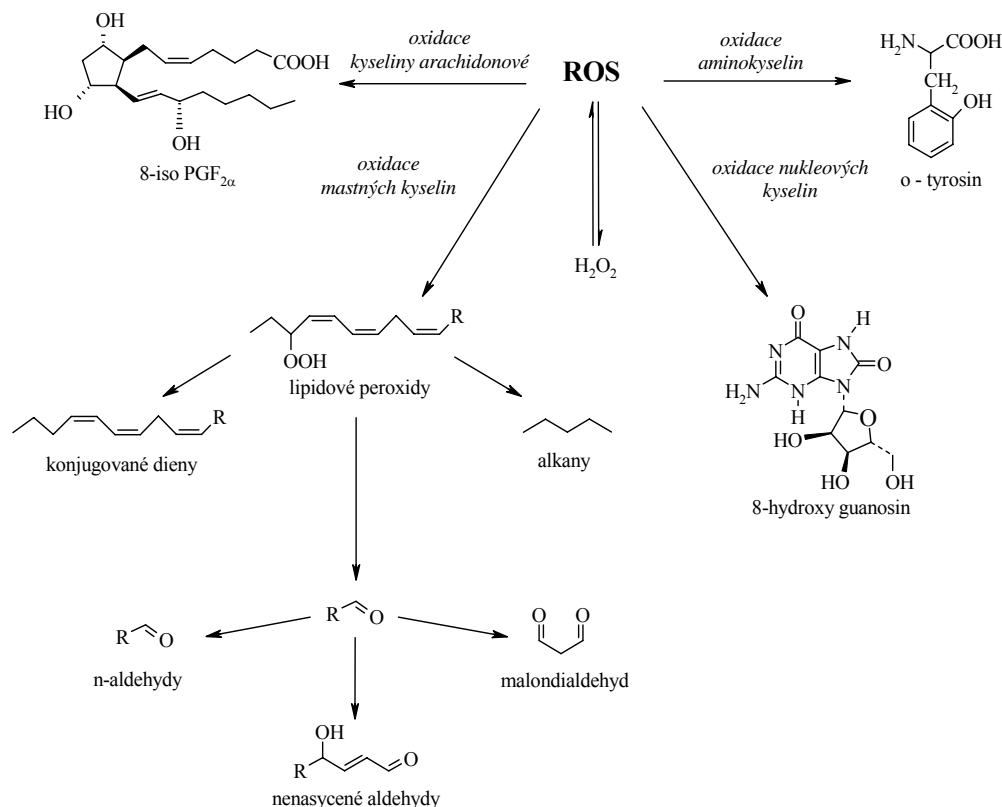
Buňky disponují obsáhlou řadou antioxidačních mechanismů (inaktivující peroxidy, enzymy a proteiny), které zabráňují tvorbě ROS, tím eliminují jejich možný ničivý efekt v organismu. Životnost ROS v organismu je omezena na krátký časový interval, což je příčinou absence citlivé a přesné analytické metody pro jejich stanovení. Kvůli tomuto problému je řada představ o působení ROS nedokonalá či nevyjasněná. Není jasné, zda ROS vyvolávají dané onemocnění, nebo jsou-li pouze formovány v důsledku nemoci [6].

Nestabilita ROS vede k tomu, že se hledají stabilnější biomarkery pro oxidativní stres, které by pomohly objasnit mechanismy působení různých xenobiotik [7] např. krystalický oxid křemičitý, vláknitý azbest, dioxiny a řada dalších.

### 3.2.1 Markery oxidativního stresu

Z kyseliny arachidonové působením ROS vzniká 8-iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , oxidací dalších mastných kyselin (především  $\omega$ -6 a  $\omega$ -3 polynenasycených mastných kyselin) vznikají konjugované dieny, alkany, aldehydy, nasycené a nenasycené ketony ad. (obrázek 3).

Velkou většinu produktů oxidace mastných kyselin lze charakterizovat cytotoxickými a genotoxickými vlastnostmi. Dané biomarkery jsou stabilnější než ROS a lze jejich koncentrace měřit v tělních tekutinách (plazma, moč a KVV). V současné době se jako možné markery oxidativního stresu lipidů monitoruje vedle výskytu 8-iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$  i malondialdehyd (MDA), 4-hydroxynonenal (HNE),  $\text{PGD}_2$  a  $\text{PGE}_2$ .



Obrázek 3: Produkty působení volných radikálů v organismu

### 3.2.1.1 Prostaglandiny (PG)

Prostaglandiny patří do skupiny eikosanoidů, tedy látek obsahující dvacetí uhlíkatý řetězec. PG jsou všudypřítomné lipidy, které se podílí na řadě fyziologických, ale i patologických procesech odehrávajících se v organismu.

Prostaglandiny mohou vznikat několika způsoby. Biologicky neaktivnější jsou však metabolity kyseliny arachidonové (prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaglandin D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>) a thromboxan A<sub>2</sub>). Kyselina arachidonová je vícesytná mastná kyselina vázaná v membránových fosfolipidech, odkud může být působením enzymů nebo volných kyslíkových radikálů uvolněna do organismu.

Cesta kyseliny arachidonové katalyzovaná cyklooxygenázou (COX) upřednostňuje syntézu prostaglandinů a thromboxanů. Isoprostany se v tomto případě mohou vyskytovat pouze jen jako vedlejší produkty. V prvním kroku přeměny kyseliny arachidonové dochází působením COX k navázání dvou molekul kyslíku a vzniku bicyklického endoperoxidového prostaglandinu G<sub>2</sub> (PGG<sub>2</sub>), jehož hydroperoxidová skupina se enzymem peroxid reduktáza redukuje na hydroxylovou skupinu prostaglandinu H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>). Enzym cyklooxygenázy je v organismu přítomen v několika možných izomerických formách - COX-1 (jejím úkolem je udržovat fyziologickou hladinu prostanoidů pro homeostatickou regulaci organismu) a COX-2, která je zodpovědná za průběh zánětlivé reakce [8].

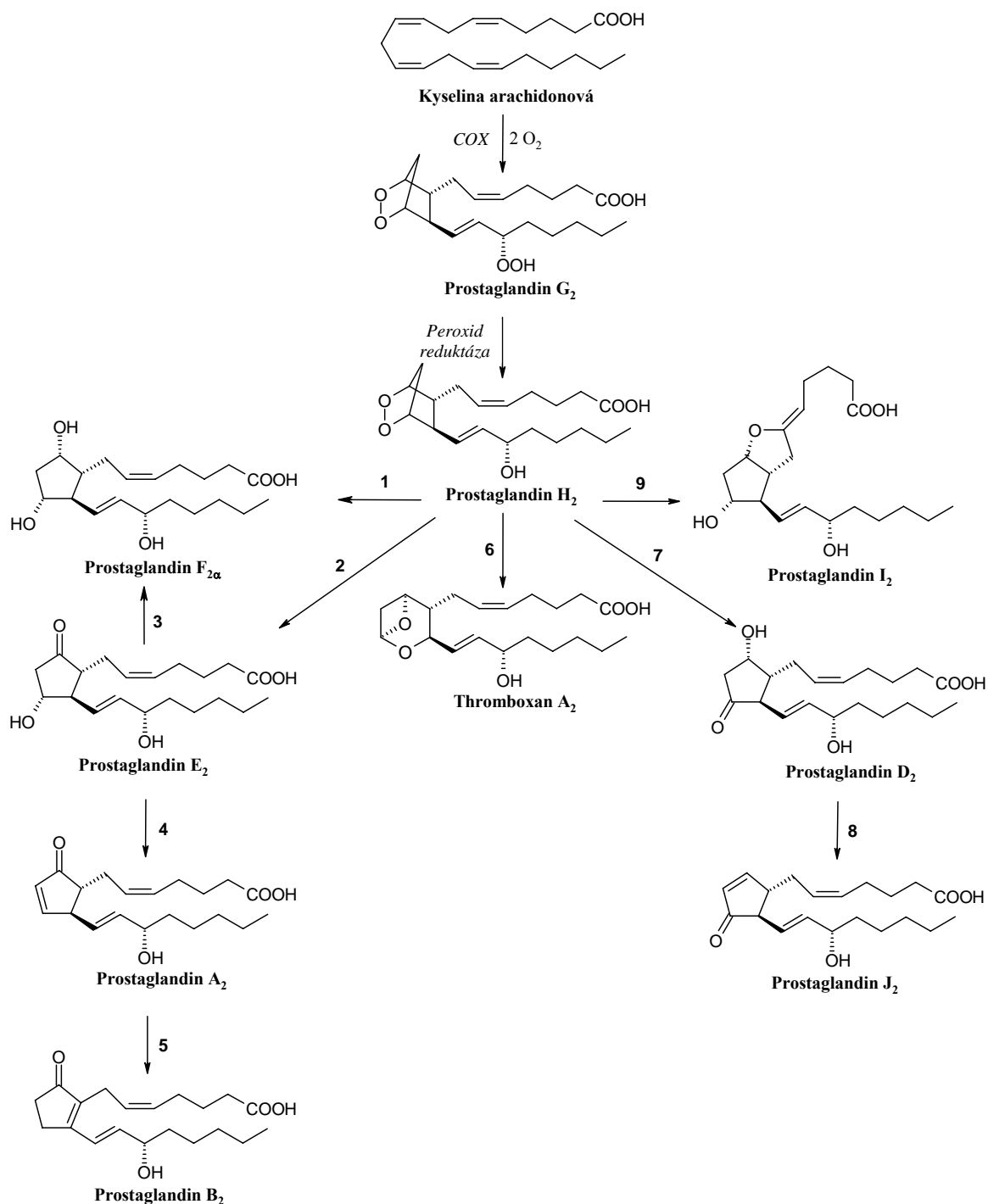
Osud prekursoru PGH<sub>2</sub> (obrázek 4) závisí na místě vzniku a případné aktivitě dalších enzymů. Přímou přeměnou PGH<sub>2</sub> vzniká thromboxan A<sub>2</sub> (katalyzováno enzymem thromboxan A syntetáza), PGD<sub>2</sub> (enzym prostaglandin D syntetáza), PGE<sub>2</sub> (enzym prostaglandin E syntetáza), PGF<sub>2α</sub> (enzym prostaglandin H 9,11-endoperoxid reduktáza) a prostacyklin (enzym prostacyklin syntetáza). PGF<sub>2α</sub>

se v organismu vytváří i redukcí ketonické skupiny PGE<sub>2</sub> enzymem prostaglandin E 9-ketoretuktáza. PGA<sub>2</sub> a PGB<sub>2</sub> vznikají postupnou metabolizací PGE<sub>2</sub>, u kterého nejprve proběhne dehydratace ve vodném roztoku albuminu na PGA<sub>2</sub>, jež je následně izomerizován na PGB<sub>2</sub>. Vodný roztok albuminu se uplatňuje i při dehydrataci PGD<sub>2</sub> na PGJ<sub>2</sub>.

Fyziologickým úkolem prostaglandinů je podílet se na homeostatické regulaci trávicí, oběhové, vylučovací a dýchací soustavy a uplatňují se i v období těhotenství a porodu. Při patologických pochodech se s prostaglandiny můžeme setkat při zánětech, kardiovaskulárních onemocněních, rakovině a oxidativním stresu.

Jeich biologická aktivita je dána interakcí se specifickým G-proteinovým receptorem a ovlivněním lokální funkce ostatních hormonů v cirkulaci. Receptory se klasifikují podle selektivity k daným prostaglandinům. PGE<sub>2</sub> se především váže na EP receptory, PGI<sub>2</sub> aktivuje IP receptory, PGF<sub>2α</sub> interaguje s FP receptory, pro PGD<sub>2</sub> se v organismu vyskytují DP receptory a s TP receptory přednostně vytváří aktivní komplex thromboxany, ale bývají aktivovány i PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> a 8-iso PGF<sub>2α</sub>. Jednotlivé prostanoidy navázáním na odpovídající receptor v určitém místě ovlivňují řadu procesů.

Nejdůležitější prostaglandiny PGD<sub>2</sub> a PGE<sub>2</sub> se podílejí na bronchokonstrikci, dráždí dýchací cesty a tím indukují vznik kašle, znásobují efekt působení histaminu a zvyšují produkci hlenu v dýchacích cestách a lze je označit za promotory alergické reakce.

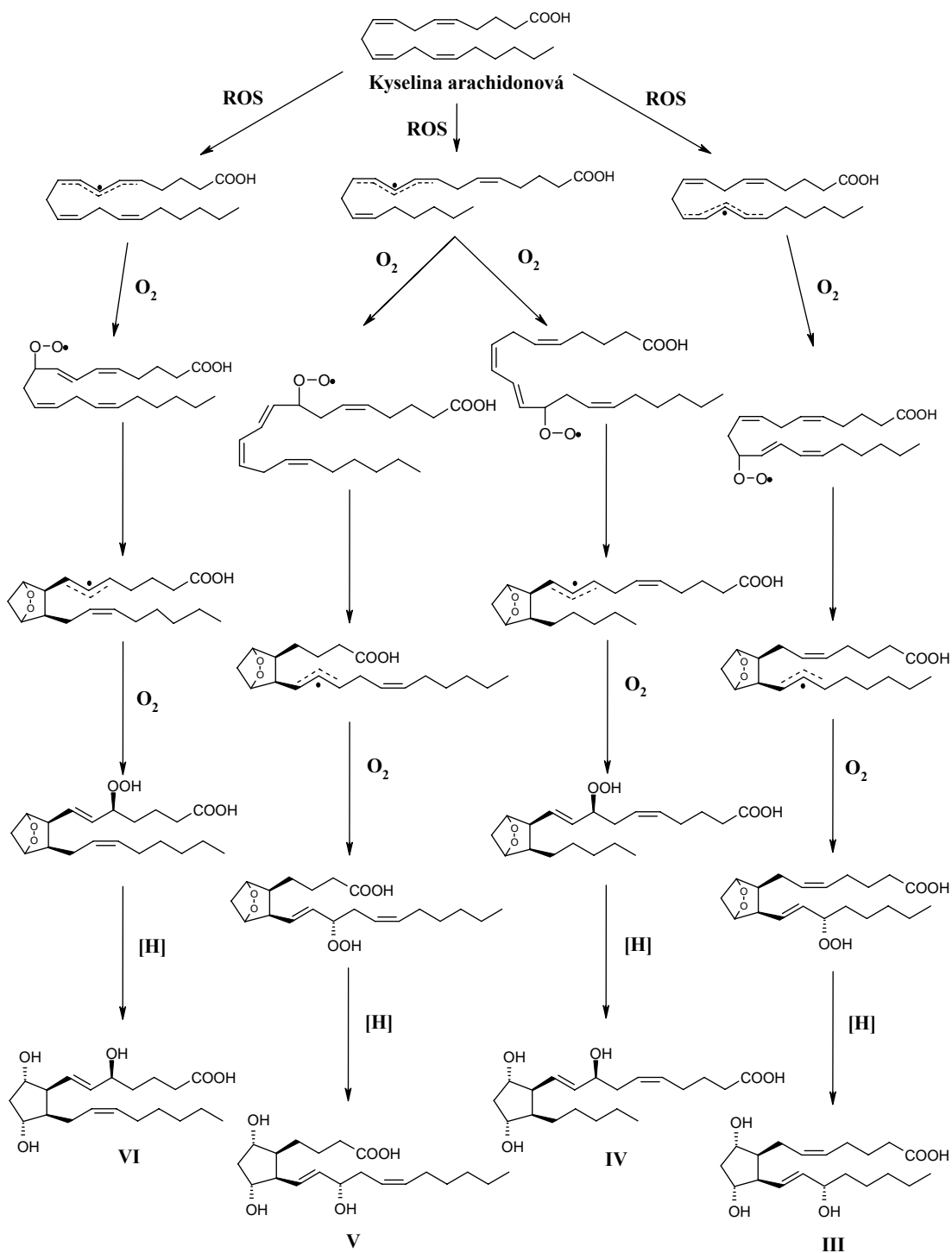


**Obrázek 4: Biosyntéza prostanoidů z kyseliny arachidonové působením enzymu cokolooxygenázy (COX)**

Přeměna nestabilního meziprojektu prostaglandinu H<sub>2</sub> na příslušné prostaglandiny probíhá za přítomnosti enzymů: 1 - prostaglandin H 9,11-endoperoxid reduktáza, 2 - prostaglandin E syntetáza, 3 - prostaglandin E 9-ketoreduktáza, 4 - dehydratace, 5 - izomeráza, 6 - thromboxan A syntetáza, 7 - prostaglandin D syntetáza, 8 - dehydratace, 9 - prostacyklin syntetáza

### 3.2.1.2 Isoprostany

Isoprostany vznikají neenzymatickou peroxidací membránově vázané kyseliny arachidonové působením ROS (obrázek 5). Výsledkem reakce arachidonového radikálu s molekulou kyslíku jsou možné čtyři peroxy radikály kyseliny arachidonové. Peroxy radikály po podstoupení intramolekulární cyklizaci a navázání druhé molekuly kyslíku vytváří čtyři regioizomery bicyklických endoperoxidů isoprostanů  $G_2$ . Výsledkem částečné redukce iso-PGG<sub>2</sub> jsou isoprostany série E<sub>2</sub> a D<sub>2</sub>, úplnou redukcí získáme isoprostany F<sub>2 $\alpha$</sub> .

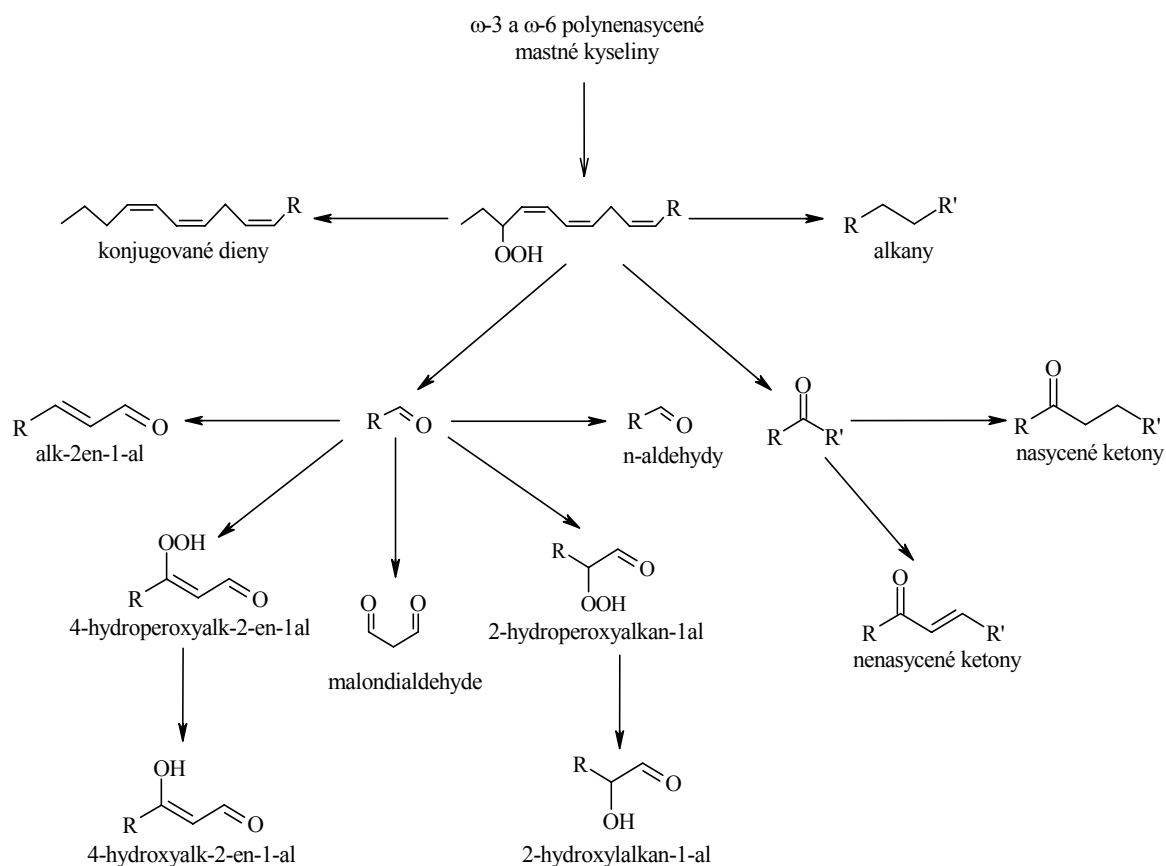


Obrázek 5: Mechanismus vzniku F<sub>2 $\alpha$</sub>  isoprostanů z kyseliny arachidonové působením ROS

Isoprostany se vyskytují v plicích, kardiovaskulárním a lymfatickém systému, v centrální nervové soustavě a v ledvinách. Největší biologická aktivita byla prokázána u 8-iso PGF<sub>2α</sub>, který v organismu může způsobit vazokonstrikci cév a bronchů, výrazně redukovat průtok krve ledvinami a ovlivňovat agregaci krevních destiček.

### 3.2.1.3 Malondialdehyd a 4 – hydroxynonenal

Jedná se o konečné produkty oxidace  $\omega$ -6 a  $\omega$ -3 polynenasycených mastných kyselin (obrázek 6). 4- hydroxynonenal a malondialdehyd způsobují následné poškození základních stavebních organismu (nukleové kyseliny, aminokyseliny a bílkoviny) a proto lze jejich vlastnosti označit za genotoxické (poškození DNA, RNA a i translačních a transkripčních mechanismů) a cytotoxické (projevuje se poškozením buněk a jejich následným možným zánikem).



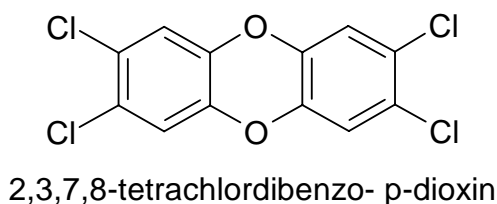
**Obrázek 6:** Schéma oxidace  $\omega$ -3 a  $\omega$ -6 polynenasycených mastných kyselin

## 3.2.2 Oxidativní stres a poškození organismu

### 3.2.2.1 Expozice dioxiny

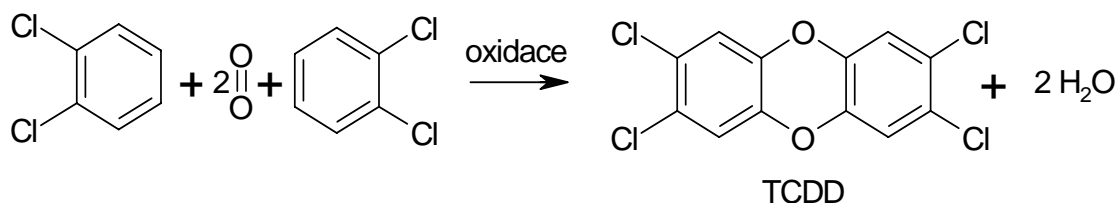
Jako dioxiny je souhrnně označováno 210 chemických látek ze dvou skupin látek odborně nazývaných polychlorované dibenzo-p-dioxiny (PCDDs) a polychlorované dibenzofurany (PCDFs). Mezi „nejvýznamnější“ zástupce se řadí 2,3,7,8-tetrachlordibenzo- p-dioxin (TCDD - *obrázek 7*), který patří mezi jedny z nejjedovatějších látek (40krát jedovatější než kyanid draselný).

Dioxiny jsou vysoce toxické látky nebezpečné již ve stopových koncentracích. Jsou to látky, které se kumulují v tukových tkáních organismů. Jejich dlouhodobým působením na organismus dochází k poškození imunitního a nervového systému, ke změnám v endokrinním systému (zejména štítné žlázy) a reprodukčních funkcí. Ve vysokých akutních koncentracích způsobují dioxiny záněty kůže (alergická dermatitida, chlorakné), při vdechnutí vyvolává záněty sliznice a plicní tkáně, což může končit i smrtí. Dalšími nejvíce postiženými orgány jsou oči, játra a ledviny. Při nižších chronických dávkách způsobují poškození plicních epitelů, podílejí se na vzniku oxidativního stresu, z kterého se následně může vyvíjet rakovinné onemocnění. Převážná většina dioxinů se do organismu dostává potravou, inhalací ze vzduchu nebo při styku s kůží [9].



**Obrázek 7: Struktura 2,3,7,8-tetrachlordibenzo- p-dioxinu (TCDD)**

Dioxiny obecně vznikají jako vedlejší produkt průmyslové výroby, které se účastní chlor (výroba PVC, bělení buničiny chlorem, ad.). Nejvýznamnějším zdrojem dioxinů jsou však v dnešní době především spalovny, kde vznikají neúplnou oxidací 1,2-dichlorbenzenu, což je příčinou jejich výskytu v kouřových plynech technologicky nedořešených spaloven komunálního odpadu, obsahujícího chlorované plasty, především polyvinylchlorid (PVC).



**Rovnice 1: Vznik TCDD hořením o-dichlorbenzenu**

V minulosti se můžeme setkat s několika příklady expozice lidí dioxiny. V 60. letech Spolana Neratovice zahájila výrobu chlorovaných pesticidů, včetně složky pro Agent Orange (směs pesticidů 2,4-dichlorfenoxyoctové kyseliny a 2,4,5-trichlorfenoxyoctové kyseliny, který byl americkou armádou

používán v průběhu Vietnamské války). Při výrobě chlorovaných pesticidů byly dioxiny (především TCDD) nežádoucí vedlejší látkou. Výskyt těchto látek v provozech zapříčinil řadu vážných onemocnění velkého počtu zaměstnanců a je spojován s vysokou úmrtností zaměstnanců Spolany na rakovinu koncem 60. let minulého století.

### **3.2.2.2 Expozice oxidem křemičitým**

Silikóza plic je typické onemocnění profesionálního původu, které je vyvoláno inhalací prachu s obsahem krystalického oxidu křemičitého, jakožto hlavní složkou zemských minerálů. Při inhalaci se do alveol dostávají částice, ze kterých většina je vykašlána, nepatrná část prachu však přechází v makrofázích stěnou alveolu do intersticia odkud je dopravována do mizních uzlin. Činností makrofágů vzniká drobný zánět, který se opakovanou inhalací oxidu křemičitého postupně zvětšuje. Nemoc se vyvíjí 15 – 20 let a může vyústit až v rakovinu plic.

### **3.2.2.3 Expozice azbestem**

Azbestóza je profesionální plicní onemocnění, které vzniká v důsledku nadměrného vystavení azbestových vláken. Azbestová vlákna jsou zanesena proudem vdechovaného vzduchu až do alveol. Výsledkem je aktivace alveolárních makrofágů a rozvoj zánětlivého procesu. Přesný mechanismus tohoto působení není znám, ale významnou roli hraje tvar azbestových vláken a jejich relativní nezníčitelnost. Inhalovaná vlákna mohou v plicích přetrvávat řadu let. Pro svůj charakteristický tvar – úzké a dlouhé vlákno – nemohou být zcela fagocytována makrofágy, a tak jedno vlákno po dlouhou dobu aktivuje řadu makrofágů. To vede k uvolňování některých enzymů a hlavně volných kyslíkových radikálů, které poškozují okolní plicní tkáň. Nebezpečnost inhalace azbestového prachu spočívá především ve zvýšení rizika vzniku plicního karcinomu.



### 3.3 Metody stanovení biomarkerů v KVV

Složitost matrice KVV spojená s velkým počtem rozdílných biomarkerů a rozmanitost dnešních analytických metod nám dává nepřeborné množství kombinací stanovení. V řadě prací bylo popsáno stanovení prostaglandinů a isoprostanů v různých tělních tekutinách (krevní plazma, moč, mozkomíšní mok a KVV) s využitím rozdílných analytických metod jako je RIA (Radioimmunoassay) [10], EIA (Enzyme Immunoassay) [11], ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) [12], případně GC-MS [13] nebo LC-MS [14]. Biochemickými metodami lze stanovit řádově nižší koncentrace látek, než jakých je dnes dosahováno použitím hmotnostně-spektrometrických metod (GC-MS, LC-MS), nicméně meze detekce těchto instrumentálních metod se v průběhu posledního desetiletí dostaly na úroveň piko-, femto-, případně attomolů, což je plně postačující pro detekci většiny biologicky aktivních látek vyskytujících se v lidském organismu [6]. Spojení kapalinové, případně plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem poskytuje oproti biochemickým metodám nejenom kvantitativní informaci, ale rovněž i informaci strukturní (kvalitativní), která je při využití MS technik vysoce specifická. Tím jsou vyloučeny falešně pozitivní, či negativní výsledky, které se v důsledku "zkřížených reakcí" vyskytují u imunochemických nebo enzymatických metod.

Měření koncentrace MDA a HNE v řadě prací probíhá s využitím spojení kapalinové chromatografie s UV, nebo fluorescenční detekcí. Nedílnou součástí jejich stanovení je derivatizace. Tento způsob stanovení se vyznačuje velice nízkou selektivitou k daným analytům a k možnému zkreslení výsledků dalšími aldehydy přítomnými v matrici, neboť tyto metody neposkytují strukturní informaci.

Proces stanovení eikosanoidů, HNE a MDA v KVV při využití hmotnostně-spektrometrické detekce je možné rozdělit do tří částí. V prvním kroku se provádí odběr KVV (viz kapitola kondenzát vydechaného vzduchu). Z biologické matrice se před samotnou hmotnostně-spektrometrickou analýzou analyty extrahují a zakoncentrovávají, případně se provádí jejich derivatizace.

#### 3.3.1 Extrakce biomarkerů

Extrakce biomolekul z komplexní biologické matrice se provádí z důvodu (1) zakoncentrování, (2) kompatibility rozpouštědla s mobilní fází LC a (3) eliminace rušivého efektu matrice. Jako extrakční metody je možno použít např. specifickou extrakci látky založené na imunitní reakci antigenu s protilátkou a nespecifické odstranění solí extrakcí na pevné fázi (SPE – Solid Phase Extraction).

##### 3.3.1.1 Imunoseparace

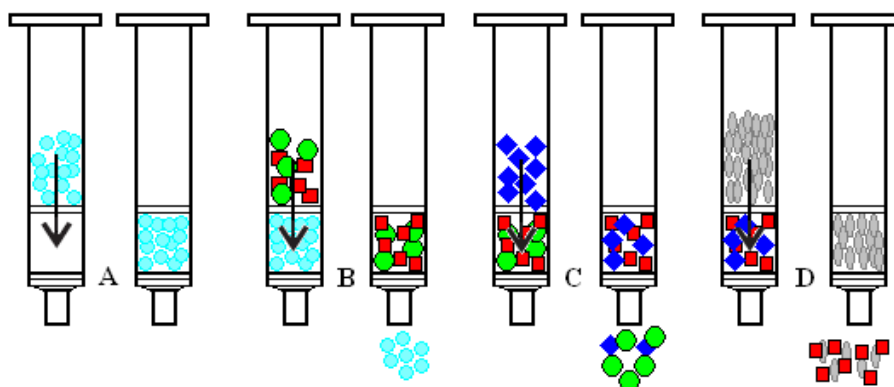
Princip imunoseparačních metod je založen na imunitní odpovědi organismu, kde imunitní reakce probíhá na základě vytvoření komplexu antigen – protilátka. Antigen je pro organismus strukturně cizí látka vyvolávající tvorbu příslušné specifické protilátky, která je schopna vychytávat daný antigen, a proto lze reakce mezi antigenem a protilátkou charakterizovat jako vysoce specifickou. Tedy pokud je k dispozici specifická protilátka, může být při použití vhodné laboratorní techniky provedena extrakce sledovaného antigenu z biologického vzorku kvantitativně.

Pro separaci vytvořeného komplexu antigen - protilátka z biologických matric musí být protilátka zakotvena na nosiči, který umožní bezproblémovou separaci z tělních tekutin (pomocí

odstředění – např. Sepharosa 4B, v magnetickém poli – magnetické mikro- a nanočástice [6], nebo různé druhy destiček) při zachování dostatečné vazebné kapacity pro antigen.

### 3.3.1.2 Extrakce na pevné fázi (SPE)

Princip extrakce na pevné fázi vychází z kapalinové chromatografie (používají se i obdobné stacionární fáze - např. silikagelový nosič modifikovaný oktadecylovou, ethylovou, cyklohexylovou aj. skupinou). Funkční skupiny sorbentu a rozpouštědla interagují s látkami z roztoku a zadržují analyty. Následným vymytím se ze SPE kolony získá analyt (nečistoty zachyceny), nebo se z kolony nejprve vymyjí nečistoty a použitím dalšího rozpouštědla se získá analyzovaná látka. SPE extrakci lze charakterizovat jako jednoduchou, nenáročnou metodu, o tom svědčí i její časté použití [15].



**Obrázek 8: Schéma extrakce na pevné fázi (SPE)** - SPE kolona se před nanesením vzorku (B) zaktivuje vhodným rozpouštědlem (A). Nezadržované složky se ze SPE kolony vymyjí (C) a nakonec se provede vymytí zadržených molekul (D).

### 3.3.2 Hmotnostní spektrometrie (MS = mass spectrometry)

Nedávný bouřlivý vývoj v oblasti LC-MS umožňuje dnes bezproblémovou separaci a paralelní detekci velmi nízkých koncentrací analytů i ve značně komplexních matricích. Z tohoto důvodu, stejně jako pro svou vysoce specifickou strukturní informaci, se LC-MS stává metodou první volby v analýze látek v biologických matricích. Stanovení pikogramových množství v komplexní tělní tekutině je řešitelný problém metodou LC-MS, a to i z hlediska budoucí rutinní praxe.

Vysokoučinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography-HPLC) se používá především pro analýzu málo těkavých a tepelně labilních látek. Vysoké selektivity separace se dosahuje vhodnou volbou chromatografických fázových systémů. Nejčastěji se využívá kapalinová chromatografie s reverzními fázemi, kde stacionární fáze kolony je tvořena silikagelem, který může být modifikován nepolárními oktadecylovými skupinami, a mobilní fází nejčastěji ze směsi polárních rozpouštědel - voda, methanol a acetonitril s přísadkou pufrů.

Při využití hmotnostně-spektrometrické detekce se analyzované látky musejí převést do plynné fáze a iontového stavu. S objevem technik umožňujících ionizaci za atmosférického tlaku (API – atmospheric pressure ionization) je možné provést tento převod i u tepelně labilních látek. Mezi nejvyužívanější API techniky patří ionizace elektrosprejem (ESI – electrospray ionization), za kterou

byla v roce 2002 udělena Nobelova cena za chemii Johnu B. Fennovi. ESI se řadí mezi měkké ionizační techniky vyznačující se zachováním molekulového píku při minimálním počtu vzniklých fragmentů molekuly. Kombinace ESI ionizace s vhodným analyzátozem (jednoduchý, nebo trojitý kvadrupól, iontová past) je vhodnou detekční technikou pro kvantitativní stanovení látek. Trojitý kvadrupól a iontová past vedle kvantitativní informace přináší při práci v  $MS^n$  módu (pro trojitý kvadrupól maximálně  $MS^2$  častěji označován MS/MS) i kvalitativní informaci o sledované molekule. Hmotnostní spektrometr s trojitým kvadrupólem využívá vysoce selektivní MRM (multiple reaction monitoring) mód, kde na prvním kvadrupólu Q1 se izoluje quasi-molekulární ion (deprotonovaný molekulární ion [M-H]<sup>-</sup> pro negativní ionizaci a pro pozitivní ionizaci např. protonovaný ion [MH]<sup>+</sup>) příslušné molekuly, který je použit jako prekursor (rodičovský ion) pro následnou kolizně-indukovanou disociaci (CID). V kolizní cele kvadrupólů Q2 dochází k selektivnímu rozpadu molekuly za vzniku dceřiného spektra, z kterého se na třetím kvadrupólu Q3 izoluje specifický dceřiný ion s nejvyšší abundancí [6].

### 3.4 Pracovní hypotéza

Cílem předkládané práce je sledování hladin biomarkerů oxidativního stresu v kondenzátu vydechaného vzduchu jako tělní tekutině, která odráží bezprostřední děje odehrávající se v plicích a dýchacích cestách.

V experimentální části bude vypracovaná analytická metoda pro kvantitativní i kvalitativní stanovení 8-iso PGF<sub>2α</sub>, malondialdehydu, 4-hydroxynonenalu, PGD<sub>2</sub> a PGE<sub>2</sub>. Nedílnou součástí metody by měly být separační kroky (imunoseparace, extrakce na pevné fázi) a samotné stanovení vysoce přesnou a selektivní metodou HPLC-ESI-MS/MS. Jistá pozornost je věnována stabilitě sledovaných markerů za podmínek odběru, skladování a zpracování KVV.

Vyvinutá analytická metoda bude testována na klinických vzorcích s cílem porovnání koncentračních hladin biomarkerů pacientů s diagnostikovaným onemocněním a zdravých jedinců. Veškerá získaná data budou statisticky vyhodnocena.

## 4 Metodika práce

### 4.1 Chemikálie a pomůcky

Název	čistota	výrobce
8-iso Prostaglandin F <sub>2α</sub> (8-iso-PGF <sub>2α</sub> )	≥ 99 %	Cayman Chemical, USA
Prostaglandin E <sub>2</sub>	≥ 99 %	Cayman Chemical, USA
Prostaglandin D <sub>2</sub>	≥ 99 %	Cayman Chemical, USA
8-iso Prostaglandin F <sub>2β</sub> (8-iso-PGF <sub>2β</sub> )	≥ 98 %	Cayman Chemical, USA
8-iso15(R)-Prostaglandin F <sub>2α</sub>	≥ 98 %	Cayman Chemical, USA
Prostaglandin F <sub>2α</sub> (PGF <sub>2α</sub> )	≥ 99 %	Cayman Chemical, USA
Prostaglandin F <sub>2β</sub> (PGF <sub>2β</sub> )	≥ 99 %	Cayman Chemical, USA
15(R)-Prostaglandin F <sub>2α</sub> (15(R)-PGF <sub>2α</sub> )	≥ 98 %	Cayman Chemical, USA
11b-Prostaglandin F <sub>2α</sub> (11b-PG F <sub>2α</sub> )	≥ 99 %	Cayman Chemical, USA
[3,3,4,4 <sup>2</sup> H <sub>4</sub> ] 8-iso Prostaglandin F <sub>2α</sub>	≥ 98 %	Cayman Chemical, USA
4-Hydroxynonenal (HNE)	≥ 98 %	Cayman Chemical, USA
[9, 9, 9 <sup>2</sup> H <sub>3</sub> ] 4-Hydroxynonenal (HNE- <i>d</i> <sub>3</sub> )	≥ 99 %	Cayman Chemical, USA
8 – isoprostane Affinity Sorbent		Cayman Chemical, USA
Prostaglandin E2 Affinity Sorbent		Cayman Chemical, USA
Argon	5,0	SAID, Česká republika
Vzduch	technický	SAID, Česká republika
Dusík	technický	SAID, Česká republika
Methanol	LC/MS	Riedel de Haën, Německo
Acetonitril	LC/MS	Riedel de Haën, Německo
Voda	LC/MS	Riedel de Haën, Německo
Ethanol	HPLC	Merc, Německo
Amoniak	28 %-ní roztok	Aldrich, USA
1,1,3,3-Tetramethoxypropan	99 %	Aldrich, USA
3-(Dimethylamino)-2-methyl-2-propenal	99 %	Aldrich, USA
2-Propanol	≥99,9 %	Riedel de Haën, Německo
Aceton	≥99,8 %	Riedel de Haën, Německo
Kyselina mravenčí	99,9 %	Riedel de Haën, Německo
Kyselina chlorovodíková	p.a.	Penta, Česká republika
Hydroxid sodný	p.a.	Penta, Česká republika
Uhličitan sodný, bezvodý	p.a.	Penta, Česká republika
Škrob	Zulkowsky	Merk, Německo
3,5-Dinitrosalicylová kyselina	≥98 %	Fluka, Švýcarsko
Bond elut – C18 – hmotnost sorbentu 100 mg, velikost částic 40μm, objem 1ml (varian, USA)		
Hypercarb Thermo 100 x 2,1 mm x 5 μm s předkolonou Hypercarb (Thermo Electron Corporation, USA)		

## 4.2 Syntéza standardu malondialdehydu a methylmalondialdehydu

Pro syntézu standardu malondialdehydu byl použit 1,1,3,3-tetramethoxypropan (TMP), který byl kysele hydrolyzován 60 minut při teplotě 40 °C. Reakční směs byla následně neutralizována (pH 7) roztokem uhličitanu sodného. Pro přípravu zásobního roztoku o koncentraci cca 10 mM bylo použito 17 ml TMP a 10 ml 0,1 M kyseliny chlorovodíkové.

Methylmalondialdehyd (MeMDA) byl připraven zahříváním 0,5 g 3-dimethylamino-2-methyl-2-propenalu s 0,2 g hydroxidu sodného v 0,7 ml vody. Reakce se prováděla při teplotě 70 °C do vymizení fází (cca 3 hodiny). Při ochlazení roztoku se začaly tvořit bílé krystaly. Ze suspenze bylo odpařeno rozpouštědlo za sníženého tlaku a získané krystaly byly promyty směsí rozpouštědel aceton:2-propanol (50:50 - V/V) a aceton:ethanol (50:50 - V/V).

Přesná koncentrace MDA a MeMDA byla stanovena využitím UV/Vis spektrofotometru na základě Lambertova-Beerova zákona, podle kterého je hodnota absorpce  $A_\lambda$  při vlnové délce  $\lambda$  přímo úměrná látkové koncentraci  $c$  ( $\text{mol l}^{-1}$ ). V případě jediné absorbující látky v roztoku platí rovnice  $A_\lambda = \varepsilon_\lambda bc$ , kde  $\varepsilon_\lambda$  ( $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ) představuje molární absorpční koeficient při dané vlnové délce a  $b$  (cm) tloušťku vrstvy, kterou prochází paprsek (v tomto případě  $b = 1 \text{ cm}$ ). Absorbance pro MDA byla měřena při vlnové délce  $\lambda = 267 \text{ nm}$ , kdy molární absorpční koeficient  $\varepsilon_{267}$  má hodnotu  $31800 \text{ l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ . Pro stanovení koncentrace připraveného roztoku MeMDA bylo využito vlnové délky  $\lambda = 274 \text{ nm}$ , její molární absorpční koeficient  $\varepsilon_{274}$  odpovídá hodnotě  $29900 \text{ l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ .

## 4.3 Odběr kondenzátu vydechovaného vzduchu

KVV byl získáván prostřednictvím kondenzátoru vydechovaného vzduchu EcoScreen (Jaeger, Německo) na Klinice nemocí z povolání VFN a 1. LF UK. Bezprostředně po odběru vzorku bylo do 1 ml KVV přidáno 250 pg 8-iso PGF<sub>2 $\alpha$</sub> -d<sub>4</sub>, 500 pg HNE-d<sub>3</sub> a 500 pg MeMDA a vzorek byl zmražen při teplotě -80 °C.

## 4.4 Stanovení $\alpha$ -amylasy v kondenzátu vydechovaného vzduchu

Enzymatická reakce  $\alpha$ -amylasy obsažené v KVV byla prováděna při teplotě 37 °C smícháním KVV a 1 %-ního škrobu v poměru 1:2. Po 40 minutách byla přidána 3,5-dinitrosalicylová kyselina a směs byla zahřátá na teplotu 90 °C (5 minut), kdy došlo k denaturaci  $\alpha$ -amylasy a redukci 3,5-dinitrosalicylové kyseliny přítomnými redukujícími cukry. Koncentrace vzniklého produktu reakce byla stanovena měřením absorpance při vlnové délce  $\lambda = 530 \text{ nm}$ .

## 4.5 Stanovení koncentrace biomarkerů v KVV

### 4.5.1.1 Extrakce afinitními sorbenty

Imunoafinitní extrakce byla prováděna následujícím postupem: k 1 ml KVV označenému vnitřními standardy bylo přidáno 50  $\mu\text{l}$  každého z imunoafinitního sorbentu. Suspenze byla třepána (60 minut) při 480 ot./min. Následně byl sorbent separován odstředěním (500 ot./min, 5 min).

Separované sorbenty byly promyty (2 x 1 ml deionizovanou vodou). K promytným sorbentům byl přidán studený methanol (2 x 0,5 ml, míchání 5 minut, odstředění 2500 ot./min). Spojené methanolicke podíly byly podrobeny odpaření methanolu proudem dusíku. Zbytek po odpaření byl rozpuštěn v 50 µl mobilní fáze a byla provedena LC-ESI-MS/MS analýza.

#### 4.5.1.2 Extrakce na pevné fázi (SPE)

Extrakce na pevné fázi byla prováděna na Bond elut C18 (oktadecylová kartridg). Před samotným nanesením vzorku KVV s vnitřním standardem byla kolona zaktivována promytím 5 x 1ml methanolu a 3 x 1ml 0,05 M roztokem kyseliny mravenčí ve vodě. Na zaktivovanou kolonu byl nanesen 1 ml KVV. Matrice KVV z kartridg SPE kolony byla odstraněna 3 x 1ml vody. Zadržené látky byly z kolony eluovány 1 ml methanolu. Získaná frakce methanolu byla odpařena proudem dusíku do sucha. Před samotnou LC-ESI-MS/MS analýzou byl zbytek po odpaření rozpuštěn v 50 ml mobilní fáze.

#### 4.5.2 LC-ESI-MS/MS analýza

LC-ESI-MS byla realizována v systému vybaveném dvěma vysokotlakými pumpami Varian ProStar 210 (Varian, USA), autosamplerem Varian 410 (Varian, USA). Chromatografické dělení vzorku (nastřikované množství 20 µl) bylo realizováno na koloně Hypercarb Thermo (Thermo, USA) 100 x 2,1 mm x 5 µm s použitím mobilní fáze o složení voda s pH upraveným amoniakem na hodnotu 10,5 (rozpouštědlo A) a methanol s acetonitrilem v poměru 60:40 (V/V) s přidaným amoniakem (0,1 %). (rozpouštědlo B) v gradientovém uspořádání (*tabulka 1*). Průtok mobilní fáze byl 150 µl/min. Chromatografická kolona byla temperována na teplotu 30°C. Na kolonu bylo nastřikováno 20 µl vzorku. Přístroj byl vybaven trojitým kvadrupólovým analyzátozem Varian 1200L (Varian, USA). Při měření bylo použito negativní elektrosprejové ionizace (ESI-) v MRM módu. Reakce kolizně-indukované disociace argonem pro jednotlivé analyty jsou zachyceny v *tabulce 2*. Podmínky na hmotnostním spektrometru byly následující: napětí na kapiláře -70 V, tlak kolizního plynu argonu 0,2 Pa, napětí na jehle -4500 V, teplota sušícího plynu 300 °C (dusík, 117 kPa) a teplota zamlžovacího plynu 50 °C (vzduch, 345 kPa). Data byla měřena a zpracovávána využitím softwaru Varian MS Workstation verze 6.52 (Varian, USA).

**Tabulka 1: Složení mobilní fáze chromatografické separace 8-iso PGF<sub>2a</sub>**

Čas (min)	rozpouštědlo A (%)	rozpouštědlo B (%)
0:00	70	30
10:00	70	30
25:00	5	95
55:00	5	95
60:00	70	30
70:00	70	30

**Tabulka 2: Kolizně disociační reakce analytů pro MRM mód MS**

Analyt	MRM reakce ( $m/z \rightarrow m/z$ )	Kolizní energie (eV)
8-iso PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub>	353 $\rightarrow$ 193	27,5
8-iso PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> -d <sub>4</sub>	357 $\rightarrow$ 197	27,5
PGE <sub>2</sub>	355 $\rightarrow$ 293	23,0
PGD <sub>2</sub>	355 $\rightarrow$ 275	15,0
MDA	71 $\rightarrow$ 42	13,5
MeMDA	87 $\rightarrow$ 58	16,0
4-HNE	155 $\rightarrow$ 137	11,0
4-HNE – d <sub>3</sub>	158 $\rightarrow$ 140	11,0

#### 4.5.2.1 Validace metody

Vyvinuté extrakční metody byly charakterizovány následujícími validačními parametry: limit detekce – LOD, limit kvantifikace – LOQ, přesnost, správnost a výtěžnost.

Limit detekce odpovídá nejmenší koncentraci analytu ve vzorku, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. U separačních metod se používá kvýpočtu meze detekce velikost hodnoty signálu slepého pokusu. Opakovanou analýzou blanku ( $n = 10$ ) byly určeny průměrné hodnoty a směrodatné odchylky slepého pokusu. Limit detekce byl pak spočítán jako průměrná hodnota slepého pokusu zvětšeného o trojnásobek směrodatné odchylky.

Limit kvantifikace představuje nejmenší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno s předem zadanou nejistotou. LOQ byl určen jako průměrná hodnota slepého pokusu, ke které byl přičten desetinásobek směrodatné odchylky slepého pokusu.

Přesnost metody je definována jako těsnost shody získané koncentrace se skutečnou hodnotou. Jedná se tedy o statisticky významnou rozdílnost mezi získanou a skutečnou hodnotou, která se vyjadřuje relativní směrodatnou odchylkou RSD (relative standard deviation), jež se počítá podle vztahu  $RSD = s_x / \bar{x} \cdot 100$  (%), kde  $s_x$  představuje směrodatnou odchylku a  $\bar{x}$  je průměr dané stanovené koncentrace.

Správnost metody vyjadřuje odchylku výsledku od referenční hodnoty a udává se pomocí relativní chyby (RE – relative error). Relativní chyba byla počítána vzorcem  $RE = (\bar{x} - \mu) / \mu \cdot 100$  (%),  $\mu$  představuje skutečné přidané množství a  $\bar{x}$  je průměr dané stanovené koncentrace.

Výtěžnost udává poměr koncentrace analytu získaného danou analytickou metodou k přijaté referenční hodnotě ( $k$  známému přidanému množství analytu).

## 4.6 Klinická studie

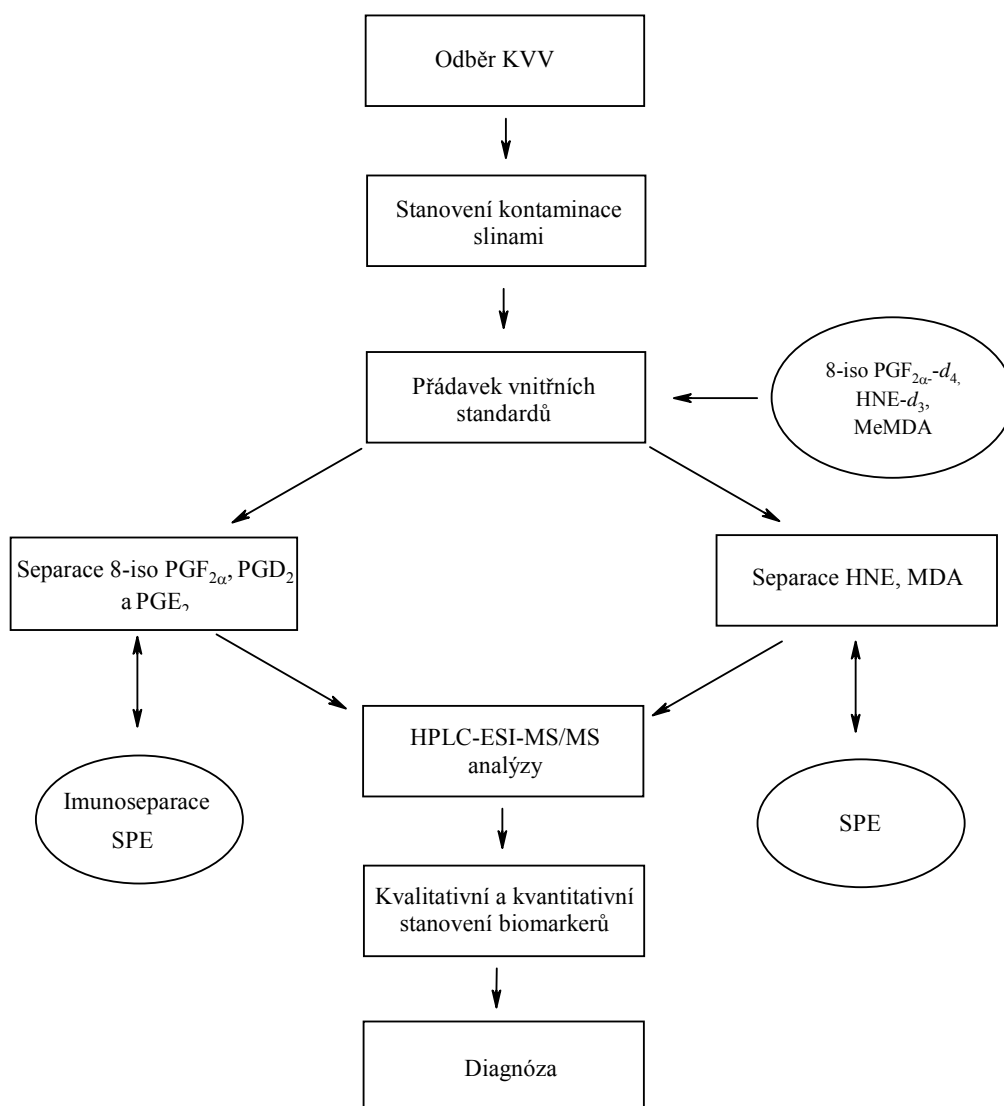
Klinická studie se skládala z diferenciální diagnostiky nemocí spojených s oxidativním stresem a kontrolní skupiny. U všech dobrovolníků byly sledovány hladiny biomarkerů oxidativního stresu – 8-iso PGF<sub>2α</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, HNE a MDA. Tato studie byla provedena u 120 jedinců s onemocněním azbestózy nebo silikózy (věk 68 ± 8, průměrná doba působení asbestu, nebo křemíku 25 ± 6 let), u 33 pacientů s expozicí dioxiny (věk 69 ± 5 let) a u 103 jedinců kontrolní skupiny (věk 65 ± 7).



## 5 Výsledky a diskuze

Analýza biomarkerů obsažených v KVV je poměrně novou, rychle se rozvíjející oblastí v oboru lékařské diagnostiky. Diagnostika založená na stanovení markerů oxidativního stresu však není triviální záležitostí, což dokazuje absence standardizovaných metod pro jejich stanovení, přestože metod pro kvalitativní i kvantitativní analýzu prokazujících možnost diferenciálních diagnostik těchto metod byla v literatuře publikována celá řada [16]. Důvodem chybějící standardizované metody je především nerespektování nízké stability markerů za laboratorních podmínek, přítomnost enzymů zodpovědných za jejich odbourávání v matrici KVV a chemické změny odehrávající se v průběhu zpracování vzorku.

Vyvinuté metody pro stanovení hladin sledovaných biomarkerů v KVV probíhaly podle schématu zachyceného na *obrázku 9* a snažily se respektovat veškerá výše uvedená omezení.



Obrázek 9: Schéma metody pro stanovení biomarkerů v kondenzátu vydechaného vzduchu

## 5.1 Odběr KVV

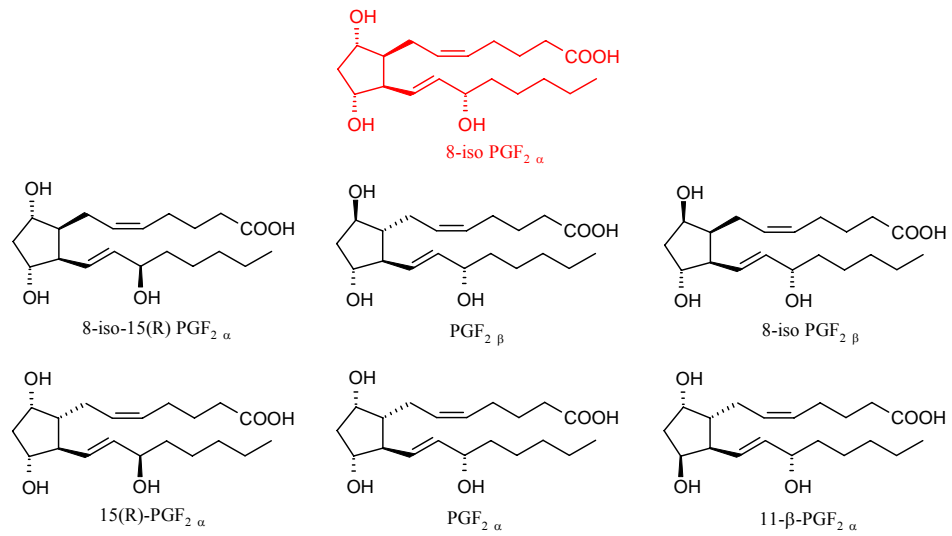
Odběr KVV byl prováděn na Klinice nemocí z povolání 1. LF UK a VFN vybavené zařízením pro jeho odběr. Vzhledem k citlivosti biomarkerů k celé řadě faktorů je ideální ihned po odběru provést označení vzorku isotopicky značeným vnitřním standardem. Princip standardizace izotopicky značeným analogem spočívá v zcela identickém fyzikálním, chemickém a biologickém chování známého množství standardu, který při hmotnostně-spektrometrické analýze vykazuje v důsledku nahrazení vodíku deuteriem odlišné chování v detektoru umožňující velice přesné provedení kvantifikace a zároveň monitorování změn ve složení vzorku, k nimž došlo v průběhu jeho zpracování. Pro MDA byl z důvodu absence deuterovaného analogu zvolen jako vnitřní standard MeMDA, který se vyznačuje podobnými chemicko-fyzikálními vlastnostmi.

## 5.2 Stanovení kontaminace kondenzátu vydechaného vzduchu slinami

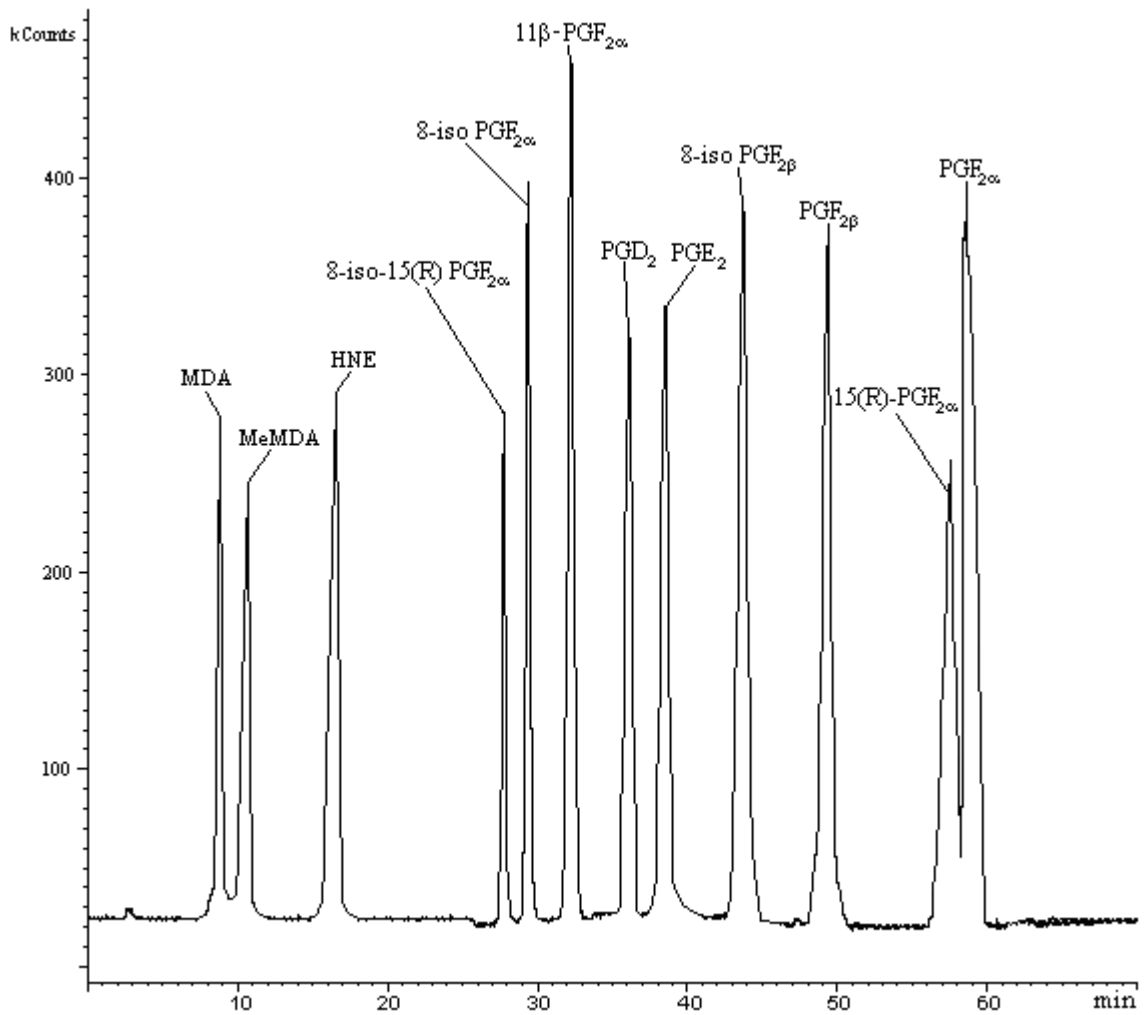
Po odběru vzorku KVV se prováděl test na kontaminaci slinami, ke které by mohlo dojít v důsledku špatně provedeného odběru, neboť ve slinách se vyskytuje významné množství sledovaných biomarkerů. Zjištění kontaminace je možné provést prostřednictvím stanovení aktivity enzymu  $\alpha$ -amylázy, která se detekuje na základě koncentrace uvolněného redukujícího cukru z rozštěpeného škrobu. Redukující cukr při zahřátí redukuje přidanou 3,5-dinitrosalicilovou kyselinu na 3-amino-5-nitrosalicilovou kyselinu. Koncentrace vzniklé 3-amino-5-nitrosalicilové kyseliny se stanovuje na základě absorpance při vlnové délce  $\lambda = 530$  nm. Pro všechny vzorky klinické studie byla stanovena aktivita  $\alpha$ -amylasy v KVV pod 0,1 % vzhledem k její aktivitě ve slinách. Pokud by tato aktivita byla vyšší, matrice by byla znehodnocena a dále nezkoumána.

## 5.3 HPLC/MS metoda

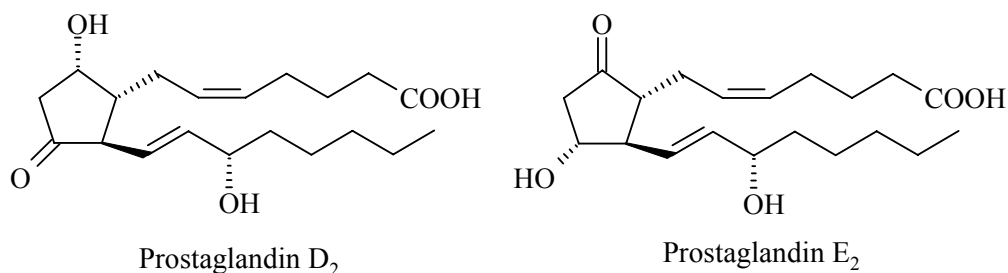
Kapalinová chromatografie pro separaci prostaglandinů a aldehydů byla realizována na koloně Hypercarb s gradientovým složením mobilní fáze z rozpouštědel - vody, methanolu, acetonitrilu a amoniaku. Vyvinutá HPLC metoda sloužila nejen k oddělení látek od čela analýzy, aby v důsledku případné koeluze solí a endogenních složek matrice nedocházelo k potlačení signálu hmotnostního detektoru v důsledku negativního vlivu na ionizaci, ale rovněž k separaci jednotlivých prostaglandinů a aldehydů. Pro stanovení 8-iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$  při použití nespecifické separační metody SPE bylo nutno oddělit biologicky aktivní diastereomery 8-iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$  (obrázek 10), aby detekovaná koncentrace 8-iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$  nebyla zkreslena dalšími diastereomery, které by se eluovaly se shodným retenčním časem, neboť u nich není možné provést hmotnostně-spektrometrickou separaci. Chromatogram separovaných látek a příslušných diastereomerů za podmínek uvedených v experimentální části je zachycen na obrázku 11.



Obrázek 10 Biologicky aktivní diastereomery 8-iso PGF<sub>2α</sub>

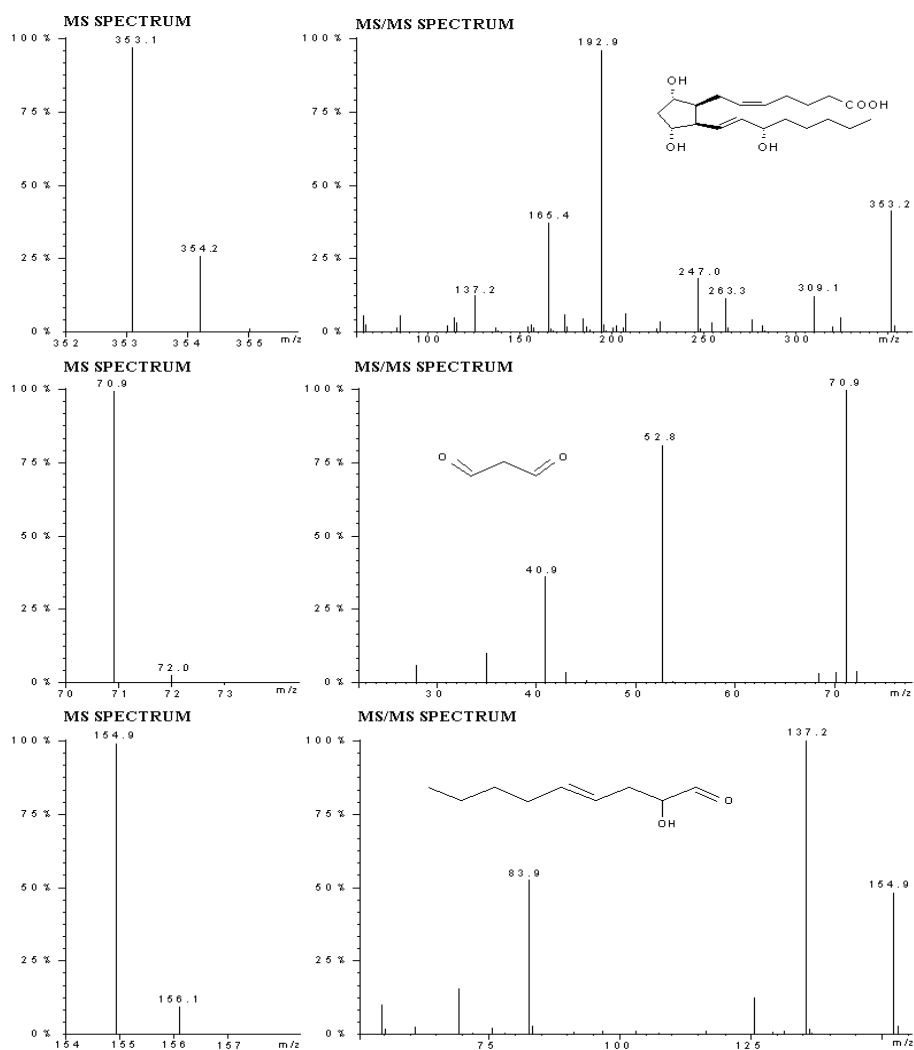


Obrázek 11: MS a MS/MS spektra sledovaných analytů



**Obrázek 12: Struktura prostaglandinu D<sub>2</sub> a prostaglandinu E<sub>2</sub>**

Hmotnostně-spektrometrická detekce byla realizována negativní elektrosprejovou ionizací (ESI<sup>-</sup>) ve vysoce selektivním MRM módu. Na kvadrupólu Q1 byl izolovaný deprotonovaný molekulární iont [M-H]<sup>-</sup> příslušného analytu, který byl použit jako prekursor pro následnou kolizně-indikovanou disociaci v kolizní cele kvadrupólů Q2 (*obrázek 13*), kde docházelo k selektivnímu rozpadu molekuly za vzniku dceřiného spektra, ze kterého byl na třetím kvadrupólu Q3 izolován specifický dceřiný ion s nejvyšší četností. Kolizní energie a další parametry hmotnostního spektrometru byly optimalizovány z hlediska získání maximální výtěžnosti vyvinuté metody (viz experimentální část).



**Obrázek 13: MS a MS/MS spektra sledovaných analytů**

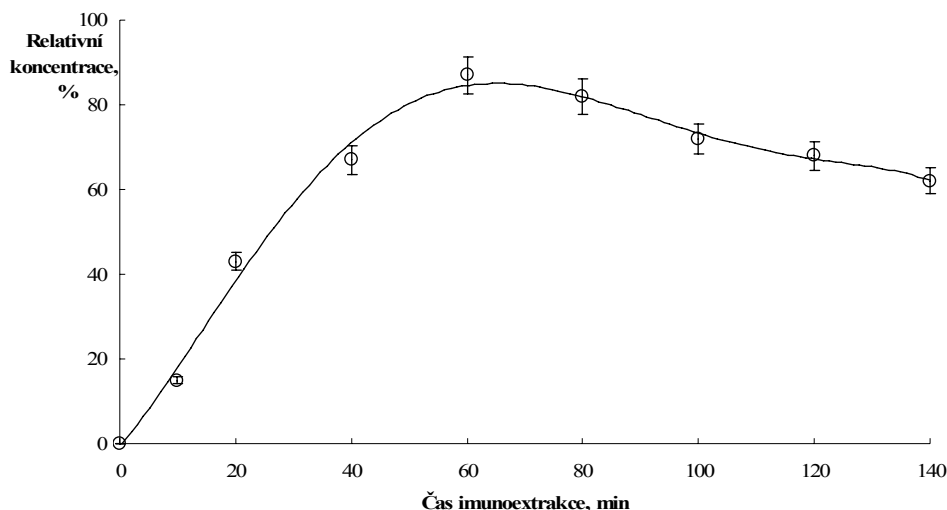
### 5.3.1 Extrakční metody

Vzhledem k velmi nízké koncentraci biomarkerů v komplexní matici KVV je vhodné sledované látky před samotnou LC-ESI-MS/MS analýzou separovat a provést jejich zakoncentrování. Za tímto účelem byla testována imunoseparace imunoafinitními sorbenty a extrakce na pevné fázi (SPE). Použité metody se odlišují především selektivitou k daným analytům. Extrakce založená na reakci antigen – protilátka se vyznačuje vyšší selektivitou. Tato vysoce specifická reakce umožňuje oddělení nejen organických metabolitů od solí přítomných v KVV, jako je tomu i při extrakci na pevné fázi, ale i od dalších metabolitů kyseliny arachidonové. Dané separační metody byly optimalizovány z hlediska maximální výtěžnosti k sledovaným látkám.

### 5.3.2 Extrakce afinitními sorbenty

Imunoafinitní separace byla realizována přidavkem sorbentu do 1 ml KVV. Veškeré parametry imunoextrakce s použitím afinitních sorbentů pro prostaglandiny byly optimalizovány vzhledem k získání maximální výtěžnosti separace.

Typický průběh imunoextrakce je znázorněn na *obrázku 14* (pro 8-iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , obdobné byly získány i pro další prostaglandiny), kde je zachycena závislost doby imunoextrakce na separovaném množství. Z grafu je zřejmé, že s prodlužujícím se časem imunoextrakce dochází k nárůstu separovaného množství 8-iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$  z KVV, nicméně naproti tomu dochází k rozkladu látek v důsledku negativního vlivu teploty (25 °C) na jejich stabilitu. Po dosažení maxima separovaného množství v 60. minutě začíná převažovat proces degradace.

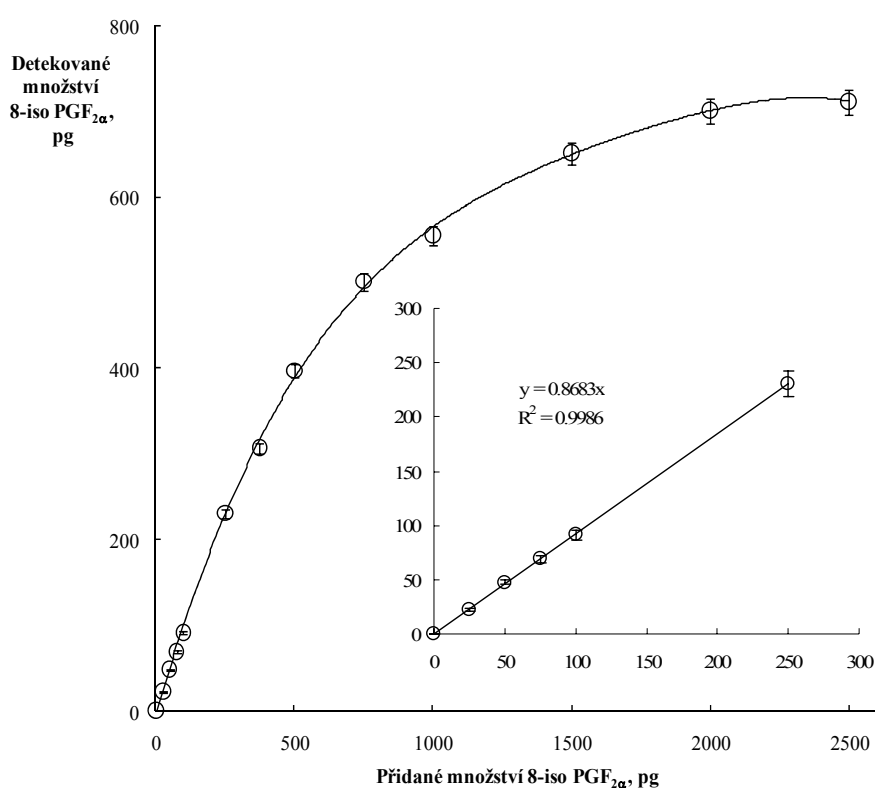


**Obrázek 14:** Stanovení optimální doby imunoextrakce 8-iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$

Neméně důležitým parametrem je poměr množství imunoafinitního sorbentu k 8-iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$  k objemu KVV (množství 8-iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$  v KVV se v klinických vzorcích pohybuje v intervalu 10 - 100 pg/1 ml). Závislost množství imunoextrakčně separovaných 8-iso  $\text{PGF}_{2\alpha}$  na jeho množství původně přítomném v KVV je zachyceno na *obrázku 15*, z něhož je zřejmé, že uvedená závislost má charakter adsorpční isotermy, na které je možné formálně vymezit dvě oblasti. V první oblasti

s lineární závislostí se s rostoucím množstvím biomarkerů v matrici zvyšuje i množství vzniklého komplexu antigen-protilátka (*zvětšená pracovní oblast*), zatímco v druhé, nelineární oblasti, se vyskytuje velké množství 8-iso PGF<sub>2α</sub> pro který není přítomné dostatečné množství volných protilátek na povrchu sorbentu. Z hlediska přesnosti metody bylo v klinických analýzách používáno 50 μl sorbentu, což odpovídá imunoextrakční separaci probíhající v lineární části závislosti.

Vazba antigen – protilátka byla následně rozvolněna metanolem. Získaný vzorek 8-iso PGF<sub>2α</sub> byl před nástřikem na systém LC-ESI-MS/MS upraven odpařením methanolu proudem dusíku a následně zbylý odparek byl naředěn 50 μl mobilní fáze. Uvedeným postupem bylo možné separovat více než 85 % v klinickém vzorku přítomných 8-iso PGF<sub>2α</sub>. V tabulce 3 jsou uvedeny validační hodnoty (limit detekce – LOD, limit kvantifikace – LOQ, správnost, přesnost a výtěžnost) pro imunoafinitní extrakci prostaglandinů.



**Obrázek 15: Závislost množství separovaného 8-iso PGF<sub>2α</sub> na jeho přidaném množství**

**Tabulka 3: Validační parametry pro prostaglandiny pro imunoafinitní metodu**

	8-iso PGF <sub>2α</sub>	PGD <sub>2</sub>	PGE <sub>2</sub>
LOD (pg/ml KVV)	1	1	1
LOQ (pg/ml KVV)	5	6	5
Správnost RE (%)	-16,0	-17,4	-18,5
Přesnost RSD (%)	9,5	10,7	11,5
Výtěžnost (%)	84	82	85

### 5.3.3 Extrakce na pevné fázi - SPE

Extrakce na pevné fázi byla prováděna na koloně s C18 (oktadecylovou) kartridgí obsahující 100 mg sorbentu, na které byla testována separace 8-iso PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> a PGE<sub>2</sub> v množství 10 až 2500 pg a HNE, MDA v množství 750-2500pg/ml. Závislost vyextrahovaného množství těchto látek na původním množství přítomném ve vzorku KVV byla na zvoleném intervalu lineární. Po zaktivování kolony (promytí 5 x 1ml methanolu a 3 x 1ml 0,05 M roztokem kyseliny mravenčí ve vodě) a nanesení vzorku na kolonu byla řada látek (hlavně solí) z matrice KVV vymyta 2 x 1ml vody. Analyty byly z kartridge eluovány methanolem (1ml). Další eluce methanolu (frakce sbírané vždy po 1ml) obsahovaly množství sledovaných látek pod limitem detekce. Před samotnou LC-ESI-MS/MS analýzou byl methanolký podíl odpařen proudem dusíku dosucha a získané látky následně byly rozpuštěny v 50 µl mobilní fáze.

**Tabulka 4: Validační parametry pro analyty pro extrakci na pevné fázi (SPE)**

	8-iso PGF <sub>2α</sub>	PGD <sub>2</sub>	PGE <sub>2</sub>	MDA	HNE
LOD (pg/ml KVV)	2	2	2	21	26
LOQ (pg/ml KVV)	9	10	12	32	39
Správnost RE (%)	-9,3	-9,7	-9,5	-7,1	-7,5
Přesnost RSD (%)	10,6	11,7	12,5	7,6	8,4
Výtěžnost (%)	92,1	90,1	91,8	92,3	91,8

### 5.4 Stabilita markerů v kondenzátu vydechovaného vzduchu

Většina biomarkerů obsažených v KVV je známa jako málo stabilní látky. Primární snahou při vývoji metody pro stanovení těchto látek v KVV bylo postihnout jejich chování v uvedené biologické matrici a nalézt postup přípravy vzorku vhodného pro hmotnostně-spektrometrickou analýzu umožňující zachytit koncentraci analytů bezprostředně po odebrání vzorku.

KVV (matrice s majoritním podílem vody) bezprostředně po odběru vykazuje hodnotu pH v rozmezí 7,2 - 7,7. Hodnota pH KVV se však v krátkém časovém intervalu snižuje (pH = 6,0 – 6,5) jako

důsledek absorpce CO<sub>2</sub> ze vzduchu, což může být jednou z příčin změn, které se v uvedené matici odehrávají po jejím odebrání. Při uchování KVV pod inertní atmosférou (argon) nebyla pozorována změna pH, nicméně v případě sledovaných analytů se tento parametr nejevil jako zásadní. Rovněž nebyl prokázán vliv světla na jejich stabilitu. Parametrem, který významně ovlivňuje obsah těchto biomarkerů, je teplota.

Jako zásadní parametr ovlivňující stabilitu 8-iso PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> a PGE<sub>2</sub> se ukázal vliv teploty. Citlivost 8-iso PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> a PGE<sub>2</sub> k teplotě je nejvíce patrný u teplot nad 0°C (4°C a 25°C) jak v mobilní fázi, tak v matici KVV, kde jsou pravděpodobně rozklady látek urychleny přítomností enzymů způsobující jejich odbourávání. Úbytek prostaglandinů po 6 hodinách se při teplotě 25°C snížil z původní koncentrace na 45,6 ± 7 % a při teplotě 4°C byl zaznamenán úbytek na hodnotu 67,2 ± 4,9 % původní koncentrace. Z důvodu uskladnění byly testovány teploty -20 a -80°C.

Teplota -20°C se ukázala vhodná jen pro krátkodobější skladování (po 30 dnech úbytek o 21,9 ± 4,6%), zatímco při -80 °C je možné vzorky skladovat až 180 dnů (úbytek o 12,36 ± 4,5%). Zlomovou teplotou pro stabilitu látek je zřejmě převedení vodné matrice z pevného do kapalného stavu (teplota 0 °C). S ohledem na uvedenou skutečnost byl posuzován parametr „cyklus rozmrazování - zmrazování“. Při každém obratu uvedeného cyklu dochází ke snížení množství prostaglandinů o 8-9 % z jejich původního množství v KVV.

Sledované aldehydy se oproti 8-iso PGF<sub>2α</sub>, PGD<sub>2</sub> a PGE<sub>2</sub> dají označit za stabilní látky v prostředí KVV (vodné prostředí s pH pohybující se v intervalu 6-8) a použité mobilní fáze za laboratorní teploty. Při teplotě 25 °C v obou maticích byl po šesti dnech zaznamenán úbytek MDA do 6,3 ± 2,1 % a HNE do 11,4 ± 2,3% z původního množství látky ve vzorku. Jako vhodnou skladovací teplotu lze použít -20°C po dobu nepřesahující jeden měsíc u obou látek (rozpad 10,4 ± 3,5% látek, po 3 měsících skladování okolo 30,3 ± 4,6 % látek) a teplotu -80 °C na dobu přesahující i 90 dnů (po 90 dnech zaznamenán úbytek 10,6 ± 2,1 % MDA a 14,3 ± 3,6 % HNE). Cyklus rozmrazení-zmrazení se výrazněji nepromítl do stability látek (po pěti cyklech ubylo 9,1 ± 3,1% MDA a 13,4 ± 3,6 % HNE).

#### 5.4.1 Klinická studie

Hladiny markerů oxidativního stresu jedinců s azbestovou/nebo silikózou (120 jedinců s diagnózou azbestózy nebo silikózy, věk 68 ± 8, průměrná doba působení azbestu, nebo křemíku 25 ± 6 let) byly srovnány s jedinci po expozici dioxiny (věk 69 ± 5 let) a s kontrolní skupinou (103 jedinců, věk 65 ± 7 let). Mezi jednotlivými skupinami byly prokázány statisticky významné rozdíly pro všechny sledované biomarkery oxidativního stresu. Hladina 8-iso PGF<sub>2α</sub> byla pro pacienty s azbestovou/nebo silikónovou expozicí 63,7 ± 10,6 pg/ml KVV, pro PGD<sub>2</sub> 55 ± 11,5 pg/ml KVV, pro PGE<sub>2</sub> 61 ± 12,2 pg/ml KVV pro MDA 3,1 ± 0,6 ng/ml KVV a pro HNE 11,2 ± 2,1 ng/ml KVV. U osob s expozicí dioxinu byly získány následující hodnoty: pro 8-iso PGF<sub>2α</sub> 50 ± 12,8 pg/ml KVV, pro PGD<sub>2</sub> 72 ± 11,4 pg/ml KVV, pro PGE<sub>2</sub> 85 ± 7,8 pg/ml KVV pro MDA 4,0 ± 0,5 ng/ml KVV a pro HNE 33 ± 2,6 ng/ml U zdravých jedinců byly detekovány koncentrace pro 8-iso PGF<sub>2α</sub> pohybující se v intervalu 37,6 ± 13,6 pg/ml KVV, pro PGD<sub>2</sub> 21 ± 1,4 pg/ml KVV, pro PGE<sub>2</sub> 45 ± 6,4 pg/ml KVV, pro MDA 1,5 ± 0,8 ng/ml KVV a HNE 6,6 ± 1,6 ng/ml KVV.



## 6 Závěr

Předkládaná práce je orientována do oblasti medicínální diagnostiky a zabývá se vývojem metodiky stanovení důležitých markerů plicních onemocnění. V rámci experimentální činnosti byla vyvinuta metoda pro detekci a kvantifikaci prostaglandinu  $E_2$  a  $D_2$ , 8-iso-PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , 4-hydroxynonenalu a malondialdehydu jako potenciálních biomarkerů plicních onemocnění v kondenzátu vydechaného vzduchu. Stanovení jejich koncentračních hladin v matrici KVV umožňuje neinvazivně monitorovat děje odehrávající se bezprostředně v plicích a dýchacích cestách nezávisle na procesech probíhajících v celém organismu, jak je tomu při stanovení těchto látek v krevní plazmě nebo moči.

Ačkoliv v nedávné době byla vyvinuta řada metod pro jejich stanovení v KVV a byla prokázána možnost diferenciální diagnostiky oxidativního stresu, neexistuje do současnosti standardizovaný postup pro stanovení jejich koncentračních hladin.

Princip vyvinuté metody spočívá na kombinaci vhodné extrakční techniky (SPE, imuno-separace) s vysoce selektivní a přesnou detekční metodou hmotnostní spektrometrie.

Jako zvolené extrakční techniky byly používány imunoafinitní extrakce a extrakce na pevné fázi. Jednotlivé separační techniky se liší specifitou k danému analytu. Nejvyšší selektivitou se vyznačuje imuno-separace založená na reakci antigenu s příslušnou protilátkou. Při využití SPE je daleko větší důraz kladen na samotnou analytickou metodu, kterou zde byla kapalinová chromatografie spojená s hmotnostním spektrometrem. Detekce 8-iso PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  byla ještě ztížena možným ovlivněním výsledku biologicky aktivními diastereomery přítomnými v KVV. Za použití vhodné kolony a mobilní fáze se podařil i tento problém úspěšně vyřešit.

Vyvinutou analytickou metodu lze charakterizovat nízkými limity detekce a kvantifikace, nízkou chybou stanovení, vysokou přesností a vysokou selektivitou.

Vyvinutá metoda pro detekci biomarkerů v KVV byla testována na klinických vzorcích, kde byla prokázána možnost použití této metody v klinické praxi. Byl prokázán statisticky významný rozdíl mezi korelací hladiny biomarkerů a poškozením dýchacích cest a plic. Tuto metodu lze charakterizovat jako zcela neinvazivní pro diagnostiku oxidativního stresu.

## 7 Seznam literatury

1. Scheideler L., Manke H.G., Schwulera U., Inacker O., Hammerle H.: American Review Respiratory Disease. (1993), s. 148, 778.
2. Montuschi P., Barnes J. P.: Trends in Pharmacological Sciences (2002), s. 23, 232
3. Čáp ,P., Pehal F., Petrů V, Musil J., Alergie (2001), s. 3, 275
4. Zakrzewski J. T., Barnes N. C., Costello J. F., Piper P. J.: American Review Respiratory. Disease (1987), s. 136, 779
5. Horváth I., Hunt J., Barnes P. J.: European Respiratory Journal (2005), s. 26, 523
6. Syslová K.: Vývoj neinvazivní diagnostiky asthma bronchiale metodou kombinující immunoafinitní separaci s hmotnostně spektrometrickou detekcí (2008)
7. Zwert L. L., Meermann J. H. N., Commandeur N. M., Vermeulen N. P. E., Free Radical Biology and Medicine (1999), s. 26, 202
8. Babaev V. R., Ding L., Reese J., Morrow J. D., Breyer M. D., Dey S. K., Fazio S., Linton MacRae F.: Circulation (2006), s. 113,108
9. <http://arnika.org/dioxin/> (27.2.2009)  
<http://web.ujep.cz/nicova/ostatni.htm> (27.2.2009)
10. Reynolds H.Y.: Lung (2000), s. 178, 271
11. Holz O., Kips J., Magnussen H.: European Respiratory Journal (2000), s. 16, 355
12. Antczak A., Montuschi P., Kharitonov S. A., Gorski P., Barnes P. J.: American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine (2002), s. 166, 301
13. Baraldi E., Carraro S., Alinovi R., Pesci A., Ghiro L., Bodini A., Piacentini G., Zacchello F., Zanconato S.: Thorax (2003), s. 58, 505
14. Gonzalez-Reche L. M., Musiol A. K., Müller-Lux A., Kraus T., Gen T.:J. Occupat. Med. Tox. 1: (2006), s. 5
15. Bílková Z, Mazurová J., Churáček J., Horák D., Turková J.: The Journal of Chromatography A (1999), s. 852, 141
16. Hanazawa T., Kharitonov S. A., Barnes P. J.: American Journal of Respiratory and. Critical Care Medicine (2001), s. 162, 1175