

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

**Stanovení 4-hydroxy-*trans*-nonenalů v seminální plazmě
metodou kapalinové chromatografie**

Bc. Veronika Míková

Diplomová práce
2012

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2011/2012

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Míková**
Osobní číslo: **C10916**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**
Název tématu: **Stanovení 4-hydroxy-trans-nonenalu v seminální plazmě meto-
dou kapalinové chromatografie**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Teoretická část
 - a) Oxidační stres
 - b) 4-Hydroxy-trans-nonenal jako ukazatel lipoperoxidace Možnosti stanovení 4-hydroxy-trans-nonenalu v seminální plazmě
 - 2) Praktická část
 - a) Příprava a zpracování ejakulátu a seminální plazmy pro stanovení 4-hydroxy-trans-nonenalu metodou kapalinové chromatografie
 - b) Výběr pacientů pro posouzení vhodnosti použití 4-hydroxy-trans-nonenalu jako možného ukazatele oxidačního stresu a lipoperoxidace u lidských spermii
- Statistické vyhodnocení

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce:

doc. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce:

3. října 2011

Termín odevzdání diplomové práce:

4. května 2012



prof. Ing. Petr Lošťák, DrSc.

děkan

L.S.



doc. RNDr. Zuzana Bílková, Ph.D.

vedoucí katedry

V Pardubicích dne 23. února 2011

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 ods. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním přístupem své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 4.5.2012

Veronika Míková

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu práce doc. Mgr. Romanu Kandárovi, Ph.D., za odbornou pomoc, cenné rady a ochotu při vedení v průběhu celé práce. Dále bych chtěla poděkovat Mgr. Petře Drábkové.

Také děkuji pacientům, kteří poskytli vzorky seminální plazmy, a všem zaměstnancům Centra asistované reprodukce Sanus v Pardubicích.

Dále patří poděkování mé rodině za podporu po celou dobu studia.

SOUHRN

Oxidační stres vyvolaný volnými radikály způsobuje lipoperoxidaci plazmatické membrány. 4-Hydroxy-*trans*-nonenal je jedním z nejvýznamnějších produktů lipoperoxidace, je velmi reaktivní a toxický. Vzniká z hojně rozšířených ω -6 nenasycených mastných kyselin, které se vyskytují ve velkém množství v plazmatické membráně spermií.

Pro stanovení 4-hydroxy-*trans*-nonenalu jsme využili reakci s 1,3-cyklohexandionem za vzniku 9-alkylakridinového derivátu. Vzniklý derivát jsme separovali pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s fluorescenční detekcí při excitační vlnové délce 385 nm a emisní vlnové délce 445 nm.

Byla použita kolona Discovery[®] C18, 15 cm x 2,1 mm, 5 μ m, opatřená předkolonovým PEEK filtrem. Mobilní fáze byla směs ethanolu a deionizované vody, eluce byla gradientová. Průtok mobilní fáze byl udržován na hodnotě 0,160 ml/min.

Kalibrační křivka byla lineární v celém rozsahu testovaných koncentrací 4-hydroxy-*trans*-nonenal.

Nejnižší koncentrace HNE, která může být kvantifikována s přijatelnou správností a přesností je 50 fmol/nástřík. Detekční limit byl 15 fmol/nástřík.

Klíčová slova: 4-Hydroxy-*trans*-nonenal, seminální plazma, vysokoúčinná kapalinová chromatografie

SUMMARY

Oxidative stress evoked free radicals caused plasma membrane lipoperoxidation. 4-Hydroxy-*trans*-nonenal is the most significant aldehydic product, it is very reactive and toxic. 4-Hydroxy-*trans*-nonenal is formed by peroxidation of ω -6 unsaturated fatty acids, that are present in large quantities in the plasma membrane of sperm.

For the determination of 4-hydroxy-*trans*-nonenal we used 1,3-cyclohexanedione reagent to derivatize the aldehyde and to analyze the fluorescent 9-alkylakridine derivate by high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detection at excitation 385 nm and at emission 445 nm.

We used a Discovery[®] C18 column, 15 cm x 2.1 mm, 5 μ m, equipped with pre-column PEEK filter. Mobile phase was a mixture of ethanol and deionized water, the elution was gradient. Mobile phase flow rate was maintained at 0.160 mL/min.

Calibration curve was linear in the whole range of tested concentrations of 4-hydroxy-*trans*-nonenal.

The lowest concentrations of HNE, which can be quantified with acceptable accuracy and precision is 50 fmol/injection. The detection limit was 15 fmol/injection.

Keywords: 4-Hydroxy-*trans*-nonenal, seminal plasma, high-performance liquid chromatography

SEZNAM ZKRATEK

2,4-DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
4(S)-HPNE	4-hydroperoxy-2-nonenal
9(S)-HPODE	9S-hydroperoxy-10,12-oktadekadienová kyselina
13(S)-HPODE	13S-hydroperoxy-9,11-oktadekadienová kyselina
AA	kyselina arachidonová
BHT	butylovaný hydroxytoluen
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ESI	ionizace elektrosprejem
GC/MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem
GC/NICIMS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostním spektrometrem a chemickou ionizací v negativním módu
GSH	glutathion
GSH-HNE	glutathionyl-4-hydroxynonenal
GST	glutathion-S-transferasa
HHE	4-hydroxy-2-hexanal
HNA	4-hydroxy-2-nonenová kyselina
HNE	4-hydroxy- <i>trans</i> -nonenal
HNE-DA	4-hydroxynonenal-dimethylacetal
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
CHD	1,3-cyklohexandion
LA	kyselina linolová
LIF	laserem indukovaná fluorescence
LPO	lipoperoxidace
MALDI-TOF-MS	matrix assisted laser desorption/ionization - time of flight mass spectrometry
MDA	malondialdehyd
MS	hmotnostní spektrometrie
NBD-ProCZ	4-(2-karbazoylpyrrolidiny)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol
PFBHA.HCl	<i>O</i> -(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)-hydroxylaminhydrochlorid

PUFA	polynenasycené mastné kyseliny
<i>O</i> -PFB	<i>O</i> -pentafluorobenzyloximový derivát
r.p.m.	otáčky za minutu
RNS	reaktivní sloučeniny dusíku
RONs	reaktivní sloučeniny kyslíku a dusíku
ROS	reaktivní sloučeniny kyslíku
SPE	extrakce na tuhé fázi
SPME	mikroextrakce na tuhé fázi
TLC	tenkovrstevná chromatografie
VR	volné radikály

OBSAH

1 ÚVOD.....	12
2 TEORETICKÁ ČÁST	13
2.1. Oxidační stres.....	13
2.1.1. Volné radikály.....	13
2.1.2. Reaktivní sloučeniny kyslíku a dusíku	13
2.1.2.1. Vliv RONS na spermie	14
2.1.2.2. Zdroje reaktivních forem kyslíku a dusíku	15
2.2.2.2.1. Leukocyty	15
2.2.2.2.2. Spermie	15
2.1.2.3. Biologická úloha reaktivních forem kyslíku a dusíku	15
2.1.2.4. Hladiny reaktivních forem kyslíku a dusíku.....	15
2.1.3. Antioxidanty	16
2.1.3.1. Enzymatické a neenzymatické antioxidanty.....	16
2.1.3.2. Antioxidační terapie.....	16
2.2. 4-Hydroxy-trans-nonenal jako ukazatel lipoperoxidace	17
2.2.1 Polynenasycené mastné kyseliny.....	17
2.2.2. Lipoperoxidace	17
2.2.2.1. Mechanismus lipoperoxidace	17
2.2.2.2. Neenzymový mechanismus lipoperoxidace.....	19
2.2.2.3. Enzymový mechanismus lipoperoxidace.....	19
2.3. 4-Hydroxy-trans-nonenal.....	21
2.3.1. Reaktivita HNE.....	21
2.3.2. Mechanismus vzniku HNE	22
2.3.3. Metabolismus HNE.....	24
2.4. Možnosti stanovení 4-hydroxy-trans-nonenalu	25
2.4.1. Metody stanovení HNE v seminální plazmě	25
2.4.1.1. Stanovení HNE s využitím hmotnostního spektrometru	25
2.4.2. Metody stanovení HNE v biologických vzorcích.....	25
2.4.2.1. Stanovení volného HNE pomocí HPLC s UV detekcí	25
2.4.2.2. Stanovení HNE po derivatizaci 2,4-DNPH metodou HPLC s UV detekcí.....	26

2.4.2.3. Imunochemické stanovení	26
2.4.2.4. Stanovení HNE po derivatizaci s 1,3-cyklohexandionem metodou HPLC s fluorescenční detekcí.....	27
2.4.2.5. Stanovení HNE metodou GC nebo HPLC s využitím SPME	28
2.4.2.6. Stanovení HNE metodou HPLC s LIF	28
2.4.2.7. Ostatní metody	28
3 CÍL PRÁCE	30
4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	31
4.1. Stanovení 4-hydroxy-trans-nonenalu v seminální plazmě.....	31
4.1.1. Vzorky	31
4.1.2. Chemikálie	31
4.1.3. Pomůcky a přístroje	32
4.1.4. Pracovní roztoky	33
4.1.5. Postup stanovení 4-hydroxy-trans-nonenalu v seminální plazmě.....	35
4.1.5.1. Příprava vzorků.....	35
4.1.5.2. Příprava standardů	35
4.1.5.3. HPLC analýza	36
4.1.5.4. Kalibrace	36
4.1.5.5. Analytické parametry.....	37
4.1.5.6. Zpracování výsledků.....	39
5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	40
6 ZÁVĚR	48
7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	49

PŘÍLOHA

1 ÚVOD

Volné radikály způsobují lipoperoxidaci, při které vzniká mnoho toxických produktů, mezi nimi i řada aldehydů. Velmi citlivé k peroxidaci jsou lipidy obsahující polynenasycené mastné kyseliny (PUFA). V plazmatické membráně spermií se nejvíce vyskytují ω -6 PUFA, jejichž lipoperoxidací vzniká 4-hydroxy-*trans*-nonenal (HNE).

4-Hydroxy-*trans*-nonenal je označován za hlavní produkt peroxidace lipidů, oproti ostatním aldehydům vzniká v relativně velkém množství. Jeho vysoká reaktivita je způsobena třemi funkčními skupinami, pomocí kterých může reagovat s lipidy, aminokyselinami, proteiny a nukleovými kyselinami. Právě jeho vysoká reaktivita je zodpovědná za jeho vlastnosti, HNE je mutagenní, cytotoxický i genotoxický.

HNE je považován za spolehlivý marker oxidačního stresu. V seminální plazmě je detekovatelný nejenom za podmínek oxidačního stresu, ale i za fyziologických podmínek. Nadměrná produkce HNE je spojována s mužskou neplodností, proto je organismus schopen HNE efektivně metabolizovat a chránit tak buňky před oxidačním poškozením.

Pro stanovení HNE bylo vypracováno velké množství metod využívajících HPLC s různými způsoby detekce, plynovou chromatografií, hmotnostní spektrometrií, i imunochemické stanovení.

Cílem této práce bylo ověřit experimentální metodu pro stanovení 4-hydroxy-*trans*-nonenal v seminální plazmě za použití HPLC s fluorescenční detekcí a určit, zda je tato metoda použitelná pro klinickou praxi.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Oxidační stres

Porušení rovnováhy mezi vznikem a odstraňováním reaktivních sloučenin kyslíku a dusíku (RONS, reactive oxygen and nitrogen species) se nazývá oxidační stres.

Může být vyvolán nadměrnou tvorbou RONS, nedostatečnou funkcí antioxidantního systému, případně kombinací obou faktorů. Tyto látky mají značný fyziologický i patologický význam. Ochotně reagují s různými biologickými strukturami – lipidy, mastnými kyselinami, aminokyselinami, proteiny, nukleovými kyselinami i s řadou nízkomolekulárních metabolitů, koenzymů a jiných součástí živé hmoty. Díky tomu se staly významnými prostředníky přenosu energie, faktory imunitní ochrany a signálními molekulami buněčné regulace (Štípek a kol. 2000).

2.1.1. Volné radikály

Volné radikály (VR) jsou atomy, molekuly či ionty, které mají ve svém elektronovém obalu jeden nebo více nepárových elektronů (Cocuzza a kol. 2007).

Volný radikál vzniká z molekuly homolytickým štěpením kovalentních vazeb (každý fragment získá jeden nepárový elektron), popřípadě přidáním jednoho elektronu k normální molekule redukcí nebo ztrátou jednoho elektronu oxidací. Vznik radikálu může být iniciací celého řetězce dalších reakcí (Štípek a kol. 2000).

VR jsou velmi reaktivní, protože se snaží získat další elektron a doplnit si tak elektronový pár do stabilní konfigurace. Pokud radikál reaguje s normální molekulou, radikálová reakce se propaguje do okolí. Teprve reakcí dvou radikálů se nepárové elektrony spojí ve dvojici, dojde k terminaci a radikálová reakce se ukončí (Buonocore a kol. 2010).

2.1.2. Reaktivní sloučeniny kyslíku a dusíku

V organismu běžně vzniká řada reaktivních forem kyslíku (ROS, reactive oxygen species) a reaktivních forem dusíku (RNS, reactive nitrogen species).

Nejdůležitější reaktivní formy kyslíku jsou shrnuty v tabulce 1 a reaktivní formy dusíku v tabulce 2 (Štípek a kol. 2000).

Volné radikály	Neradikálové látky
superoxid, $O_2^{\bullet-}$	peroxid vodíku, H_2O_2
hydroxylový radikál, HO^{\bullet}	kyselina chlorná, $HOCl$
peroxyl, RO_2^{\bullet}	ozon, O_3
alkoxyl, RO^{\bullet}	singletový kyslík, 1O_2
hydroperoxyl, HO_2^{\bullet}	

Tab. 1 Reaktivní formy kyslíku (Štípek a kol. 2000)

Volné radikály	Neradikálové látky
oxid dusnatý, NO^{\bullet}	nitrosyl, NO^+
oxid dusičitý, NO_2^{\bullet}	kyselina dusitá, HNO_2
	oxid dusitý, N_2O_3
	oxid dusičitý, N_2O_4
	nitronium, NO_2^+
	peroxynitrit, $OONO^-$
	alkylperoxynitrit, $ROONO$

Tab. 2 Reaktivní formy dusíku (Štípek a kol. 2000)

Nejčastějšími ROS, které mají vliv na reprodukční systém mužů jsou superoxidový anion ($O_2^{\bullet-}$), peroxid vodíku (H_2O_2), peroxylový radikál (ROO^{\bullet}) a velmi reaktivní hydroxylový radikál (HO^{\bullet}) (Chari a Colagar 2011).

2.1.2.1. Vliv RONS na spermie

Spermie jsou zvláště náchylné na poškození vyvolané nadměrnou tvorbou RONS, protože jejich plazmatické membrány obsahují velké množství ω -6 nenasycených mastných kyselin (PUFA), které snadno podléhají peroxidaci lipidů, což má za následek ztrátu membránové integrity (Cocuzza a kol. 2007, Oborna a kol. 2010). Existuje stále více důkazů, že lipoperoxidace a následné poškození plazmatické membrány spermií hraje důležitou roli v mechanismu mužské neplodnosti (Tavilani a kol. 2008). Zvýšení hladiny RONS bylo zaznamenáno u 40 % neplodných mužů (Shiva a kol. 2011).

2.1.2.2. Zdroje reaktivních forem kyslíku a dusíku

Zdroje RONS mohou být endogenního i exogenního původu. Endogenní zdroje zahrnují dýchací řetězec v mitochondriích, metabolismus cytochromu P450 a buňky imunitního systému (neutrofilů, eosinofilů a makrofágů). Mezi exogenní zdroje RONS se řadí xenobiotika, látky přítomné v životním prostředí, různé druhy záření, kouření a alkohol (Cocuzza a kol. 2007). V seminální plazmě jsou nejdůležitějšími zdroji RONS leukocyty a spermie (Saleh a Agarwal 2002).

2.2.2.2.1. Leukocyty

Peroxidasa-pozitivní leukocyty představují hlavní zdroj ROS v seminální plazmě. Mezi peroxidasa-pozitivní leukocyty se řadí polymorfonukleáry, které představují 50 - 60 % leukocytů obsažených v seminální plazmě, a makrofágy, které tvoří 20 - 30 % seminálních leukocytů. Aktivované leukocyty jsou schopné produkovat až stonásobně větší množství ROS než neaktivované leukocyty. K aktivaci leukocytů dochází během infekce či zánětu (Saleh a Agarwal 2002).

2.2.2.2.2. Spermie

Spermie mohou produkovat ROS dvěma způsoby. První je systém NADPH-oxidasy na úrovni cytoplazmatické membrány spermií a druhý je systém NADH-dependentní oxidoreduktasy na úrovni mitochondrií (Saleh a Agarwal 2002).

2.1.2.3. Biologická úloha reaktivních forem kyslíku a dusíku

Malé množství RONS při běžném aerobním metabolismu spermií je nezbytné pro zrání spermií, kapacitaci, akrozomovou reakci, při vazbě spermie na glykoproteinový obal vajíčka a při průniku spermie vajíčkem (Henkel 2011, Sanocka a kol. 2004).

2.1.2.4. Hladiny reaktivních forem kyslíku a dusíku

Nejvyšší hladiny RONS produkovaly nezralé spermie s abnormální morfologií hlavičky a s retencí přebytečné cytoplazmy. Naopak nejnižší hladiny byly naměřeny u nezralých zárodečných buněk a zralých spermií (Gil-Guzman a kol. 2001).

2.1.3. Antioxidanty

Reaktivní formy kyslíku a dusíku jsou nezbytné pro fyziologickou funkci spermií, ale jejich koncentrace musí být udržována na úrovni, kdy nedochází k poškození buněk. Proto je v seminální plazmě přítomna řada antioxidantů, které udržují stabilní stav RONS (Abdul-Rasheed 2010).

2.1.3.1. Enzymatické a neenzymatické antioxidanty

Z antioxidantních enzymů jmenujme superoxiddismutasu (EC 1.15.1.1), katalasu (EC 1.11.1.6), glutathionperoxidasu (EC 1.11.1.9) a glutathion-S-transferasu (EC 2.5.1.18). Navíc sperma obsahuje celou řadu neenzymatických antioxidantních látek, např. vitamin C, vitamin E, pyruvát, glutathion, karnitin, selen, zinek, hořčík a koenzym Q10 (Chari a kol. 2011, Holeček 2006). Například kyselina askorbová je významným scavengerem RONS. V seminální plazmě je ji zhruba desetkrát více v porovnání s krevní plazmou (Shiva a kol. 2011).

2.1.3.2. Antioxidační terapie

Bylo prokázáno, že neplodní muži mají sníženou antioxidační kapacitu ejakulátu (Holeček 2006), a proto se u neplodných mužů doporučuje antioxidační terapie, která může pozitivně ovlivnit počet, pohyblivost a morfologii spermií (Imhof a kol. 2012). Ovšem oxidační stres nelze považovat za jediný důvod mužské neplodnosti (Cocuzza a kol. 2007).

2.2. 4-Hydroxy-*trans*-nonenal jako ukazatel lipoperoxidace

2.2.1 Polynenasycené mastné kyseliny

Společným rysem ω -6 mastných kyselin je dvojná vazba na šestém uhlíku od methylenového konce. Tyto mastné kyseliny se hojně vyskytují v buněčných membránách (Poli a Schaur 2000). Do této skupiny polynenasycených mastných kyselin se řadí kyselina linolová (LA), ω -6 mastná kyselina s nejkratším řetězcem. LA je prekurzorem dalších ω -6 mastných kyselin. Kyselina arachidonová (AA) je ω -6 mastná kyselina s dvaceti uhlíky. Z významných zdrojů těchto PUFA lze jmenovat drůbeží maso, vejce, ořechy, řepkový, slunečnicový a lněný olej.

Dopad ω -6 mastných kyselin na zdraví není tak jednoznačně pozitivní, jak je tomu u ω -3 mastných kyselin. Záleží totiž na poměru těchto dvou skupin mastných kyselin. Protože ω -6 a ω -3 mastné kyseliny spolu soutěží o stejné enzymy, může zvýšená hladina ω -6 PUFA vést k řadě nemocí (Safarinejad a kol. 2010).

2.2.2. Lipoperoxidace

Lipoperoxidace (LPO) je autooxidační radikálová řetězová reakce. Této reakci podléhají mastné kyseliny obsahující více dvojných vazeb – polyenové mastné kyseliny. Schéma peroxidace nenasycené mastné kyseliny je znázorněno na obrázku 1 (Štípek a kol. 2000).

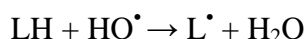
Tento proces vede ke vzniku hydroperoxidů, které podléhají dalším přeměnám a vznikají tak sekundární metabolity. Většinou bývají velmi reaktivní a způsobují poškození struktury a funkce dalších biomolekul, nejčastěji právě lipidů, ale také proteinů a nukleových kyselin.

Mezi hlavní a nejvíce toxické produkty lipoperoxidace se řadí 4-hydroxy-*trans*-nonenal (HNE), 4-hydroxy-2-hexanal (HHE) a malondialdehyd (MDA) (Catala 2009).

2.2.2.1. Mechanismus lipoperoxidace

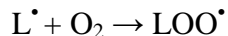
Radikálové reakce probíhají většinou ve třech fázích – iniciace, propagace a terminace. Iniciace je pochod, při němž je molekula mastné kyseliny napadena volným kyslíkovým radikálem. V souvislosti s LPO je největší význam přikládán působení hydroxylového radikálu HO^\bullet , ale iniciaci mohou samozřejmě vyvolat i jiné radikály.

Každá látka, která má dostatečnou afinitu k elektronům a dokáže vytrhnout vodíkový atom z methylenové skupiny uhlovodíkového řetězce mastné kyseliny (-CH₂), může zahájit radikálovou reakci v membránových lipidech. Mastná kyselina nebo lipid se stává uhlíkovým radikálem (HC[•], carbon centered radical) (Štípek a kol. 2000, Valko a kol. 2006).

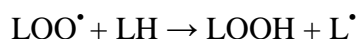


Vazba mezi atomem uhlíku a vodíku je oslabena dvojnou vazbou, a proto PUFA podléhají peroxidaci snadněji než jiné biomolekuly. Mezi látky, které jsou schopné vytrhnout atom vodíku z PUFA a iniciovat peroxidaci, patří hydroxylový radikál HO[•], alkoxylový radikál RO[•] a peroxylový radikál ROO[•].

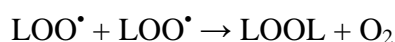
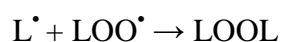
Po vytržení vodíku se elektrony v uhlovodíkovém řetězci mastných kyselin přeskupí tak, že se mezi dvěma dvojnými vazbami vytvoří vazba jednoduchá a vznikne tak konjugovaný dien. Tyto látky se snadno spojují s molekulárním kyslíkem na peroxylový radikál (Štípek a kol. 2000, Catala 2009, Valko a kol. 2006).



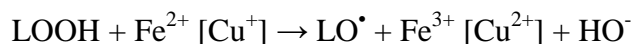
Touto reakcí nastupuje fáze propagační. Propagace je autokatalytický proces, kdy radikály mastných kyselin reagují řetězově s kyslíkem a dalšími PUFA a vznikají tak hydroperoxy – primární produkty LPO. LOO[•] je schopen vytrhnout elektron z mastné kyseliny sousedního lipidu, který se stane novým radikálem, zatímco peroxylový radikál se přemění na lipidový hydroperoxid (LOOH) (Štípek a kol. 2000).



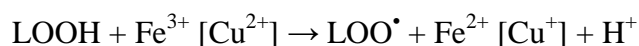
Radikálová reakce se tak v lipidech propaguje, dokud se radikál PUFA nesetká s jiným radikálem (nebo s antioxidantem), kdy se řetězová reakce ukončí vznikem stabilní sloučeniny.



Výslednými produkty popsaného sledu reakcí jsou hydroperoxydy a cyklické peroxydy mastných kyselin, které se chemicky chovají stejně jako peroxid vodíku. Jsou tedy poměrně stálé, dokud se nesetkají s tranzitními kovy, které katalyzují Fentonovu reakci. A tak se lipidové peroxydy mění na alkoxylové radikály LO^\bullet a hydroxidový anion HO^- (Štípek a kol. 2000, Catala 2009, Valko a kol. 2006).



Trojmocné železo reaguje s lipidovými peroxydy mnohem pomaleji za vzniku peroxylového radikálu LOO^\bullet .



Tato reakce vysvětluje, proč organismy uskladňují katalyticky aktivní železo a měď do ferritinu, transferrinu, atd. V přítomnosti Fe^{3+} totiž dochází k výrazné stimulaci LPO redukčními látkami, jako je např. superoxid (Štípek a kol. 2000).

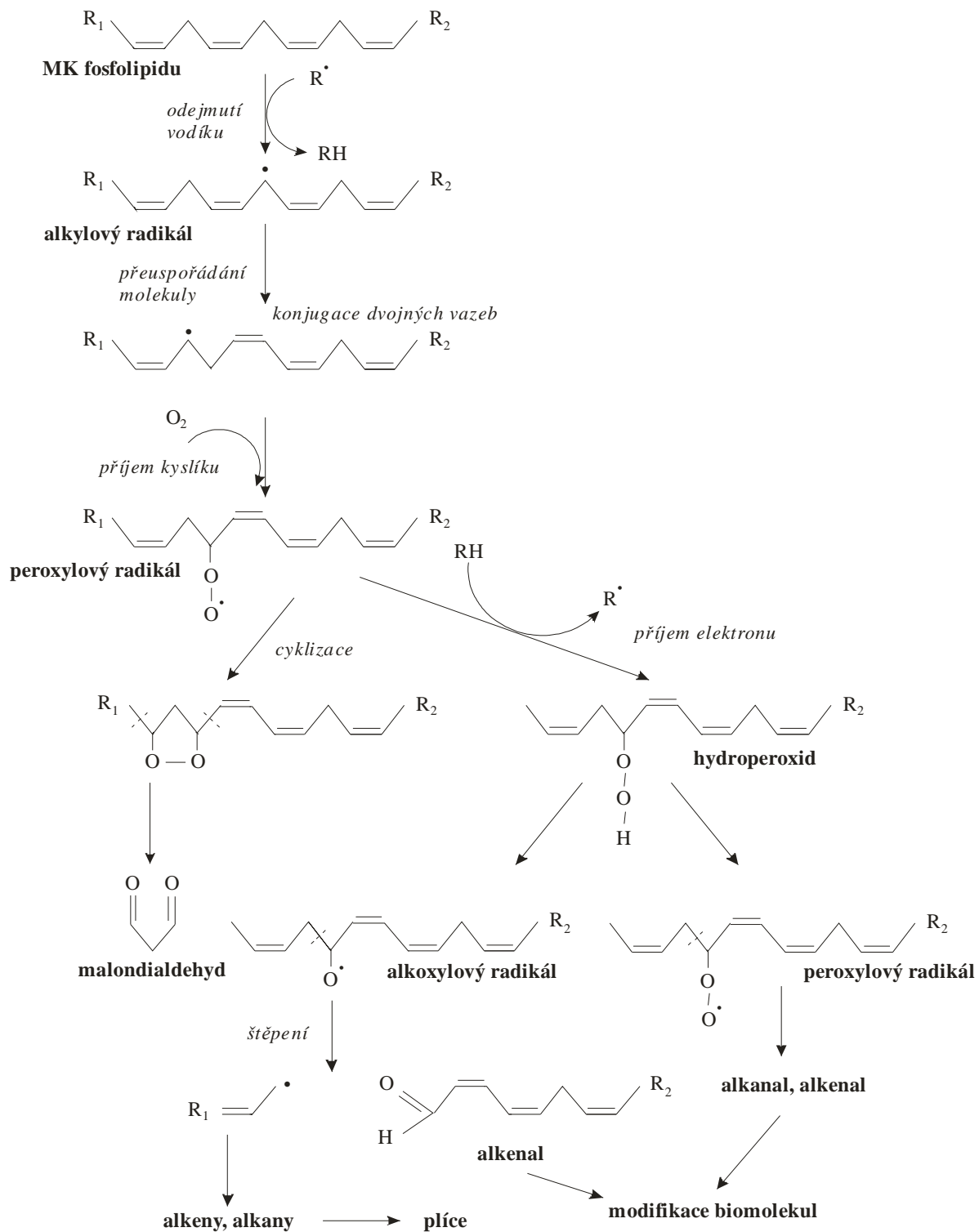
2.2.2.2. Neenzymový mechanismus lipoperoxidace

Neenzymový mechanismus lipoperoxidace je vyvolán nescifickými, mnohdy patologickými faktory. Vzniká směs různých produktů, protože řetězce modifikovaných mastných kyselin se snadno štěpí na kratší produkty, včetně vydechovaných uhlovodíků jako jsou ethan, pentan a toxické aldehydy 4-hydroxy-*trans*-nonenal a malondialdehyd.

Peroxidace mění fluiditu membrán, zvyšuje propustnost pro ionty, a tak způsobuje lýzu buněk a snížení membránového potenciálu (Štípek a kol. 2000).

2.2.2.3. Enzymový mechanismus lipoperoxidace

Enzymový mechanismus lipoperoxidace probíhá na aktivních centrech hydroperoxidasy a endoperoxidasy (cyklooxygenasy EC 1.14.99.1, lipoxygenasy EC 1.13.11.12) a produkuje biologicky aktivní látky, jako jsou prostaglandiny a leukotrieny, které jsou důležité v řízení buněčných dějů a ochranných pochodech. Vznikající volné radikály zůstávají navázány na enzymech a neunikají do prostředí (Štípek a kol. 2000).



Obr. 1 Schéma peroxidace nenasyčené mastné kyseliny (Štípek a kol. 2000)

2.3. 4-Hydroxy-*trans*-nonenal

4-Hydroxy-*trans*-nonenal je konečný produkt membránové lipoperoxidace ω -6 PUFA – kyseliny linolenové a arachidonové (Backos a kol. 2011, Markovic a kol. 2010). Je označován za hlavní produkt peroxidace lipidů, oproti ostatním aldehydům vzniká v relativně velkém množství. HNE je považován za druhého posla volných radikálů. Důvodem je delší životnost aldehydů oproti volným radikálům a schopnost difundovat z místa vzniku do vzdálenějších cílů (Strohmaier a kol. 1995).

Dále je považován za spolehlivý marker oxidačního stresu a je zodpovědný za mnoho nežádoucích účinků, lýzu erytrocytů, inaktivaci enzymů a inhibici syntézy proteinů a DNA (Szweda a kol. 1993, Jaganjac a kol. 2010, Dianzani 2003). Lze ho poměrně snadno detekovat za fyziologických podmínek (Alary a kol. 2003).

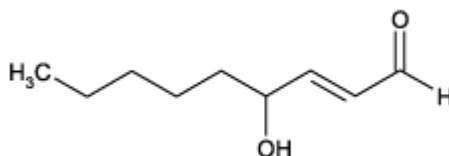
HNE je vysoce lipofilní sloučenina, což může vést k jeho akumulaci v biomembránách (Schaur 2003, Selley a kol. 1991).

Bylo prokázáno, že se nachází v ejakulátu, kde má vliv na pohyblivost a životaschopnost spermií (Windsor a kol. 1993). Jeho nadměrná produkce je spojována s mužskou neplodností (Selley a kol. 1991).

2.3.1. Reaktivita HNE

Volný HNE je vysoce elektrofilní činidlo, váže se do struktur DNA, proteinů (většinou reaguje s thiolovou skupinou cysteinu, imidazolovou skupinou histidinu a s aminoskupinou lysinu), peptidů nebo fosfolipidů (Dostálek 2007).

Jeho vysoká reaktivita je způsobena třemi funkčními skupinami: karbonylem, dvojnou vazbou mezi druhým a třetím atomem uhlíku konjugovanou s karbonylem a hydroxylovou skupinou na čtvrtém atomu uhlíku (Poli a kol. 2000, Schaur 2003). Struktura HNE je zobrazena na obrázku 2. Důsledkem jeho vysoké reaktivity a vazby s biologicky významnými sloučeninami, je HNE silně mutagenní, cytotoxický a genotoxický (Carini a kol. 2004, Dostálek 2007).



Obr. 2 Struktura 4-hydroxy-*trans*-nonenalu

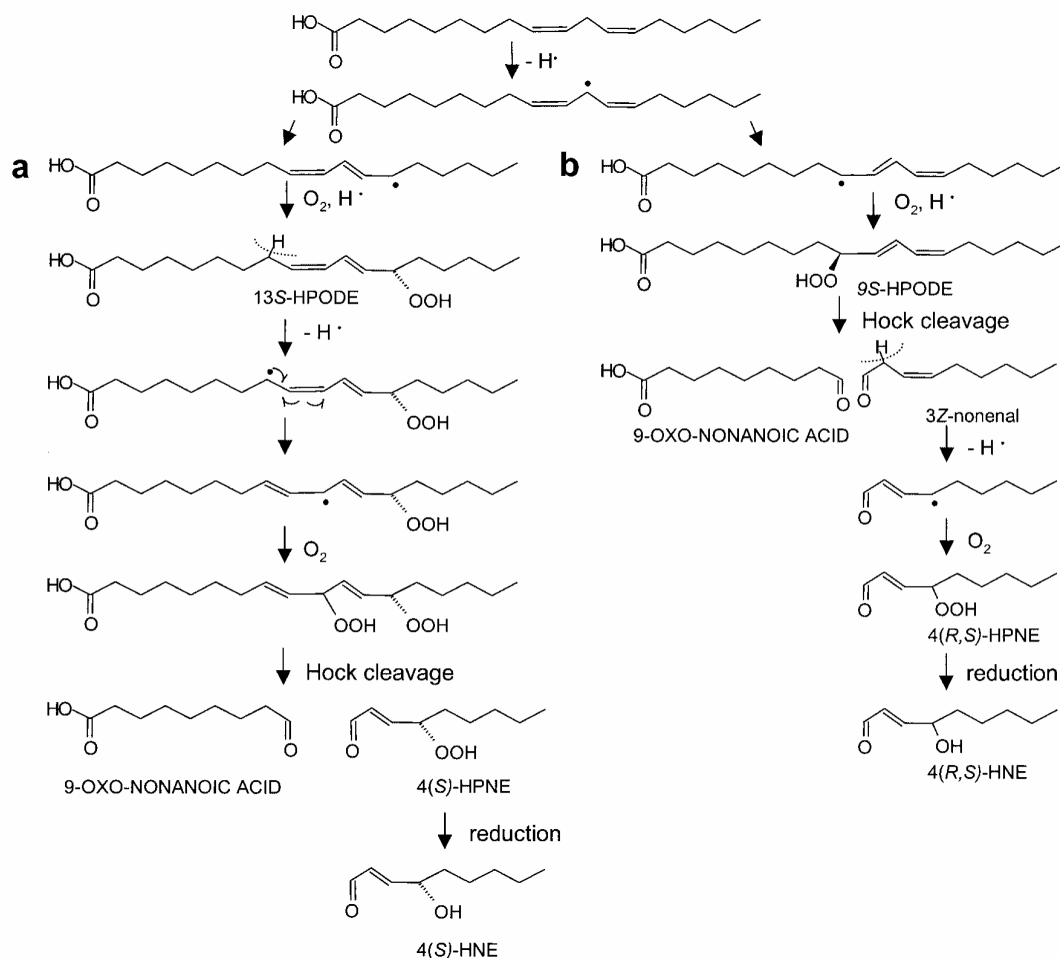
2.3.2. Mechanismus vzniku HNE

Přesný mechanismus degradace uhlíkového řetězce vedoucí od hydroperoxidů ω -6 PUFA k 4-hydroxy-*trans*-nonenalu není dosud spolehlivě znám (Schneider a kol. 2005)

Zjednodušená dráha formace HNE během peroxidace ω -6 nenasycené mastné kyseliny arachidonové a linolové je znázorněna na obrázku 3.

Existují nejméně dva nezávislé mechanismy. V prvním z nich vzniká hydroperoxid odvozený od kyseliny linolové, 13S-hydroperoxy-9,11-oktadekadienová kyselina (13(S)-HPODE). U LA dochází k vytržení vodíku na osmém atomu uhlíku, vzniká radikálový meziprodukt, který po přesunu radikálu na desátý uhlík a oxidaci dává odpovídající dihydroperoxidový derivát. Hydroperoxylová skupina na desátém atomu uhlíku se rozštěpí (tvz. Hockovo štěpení) na dva aldehydické fragmenty, kyselinu 9-oxononanovou a 4-hydroperoxy-2-nonenal (4(S)-HPNE). 4(S)-HPNE je redukován na 4(S)-hydroxynonenal.

Druhý mechanismus vychází z 9(S)-hydroperoxy-10,12-oktadekadienové kyseliny (9(S)-HPODE), která je rozštěpena na 9-oxononanovou kyselinu a 3-nonenal. 3-Nonenal je na čtvrtém atomu uhlíku peroxidován na racemický 4-hydroperoxy-2-nonenal (4(R,S)-HPNE). Následuje redukce 4(R,S)-HPNE na 4(R,S)-hydroxynonenal (Schaur 2003, Carini a kol. 2004, Schneider a kol. 2005).



Obr. 3 Mechanismus vzniku HNE z ω -6 PUFA (Carini a kol. 2004)

Mezi primární reaktanty, se kterými reaguje HNE, patří aminokyseliny cystein, histidin a lysin, které přímo podléhají Michaelově adici na dvojnou vazbu (Poli a kol. 2000).

Může docházet i k reakci aminoskupiny s karbonylem aldehydu za tvorby Schiffovy báze. Michaelova adice a tvorba Schiffovy báze jsou kompetitivní reakce, ale téměř většina modifikací proteinů probíhá právě Michaelovou adicí a Schiffovy báze se tvoří jen v nepatrném množství (Bruenner a kol. 1995).

2.3.3. Metabolismus HNE

Organismus je schopen metabolizovat HNE vysoce efektivně, a to dokonce i za podmínek oxidačního stresu. Rychlý metabolismus HNE je důležitým sekundárním antioxidačním ochranným systémem buněk.

Hlavními reakcemi jsou oxidace HNE na 4-hydroxy-2-nonenovou kyselinu (HNA) pomocí enzymu aldehyddehydrogenasy (EC 1.2.1.3), redukce HNE na 1,4-dihydroxynonenal za katalýzy alkoholdehydrogenasy (EC 1.1.1.1) a konjugace s glutathionem (GSH) (Dostálek 2007).

Konjugace s GSH může probíhat neenzymaticky nebo za katalýzy glutathion-S-transferasy (GST, EC 2.5.1.18), jež urychluje reakci asi 600x (Siems a Grune 2003). Detoxikace HNE konjugací s GSH za katalýzy enzymu GST je pravděpodobně nejrychlejší. Při poklesu zásob GSH dochází k indukci syntézy GSH-HNE konjugátu (glutathionyl-4-hydroxynonenal) (Siems a Grune 2003, Forman a kol. 2003).

2.4. Možnosti stanovení 4-hydroxy-*trans*-nonenalu

Pro stanovení HNE, ať už volného nebo jeho konjugátů s biomolekulami, bylo vyvinuto velké množství metod (Poli a Schaur 2000). Výběr metody závisí na účelu stanovení a dostupném vybavení.

HNE je velmi reaktivní a v biologických vzorcích může být přítomen ve velmi nízkých koncentracích, a to jak ve volné formě, vázaný, nebo jako metabolický produkt. Jeho lipofilní vlastnosti převažují nad hydrofilními, a proto se bude koncentrovat spíše v biomembránách. Biologické vzorky jsou velmi komplexní a mohou obsahovat interferující látky.

Při stanovení HNE by ke vzorku vždy měly být přidány antioxidanty, aby se předešlo dodatečné tvorbě HNE autooxidací PUFA před nebo během procesu derivatizace.

2.4.1. Metody stanovení HNE v seminální plazmě

2.4.1.1. Stanovení HNE s využitím hmotnostního spektrometru

Pro stanovení HNE byla vyvinuta metoda, která kombinuje plynovou chromatografii s hmotnostním spektrometrem (Štípek a kol. 2000, Poli a Schaur 2000).

HNE byl identifikován v lidském spermatu pomocí plynového chromatografu ve spojení s hmotnostním spektrometrem s chemickou ionizací v negativním módu (GC/NICIMS). HNE je derivatizován *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzyl)-hydroxylaminhydrochloridem (PFBHA.HCl), dochází ke vzniku HNE-*O*-pentafluorobenzylloximového derivátu. Následuje trimethylsilylace hydroxyskupiny na trimethylsilylether (TMS). Touto metodou lze stanovit celé spektrum dalších aldehydů (Selley a kol. 1991).

2.4.2. Metody stanovení HNE v biologických vzorcích

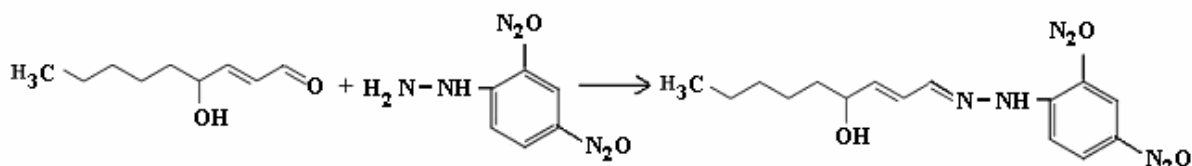
2.4.2.1. Stanovení volného HNE pomocí HPLC s UV detekcí

HNE může být přímo stanoven pomocí HPLC s UV detekcí při 223 nm, protože má vysoký molární absorpční koeficient ($\epsilon = 13750 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$). Jelikož biologické vzorky obsahují velké množství látek, zejména proteinů a peptidů, které taktéž absorbují kolem 220 nm, musíme vzorek před HPLC analýzou nejdříve přefiltrovat (Lang a kol. 1985, Štípek a kol. 2000, Poli a Schaur 2000).

2.4.2.2. Stanovení HNE po derivatizaci 2,4-DNPH metodou HPLC s UV detekcí

Nejčastěji bývá HNE, spolu s jinými aldehydy, stanovován metodou HPLC s UV detekcí po derivatizaci s 2,4-dinitrofenylhydrazinem (2,4-DNPH). Vznikají 2,4-dinitrofenylhydrazoney absorbující v oblasti s maximem 350-390 nm. Schéma reakce je znázorněno na obrázku 4. Jelikož kromě HNE reagují s 2,4-DNPH také další aldehydy, jako formaldehyd, aceton nebo acetaldehyd, je před vlastní HPLC analýzou nutná purifikace tenkovrstevnou chromatografií (TLC). Jedná se tak o časově náročnou metodu (Štípek a kol. 2000, Uchida 2003, Carini a kol. 2004).

Namísto TLC lze použít rychlejší extrakci tuhou fází (SPE – Solid Phase Extraction). A místo UV detekce lze použít více citlivější elektrochemickou detekci (Strohmaier a kol. 1995, Goldring a kol. 1993, Liu a kol. 1999).



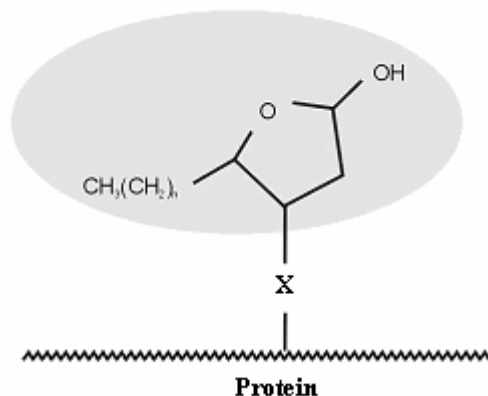
Obr. 4 Reakce HNE s 2,4-DNPH

2.4.2.3. Imunochemické stanovení

Pro detekci HNE-adtů lze využít imunochemické metody (Poli a kol. 2000, Uchida 2003). Specifické polyklonální protilátky se připravují imunizací zvířete a následným přečištěním afinitní chromatografií (Uchida 2003). Antigenní determinantou je v konjugátu HNE s proteinem právě HNE a nikoliv aminokyselina (histidin, lysin, cystein), a proto nedochází ke zkříženým reakcím s jinými aldehydy, jako jsou například malondialdehyd nebo formaldehyd (Carini a kol. 2004).

Dominantní epitop, který rozpoznávají polyklonální i monoklonální protilátky je CH₃-(CH₂)_n-5-hydroxytetrahydrofuran (n ≥ 3), který je zobrazen na obrázku 5. Zvýrazněná oválná část je nepostradatelná pro navázání protilátky, X symbolizuje imidazolovou skupinu histidinu, thiolu cysteinu nebo ε-aminoskupinu lysinu (Uchida 2003).

Bohužel, polyklonální ani monoklonální protilátky nejsou striktně specifické pro HNE modifikované proteiny. Mohou reagovat s analogy HNE, 4-hydroxyoktenalem a 4-hydroxydecenalem, i když těchto aldehydů vzniká mnohem méně než HNE (Uchida a kol. 1995).

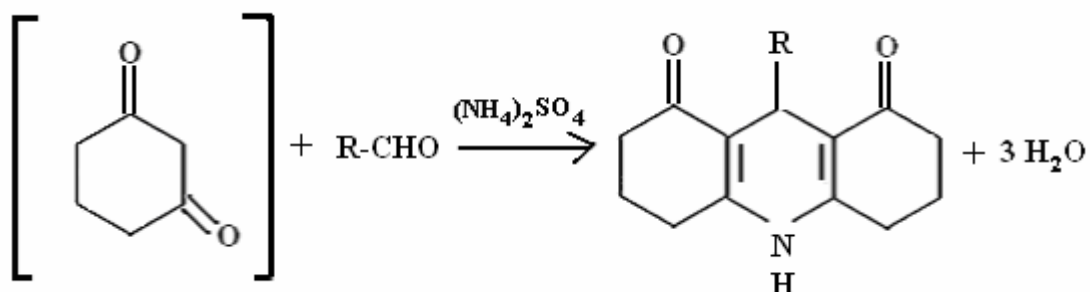


Obr. 5 Epitopy pro HNE

2.4.2.4. Stanovení HNE po derivatizaci s 1,3-cyklohexandionem metodou HPLC s fluorescenční detekcí

Tato metoda je jednodušší a citlivější oproti HPLC s UV detekcí. Vzorek je deproteinován a k supernatantu je přidán 1,3-cyklohexandion (CHD). Vzniká 9-alkylakridinový derivát. Schéma reakce je znázorněno na obrázku 6. Po derivatizaci se vzorky purifikují SPE. Deriváty se separují HPLC a detekují fluorescenčním detektorem (Uchida a kol. 2002, Lovell a Markesbery 2003, Bailey a kol. 1997, Holley a kol. 1993).

Tato metoda se citlivostí přibližuje metodě GC-MS. Bohužel dlouhý derivatizační postup (inkubace 1 hodinu při 60°C) brání v rozšíření aplikace pro klinické vzorky (Liu a kol. 1999).



Obr. 6 Reakce CHD s aldehydy

2.4.2.5. Stanovení HNE metodou GC nebo HPLC s využitím SPME

Bylo popsáno stanovení HNE za využití mikroextrakce na tuhé fázi (SPME). Velkou výhodou této metody je, že molekula HNE je přímo adsorbována a zakoncentrována ze vzorku na vlákno SPME. Vlákno je následně injektováno do kapalinového nebo plynového chromatografu. Velkou výhodou je absence organických rozpouštědel používaných u SPE a TLC (Uchida a kol. 2002). Běžně používaná organická rozpouštědla (methanol, acetonitril) totiž obsahují kontaminující aldehydy (Bailey a kol. 1997, Luo a kol. 1995). Metodu lze využít pro stanovení HNE v biologických vzorcích (Uchida a kol. 2002).

2.4.2.6. Stanovení HNE metodou HPLC s LIF

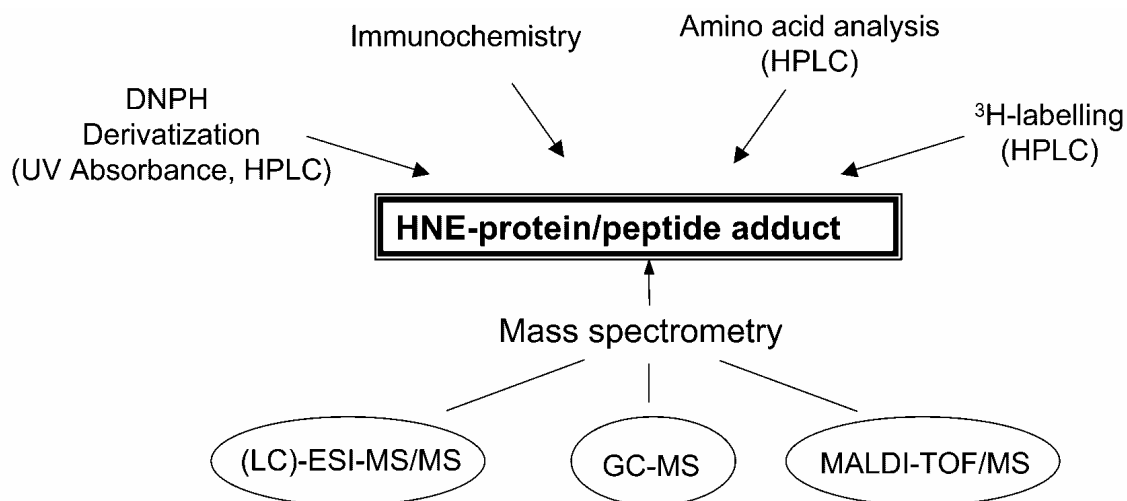
Pro stanovení HNE byla popsána metoda HPLC s laserem indukovanou fluorescencí (LIF). LIF je nejcitlivější detekční systém pro HPLC a kapilární elektroforézu. Ve srovnání s fluorescenční detekcí, může LIF detekce být až několiksetkrát citlivější. Tak vysoká citlivost umožňuje spolehlivou detekci HNE v biologických vzorcích.

HNE je derivatizován s 4-(2-karbazoylpyrrolidiny)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazolem (NBD-ProCZ) za vzniku hydrazonových sloučenin, které lze detekovat fluorescenčně (Liu a kol. 1999).

2.4.2.7. Ostatní metody

V posledním desetiletí se zvyšuje rozsah využití moderních nástrojů v analýze HNE-proteinových aduktů pomocí MS. Jde především o MALDI-TOF-MS (Matrix assisted laser desorption/ionization - time of flight mass spectrometry) a tandemovou hmotnostní spektrometrii (Carini a kol. 2004).

Přehled všech analytických metod k detekci HNE-proteinových/peptidových aduktů je znázorněn na obrázku 7.



Obr. 7 Přehled analytických metod k detekci HNE-proteinových/peptidových aduktů (Carini a kol. 2004)

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo ověřit a modifikovat experimentální metodu využívající derivatizaci s 1,3-cyklohexandionem pro stanovení 4-hydroxy-*trans*-nonenalů v seminální plazmě za použití HPLC s fluorescenční detekcí a určit, zda je tato metoda použitelná pro klinickou praxi.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

Vzorky seminální plazmy byly zpracovány v Centru asistované reprodukce Sanus v Pardubicích a v laboratořích Katedry biologických a biochemických věd Univerzity Pardubice.

Souhlas etické komise při Prvním privátním chirurgickém centru, s.r.o., Hradec Králové, je uveden v příloze.

4.1. Stanovení 4-hydroxy-*trans*-nonenalů v seminální plazmě

Pro stanovení volného HNE v seminální plazmě jsme použili metodu založenou na derivatizaci aldehydu s CHD za vzniku 9-alkylakridinového derivátu. Vzniklý derivát jsme analyzovaly metodou HPLC s fluorescenční detekcí.

4.1.1. Vzorky

Vzorky seminální plazmy pro určení analytických parametrů metody jsme získali od pacientů v Centru asistované reprodukce Sanus v Pardubicích. Vzorky seminální plazmy jsme odebírali do polypropylenových mikrozkušnic, do kterých jsme předtím přidali 100 μ l butylovaného hydroxytoluenu v ethanolu a rozpouštědlo odpařili pod jemným proudem dusíku (čistota 4,6; Linde Gas a.s., Praha, ČR). Vzorky jsme uchovávali do doby analýzy v hlubokomrazícím boxu při -80 °C.

4.1.2. Chemikálie

1,3-Cyklohexandion (CHD; $C_6H_8O_2$; Mr = 111,13; Fluka, Švýcarsko)

2,6-Di-*tert*-butyl-4-methylfenol (BHT; $C_{15}H_{24}O$; Mr = 220,4; Sigma-Aldrich Chemie GbmH, Steinheim, Německo)

4-Hydroxynonenal-dimethylacetal (HNE-DA; $C_{11}H_{22}O_3$; Mr = 202,3; Alexis Biochemicals, USA)

Deionizovaná voda (H_2O ; Mr = 18; G = 0,055 μ S)

Dusík (čistota 4,6; Linde Gas a.s., Praha, ČR)

Ethanol pro HPLC (CH_3CH_2OH ; Mr = 46,07; Merck KgaA, Darmstadt, Německo)

Kyselina chloristá ($HClO_4$; w = 70 %; Mr = 100,46; Sigma-Aldrich Chemie GbmH, Steinheim, Německo)

Kyselina chlorovodíková (HCl; w = 35 %; Mr = 36,46; Sigma-Aldrich Chemie GbmH, Steinheim, Německo)

n-Hexan pro HPLC (C₆H₁₄; Mr = 86,16; Merck, KgaA, Darmstadt, Německo)

Octan amonný (NH₄Ac; C₂H₇NO₂; Mr = 77,08; Fluka, Švýcarsko)

4.1.3. Pomůcky a přístroje

Analytické váhy LB 1050/2 (Laberte, Budapešť, Maďarsko)

Automaticke mikropipety Biohit (Biohit PLC, Helsinky, Finsko)

Autosampler SIL-20AC_{HT} pro HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

Čerpadla LC-20AD pro HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

Filtrační aparatura Supelco (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Fluorescenční detektor RF-20A_{XS} pro HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

Hlubokomrazicí box MDF-U 3086S (Sanyo Electric, Osaka, Japonsko)

HPLC kolona Discovery[®] C18, 15 cm x 2,1 mm, 5 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA),

opatřená předkolonovým PEEK filtrem o porozitě 2 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Kombinovaná chladnička s mrazničkou (AEG, EU)

Magnetické míchadlo Heidolph MR 3001K (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Německo)

Nylonové filtry pro filtrování mobilní fáze pro HPLC; 0,2 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Nylonové filtry pro filtrování vzorků před HPLC analýzou ISO-Disc[™]; 0,2 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Odstředivka Jouan MR 23i (Jouan SA, St. Herblain, Francie)

Odplyňovač mobilní fáze pro HPLC Degasser DGU-20A₅ (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

Polypropylenové mikrozkrumavky; 1,5 ml (Fisher Scientific, spol. s. r.o., Pardubice, ČR)

Předvážky Sartorius L2200P (Sartorius Laboratories, Goettingen, Německo)

Řídící jednotka a software LCsolution, verze 1.25 (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

Skleněné vialky se šroubovacím víčkem (Fisher Scientific, spol. s. r.o., Pardubice, ČR)

SPE kolonky s vázanou reverzní fází, Discovery[®] DSC C-18 (Supelco, Bellefonte, PA, USA)

Spektrofotometr Agilent 8453 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Termostat kolon CTO-20AC pro HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japonsko)

Ultrazvuková lázeň K12 (Kraintek s.r.o., Podhájská, Slovensko)

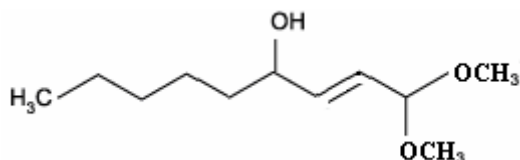
Zařízení pro výrobu ultračisté vody (třída I) TKA Smart 2 Pure (Niedelerbert, Německo)

Vakuový manifold, Visiprep SPE (Supelco, Bellefonte, PA, USA)
kádinky, odměrné válce, odměrné baňky

4.1.4. Pracovní roztoky

Zásobní roztok HNE-DA

V laboratoři jsme HNE připravovali z komerčně dodávaného standardu 4-hydroxynonenal-dimethylacetal (HNE-DA). Struktura HNE-DA je znázorněna na obrázku 8. Roztok jsme připravili naředěním 500 μl standardního roztoku HNE-DA s 9,5 ml n-hexanu. Roztok jsme rozdělili po 200- μl porcích do skleněných vialek a uskladnili v hlubokomrazícím boxu při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obr. 8 Struktura HNE-DA

Zásobní roztok HNE

Rozpouštědlo ze zásobního roztoku jsme odpařili pod jemným proudem dusíku. K odparku jsme přidali 1 ml HCl (1 mmol/l) a nechali jsme po dobu 60 min ve tmě, při laboratorní teplotě, proběhnout hydrolyzu na HNE.

Po proběhnutí hydrolyzy jsme k roztoku přidali 4 ml HCl (1 mmol/l). Na spektrofotometru jsme změřili absorbanci A při vlnové délce 223 nm a vypočítali koncentraci c zásobního roztoku HNE pomocí vztahu:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l$$

kde ε je molární absorpční koeficient HNE ($\varepsilon = 13750\text{ mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$) a l je délka kyvety ($l = 1\text{ cm}$). Zásobní roztok HNE jsme připravovali denně čerstvý.

Derivatizační činidlo (asi 1 % CHD v asi 40 % octanu amonném)

Navážku 0,1 g CHD a 4,0 g octanu amonného jsme rozpustili v 6 ml deionizované vody. Derivatizační činidlo jsme přefiltrovali. Roztok jsme připravovali denně čerstvý.

Zásobní roztok kyseliny chlorovodíkové (asi 1 mmol/l)

Roztok 1 mmol/l HCl jsme připravili naředěním 42 μ l koncentrované HCl (11,91 mol/l) na objem 500 ml deionizovanou vodou.

Zásobní roztok kyseliny chloristé (asi 1 mol/l)

Roztok 1 mol/l kyseliny chloristé jsme připravili naředěním 4,3 ml koncentrované HClO₄ (11,59 mol/l) na objem 50 ml deionizovanou vodou.

Deionizovaná voda

Deionizovanou vodu, určenou pro proplach HPLC systému, jsme přefiltrovali přes nylonový filtr o porozitě 0,2 μ m a odvzdušnili na ultrazvukové lázni.

Mobilní fáze A

Mobilní fázi A (10% ethanol) jsme připravili smícháním 900 ml vody se 100 ml ethanolu. Po dokonalém promíchání jsme mobilní fázi přefiltrovali skrz nylonový filtr o porozitě 0,2 μ m a odvzdušnili na ultrazvukové lázni.

Mobilní fáze B

Mobilní fáze B byl 100% ethanol. Jeden litr ethanolu jsme přefiltrovali skrz nylonový filtr o porozitě 0,2 μ m a odvzdušnili na ultrazvukové lázni.

4.1.5. Postup stanovení 4-hydroxy-*trans*-nonenalů v seminální plazmě

4.1.5.1. Příprava vzorků

Testovali jsme několik postupů přípravy vzorku.

Vzorky seminální plazmy jsme nechali pozvolně rozmrazit při laboratorní teplotě. Následně jsme vzorky odstředili (28 000 r.p.m., 4 °C, 10 min). Do skleněných vialek jsme opatrně převedli 200 µl supernatantu, popř. roztoku standardu. Poté jsme přidali 200 µl derivatizačního činidla (0,1 g 1,3-cyklohexandionu a 4,0 g octanu amonném v 6-ti ml deionizované vody). Vialky jsme uzavřeli a obsah inkubovali při 60 °C po dobu jedné hodiny. Po skončené inkubaci jsme nechali směs vytemperovat přibližně na laboratorní teplotu. Do polypropylenové mikrozkušavky jsme převedli 100 µl směsi a opatrně přidali 900 µl vychlazeného precipitačního činidla (ethanol nebo 1,0 mol/l kyselina chloristá). Směs jsme důkladně promíchali a nechali stát asi 10 minut v chladničce (4 °C). Vzniklou sraženinu jsme oddělili odstředěním (28 000 r.p.m., 4 °C, 10 min). Pro analýzu jsme použili čirý supernatant, který jsme před HPLC analýzou přefiltrovali přes nylonový filtr (velikost pórů: 0,2 µm; Supelco, Bellefonte, PA, USA) do tmavých vialek pro autosampler. Před nástřikem byly vzorky uchovávány při 4 °C (chlazený autosampler).

4.1.5.2. Příprava standardů

Kalibrační řadu standardů HNE jsme připravili naředěním zásobního roztoku HNE kyselinou chlorovodíkovou (1 mmol/l) na příslušné koncentrace.

Standardy HNE jsme připravovali stejným způsobem jako vzorky.

4.1.5.3. HPLC analýza

9-Alkylakridinový derivát jsme stanovovali metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Zařízení pro HPLC se skládalo z odplyňovače mobilní fáze Degasser DGU-20A₅, dvou čerpadel LC-20AD, autosampleru SIL-20AC_{HT}, termostatu kolon CTO-20AC a fluorescenčního detektoru RF-20A_{XS}, HPLC sestava byla řízena jednotkou LCsolution, verze 1.25 (vše Shimadzu, Kyoto, Japonsko).

9-Alkylakridinový derivát byl separován na koloně Discovery[®] C18, 15 cm x 2,1 mm, 5 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA), opatřené předkolonovým PEEK filtrem o porozitě 2 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Mobilní fáze byla směs ethanolu a deionizované vody, eluce byla gradientová (Obrázek 13). Průtok mobilní fáze byl udržován na hodnotě 0,160 ml/min.

Nejvyšší citlivosti při detekci fluoreskujícího derivátu jsme dosáhli při nastavení těchto vlnových délek: $\lambda_{EX} = 385$ nm a $\lambda_{EM} = 445$ nm. Fluorescenční detektor jsme nastavili takto: citlivost = 1, zesílení = 1. [Citlivost 1 je nejvyšší a citlivost 3 je nejnižší. Zesílení 1 je nejnižší a zesílení 3 je nejvyšší. Takže kombinace citlivosti 3 a zesílení 1 značí nejnižší citlivost detektoru (cca x 1); kombinace citlivosti 1 a zesílení 3 naopak značí nejvyšší možnou citlivost detektoru (cca x 16384). Námi nastavená citlivost pak činí cca x 1024]

Množství HNE bylo určeno z odpovídající plochy píku za použití softwaru LCsolution. Koncentrace HNE ve vzorcích seminální plazmy byly odečteny z kalibrační křivky.

4.1.5.4. Kalibrace

Pro kvantifikaci 4-hydroxy-*trans*-nonenalu v seminální plazmě jsme použili metodu kalibrační křivky. Rovnici kalibrační křivky jsme získali proložením závislosti ploch píků na koncentraci standardů metodou nejmenších čtverců.

4.1.5.5. Analytické parametry

Linearita

Linearita kalibračního vztahu je schopnost metody dávat výsledky přímo úměrné koncentraci analytu v daném rozmezí. Lineární rozsah odezvy je interval mezi nejnižší a nejvyšší hladinou stanovované látky, v němž je látka stanovována s určitou přesností, správností a linearitou. Testuje se minimálně pět různých koncentrací standardní látky. Pro uspokojivou jednotnost testování je minimální rozmezí 70 – 130 % cílové koncentrace.

Přesnost

Přesnost analytické metody je mírou shody mezi jednotlivými hodnotami, které jsou měřeny při stejných analytických podmínkách opakovaně s homogenním vzorkem. Je obvykle uváděna jako odhad směrodatné odchylky nebo relativní směrodatné odchylky. Opakovatelnost je typ přesnosti vztahující se k měřením provedeným za podmínek opakovatelnosti, tj. stejná metoda, stejný materiál, stejný pracovník, stejná laboratoř, krátký časový úsek. Reprodukovatelnost je typ přesnosti vztahující se k měřením provedených za podmínek reprodukovatelnosti, tj. stejná metoda, jiný pracovník, jiná laboratoř, jiné zařízení, dlouhý časový interval. My jsme se z pochopitelných důvodů zabývali pouze opakovatelností.

Přesnost stanovení daného analytu v sérii jsme určili analýzou deseti nezávisle připravených vzorků stejné seminální plazmy získané smícháním několika vzorků dobrovolných dárců. Vzorky společně se standardy pro konstrukci kalibrační křivky jsme analyzovali během jednoho dne.

Jako míru přesnosti jsme použili variační koeficient (CV):

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X_i - AVG)^2}{N - 1}}$$

$$CV(\%) = \frac{SD}{AVG} \cdot 100$$

kde SD je standardní odchylka měření, X_i je koncentrace vždy jednoho ze vzorků v sérii, AVG je aritmetický průměr, N je počet vzorků.

Mez detekce

Mez detekce je obecně nejnížší množství analytu ve vzorku, které jsme schopni detekovat, ale které není nutně kvantifikovatelné jako exaktní hodnota. Je obvykle stanovována ze směrodatné odchylky výsledků měření slepých pokusů.

Mez detekce jsme určili opakovanou analýzou standardu o nízké koncentraci analytu, který jsme připravili navážením co nejnížšího množství standardní látky. Standard o nízké koncentraci analytu jsme analyzovali pětkrát. Mez detekce x_{MD} jsme vypočetli podle vztahu:

$$x_{MD} = 3 \cdot s$$

kde s je směrodatná odchylka.

Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti je nejnížší koncentrace analytu, jež může být stanovena s přijatelnou mírou správnosti a přesnosti. Měla by být zjištěna s použitím vhodného etalonu či vzorku. Může to být nejnížší bod kalibrační křivky (vždy nenulový), avšak měření v nejnížší oblasti pak bývá zatíženo velkou relativní chybou. Nesmí být stanovována extrapolací.

Mez stanovitelnosti x_{MS} jsme určili jako desetinásobek směrodatné odchylky s .

Správnost

Správnost metody je mírou těsnosti získané hodnoty a skutečné hodnoty obsahu analytu. Lze ji získat analyzováním vhodného referenčního materiálu. Tam, kde není dostupný vhodný referenční materiál, může být odhad správnosti získán metodou standardních přídavek chemických etalonů. Správnost může být také určena porovnáním s výsledky získanými konečnou (definitivní) metodou, dalšími alternativními postupy nebo cestou srovnávacích studií.

Výtěžnost

Výtěžnost vyjadřuje schopnost metody postihnout měřeným signálem veškerý analyt přítomný ve vzorku. Je mírou účinnosti dané metody.

Výtěžnost (recovery) jsme zjišťovali metodou přidavků známého množství analytu k vybraným vzorkům seminální plazmy s různou endogenní koncentrací. Hodnoty recovery jsme vypočetli jako stonásobek poměru mezi nalezeným a přidaným množstvím analytu:

$$\text{Recovery}(\%) = \frac{X_1 - X_0}{A} \cdot 100$$

kde X_1 je koncentrace analytu ve vzorku s přidavkem, X_0 je endogenní koncentrace analytu a A je koncentrace přidaného analytu.

Robustnost

Robustnost je míra schopnosti metody být minimálně ovlivněna změnami v parametrech metody. Robustnost metody se experimentálně stanovuje záměrným vnášením malých změn do metody a zkoumáním jejich důsledků. Obecně je třeba brát v úvahu velké množství faktorů, ale protože většina z nich má zanedbatelný vliv, měníme obvykle několik faktorů zároveň. Běžně se testují změny podmínek jako stáří kolony, typ kolony, teplota kolony, složení a pH mobilní fáze. Robustnost má být testována laboratoří, která metodu zavádí, dříve než budou metodu používat ostatní laboratoře.

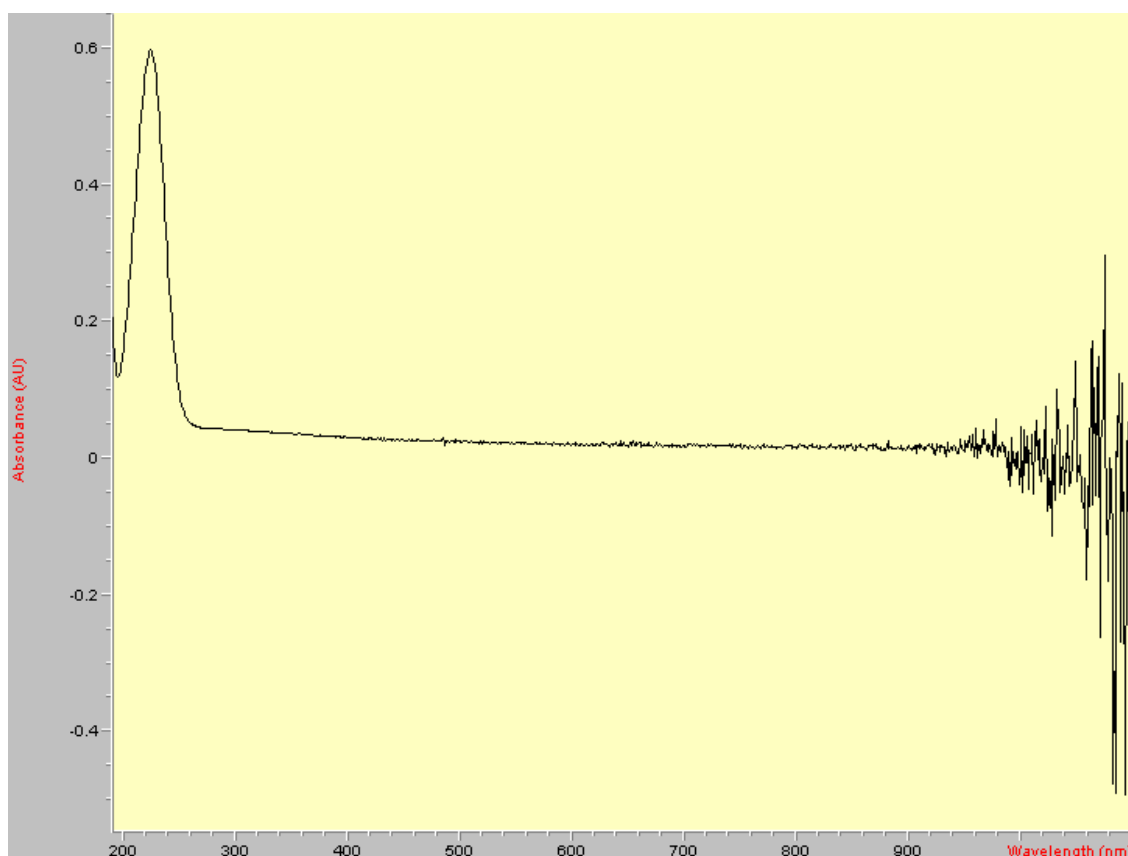
4.1.5.6. Zpracování výsledků

Pro zpracování výsledků (kalibrace, analytické parametry metody) jsme použili program MS Excel a QCExpert (Trilobyte, Pardubice, ČR).

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Mnoho prací poukazuje na to, že 4-hydroxy-*trans*-nonenal, produkt neenzymatické lipoperoxidace, je významným ukazatelem oxidačního stresu. Chceme-li ovšem HNE použít ke kvantifikaci oxidačního stresu, pak musíme mít k dispozici spolehlivou metodu, která s jistou přesností a správností dokáže tento velmi reaktivní metabolit detekovat ve vysoce komplexních biologických vzorcích. Cílem této práce bylo ověřit, zda metoda využívající derivatizaci s 1,3-cyklohexandionem, je vhodná pro stanovení HNE ve vzorcích seminální plazmy (Uchida a kol. 2002, Lovell a kol. 2003, Bailey a kol. 1997).

V laboratoři jsme HNE připravovali z komerčně dodávaného HNE-DA v hexanu. Koncentraci standardního roztoku HNE jsme ověřovali spektrofotometricky při 223 nm. Záznam ze spektrofotometru je znázorněn na obrázku 9.



Obr. 9 Spektrum HNE s absorpčním maximem při 223 nm (spektrofotometr Agilent 8453; Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)

Existuje mnoho metod stanovení HNE v biologických vzorcích. První zmínka o stanovení HNE v biologickém materiálu je datována do roku 1985. Lang a kol. (1985) stanovovali HNE v krevní plazmě (séru) metodou HPLC s UV detekcí. Využili faktu, že HNE vykazuje absorpční maximum při 223 nm. Později byla Esterbauerem a Cheesemanem zavedena metoda využívající derivatizace HNE s 2,4-dinitrofenylhydrazinem. Tato metoda je navržena pro simultánní stanovení vybraných karbonylových sloučenin v biologických vzorcích. Před vlastní HPLC analýzou je nutná předseparace vzniklých 2,4-dinitrofenylhydrazonů, používá se tenkovrstevná chromatografie nebo extrakce tuhou fází. Metoda je časově náročná, kromě toho jsou hladiny HNE, v porovnání s jinými karbonylovými sloučeninami (formaldehyd, acetaldehyd, aceton), nízké, navíc chromatografické záznamy bývají nepřehledné. Z těchto důvodů není tato metoda vhodná pro stanovení HNE v biologických vzorcích.

Alternativní metodou by mohla být HPLC s fluorescenční detekcí, využívající derivatizaci s 1,3-cyklohexandionem (Holley a kol. 1993, Bailey a kol. 1997, Lovell a kol. 2003). Vznikají fluoreskující akridinové deriváty. Tato metoda je, v porovnání s tou, která využívá derivatizaci s 2,4-dinitrofenylhydrazinem, relativně rychlejší a více citlivější. I zde však jsou chromatografické záznamy nepřehledné a je nutná předseparace nebo gradientová eluce k oddělení jednotlivých akridinových derivátů.

Velmi nadějnými metodami pro stanovení HNE v biologických vzorcích se jeví plynová chromatografie s hmotnostní detekcí a HPLC s hmotnostní detekcí (Selley a kol. 1991, Poli a Schaur 2000, Uchida a kol. 2002). Za povšimnutí stojí také metoda HPLC, kde se využívá laserem indukovaná fluorescence (Liu a kol. 1999).

I když existuje několik metod pro stanovení HNE v biologických vzorcích, v současné době nejsou prakticky k dispozici žádné vhodné metody pro stanovení HNE v seminální plazmě (Selley a kol. 1991). Problémem seminální plazmy je, v porovnání s krevní plazmou, menší dostupnost a obtížné zpracování. Ejakulát musí být po odběru zkapalněn při laboratorní teplotě, minimálně půl hodiny. Poté následuje separace spermií od seminální plazmy. Často bývají vzorky seminální plazmy obtížně zpracovatelné, poněvadž jsou velmi viskózní a rosolovité povahy.

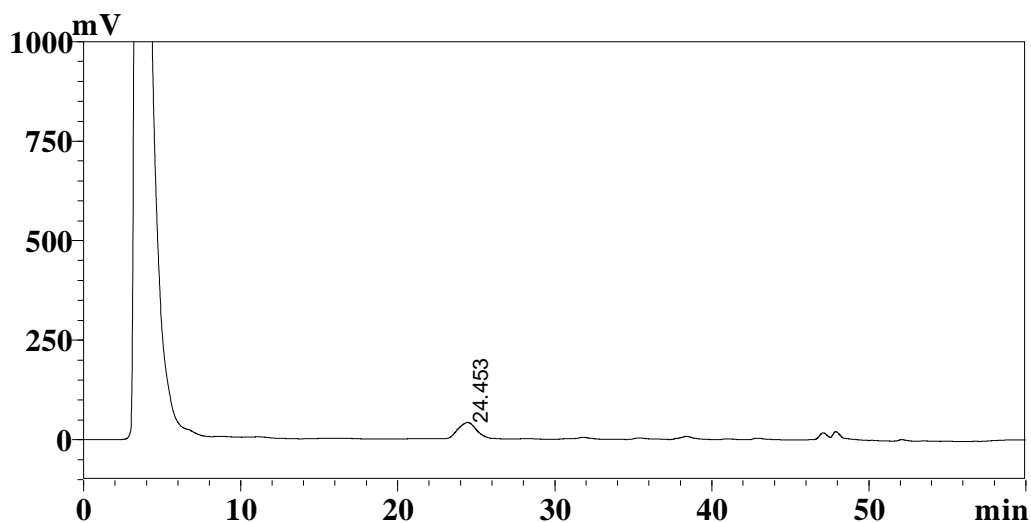
Abychom zabránili lipoperoxidaci *in vitro*, uchovávali jsme seminální plazmu v polypropylenových zkumavkách obsahujících butylovaný hydroxytoluen (Holley a kol. 1993, Strohmaier a kol. 1995). Do polypropylenových zkumavek jsme přidali 200 μ l 0,1 % butylovaného hydroxytoluenu v ethanolu. Rozpouštědlo jsme odpařili pod jemným proudem dusíku (čistota 4,6; Linde Gas a.s., Praha, ČR). Do takto připravených zkumavek bylo v Centru asistované reprodukce Sanus odebráno 200 μ l seminální plazmy.

Chromatografický záznam standardního roztoku HNE (HNE-akridinový derivát) a lidské seminální plazmy metodou HPLC s fluorescenční detekcí je znázorněn na obrázku 10 a 11. Analytické parametry pro stanovení HNE jsou shrnuty v tabulce 3. Přesnost v sérii je do 10 %, což je pro HPLC metodu dostačující. Na druhou stranu se výtěžnost metody pohybuje v rozmezí (62,0 – 81,0) %. Bailey a kol. (1997) uvádějí výtěžnost HNE v krevní plazmě v průměru 116 %, zatímco Holley a kol. (1993) uvádějí výtěžnost pro všechny alkany a hydroxyalkany v krevní plazmě v průměru 95 - 98 %. Analytické parametry pro stanovení HNE v seminální plazmě nejsou v odborné literatuře dostupné.

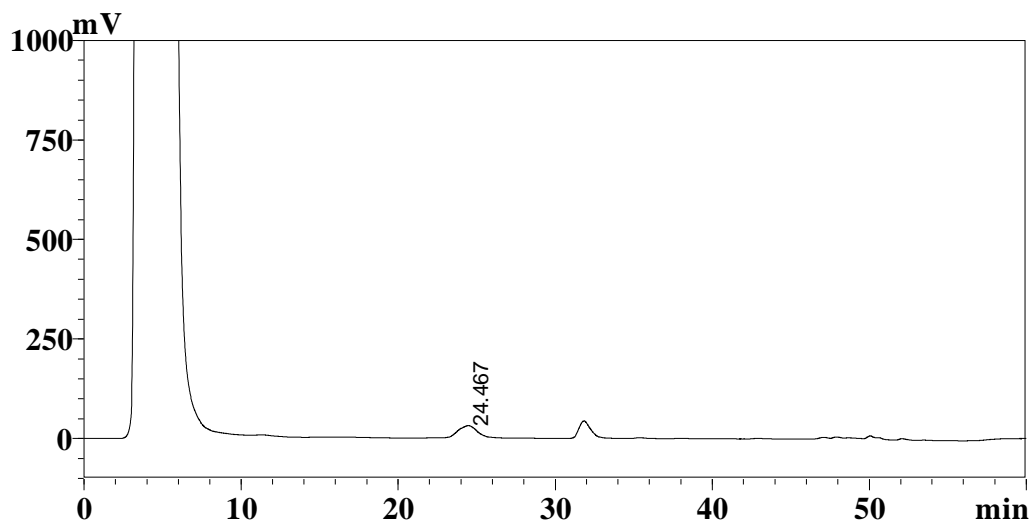
Linearita byla zjišťována jako součást kalibrace metody, a to analýzou standardů s koncentracemi rovnoměrně pokrývajících deklarovaný rozsah metody. Linearita byla testována analýzou třinácti standardů o různých koncentracích HNE. S použitím statistického softwaru (QCExpert) byla sestrojena kalibrační křivka a provedeno vyhodnocení kalibračního vztahu. Kalibrační křivka byla lineární v celém rozsahu testovaných koncentrací (0,1 - 20,2) μ mol/l. Rovnice regresní přímky je $y = 172587x + 9569$. Typická kalibrační křivka, používaná pro běžné analýzy a konstruována ze sedmi bodů, je znázorněna na obrázku 12. Nejnižší koncentrace HNE, která může být kvantifikována s přijatelnou správností a přesností je 50,0 fmol/nástřík. Detekční limit, zjištěný ze vztahu $x_{MD} = 3 x s$, jak je uvedeno v kapitole 4.1.5.5., byl 15,0 fmol/nástřík) [nástřík: 10 μ l; citlivost detektoru: $\times 1024$].

HNE-akridinový derivát byl separován na koloně s vázanou reverzní fází (C_{18}). Eluce byla gradientová, mobilní fází byla směs ethanolu a deionizované vody. Relativně nejlepší separace HNE-akridinového derivátu od interferujících látek v relativně krátkém čase jsme dosáhli s gradientovou elucí znázorněnou na obrázku 13. Testovali jsme různé gradientové eluce, ovšem v žádném případě se nám nepodařilo odseparovat interferující látku, která byla identifikována v nulovém standardu.

Nakonec nejlepším východiskem byl odečet plochy interferující látky v nulovém standardu od plochy píku odpovídající HNE-akridinovému derivátu.



Obr. 10 Chromatografický záznam standardního roztoku HNE (2,1 µmol/l). HPLC podmínky: gradientová eluce (mobilní fáze A: 10% ethanol ve vodě; mobilní fáze B: 100% ethanol; obrázek 13). Stacionární fází byla analytická kolona Discovery® C18, 15 cm x 2,1 mm, 5 µm, opatřená předkolonovým PEEK filtrem o porozitě 2 µm. Průtok mobilní fáze byl 0,160 ml/min, separace probíhala při 30 °C, a detekce byla fluorescenční ($\lambda_{EX} = 385$ nm; $\lambda_{EM} = 445$ nm). Dávkovaný objem vzorku byl 10 µl.

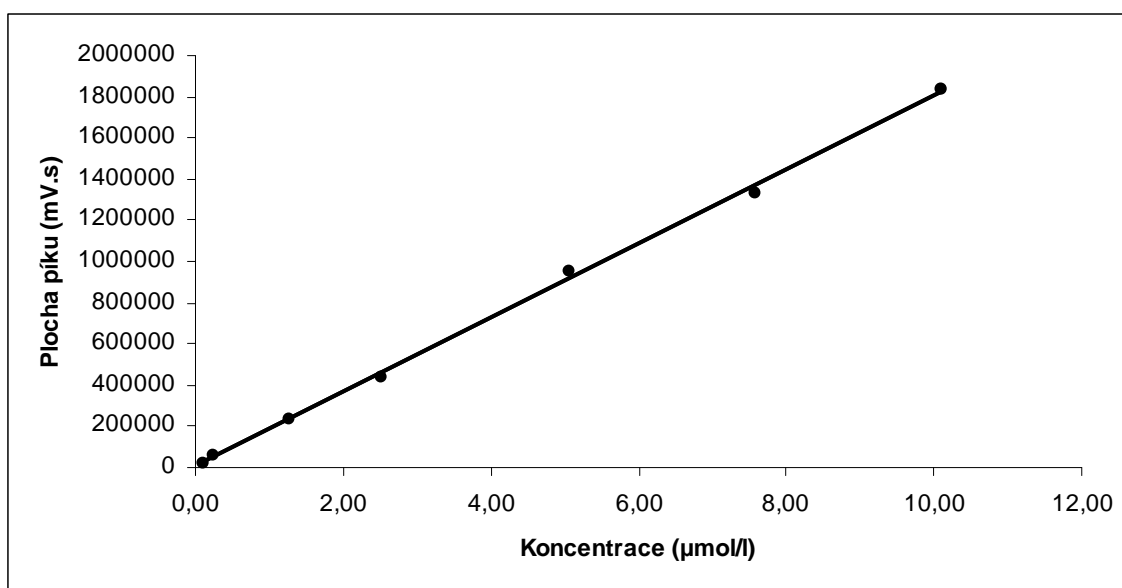


Obr. 11 Chromatografický záznam HNE v seminální plazmě (1,45 µmol/l). Chromatografické podmínky jsou uvedeny v popisu obrázku 10.

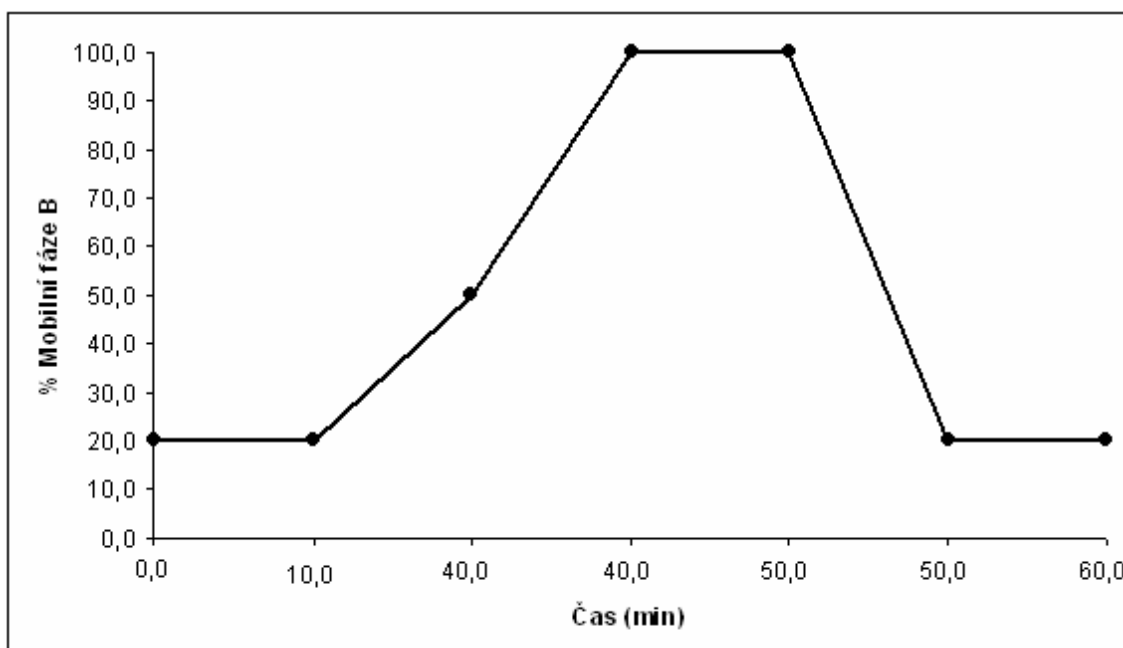
Přesnost v sérii		
N	Průměr ± SD (μmol/l)	CV (%)
10	1,17 ± 0,10	8,5

Výtěžnost metody		
Přídavek (μmol/l)	Nalezený přídavek (μmol/l)	Výtěžnost (%)
0,50	0,31	62,0
1,10	0,74	67,3
2,50	1,80	72,0
5,00	4,05	81,0

Tab. 3 Přesnost a výtěžnost pro stanovení HNE v seminální plazmě metodou HPLC s fluorescenční detekcí



Obr. 12 Typická kalibrační křivka pro stanovení HNE metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Rovnice přímky: $y = 179755x + 6392,3$; $R = 0,9993$.



Obr. 13 Gradient mobilní fáze: procento mobilní fáze vs. čas (offset 2,0 min odpovídá vzdálenosti od směšovače mobilní fáze k analytické koloně). Mobilní fáze A je 10% ethanol ve vodě, mobilní fází B je 100% ethanol)

Při testování robustnosti metody jsme měnili tyto podmínky: teplotu kolony a složení mobilní fáze. Z dosažených výsledků vyplynulo, že metoda není dostatečně robustní.

Samotné derivatizační činidlo obsahuje celou řadu interferujících látek, které stěžují analýzu karbonylových sloučenin. Někteří autoři doporučují buď přečištění derivatizačního činidla nebo purifikaci derivátů extrakcí na tuhé fázi. Zaměřili jsme se tedy na purifikaci derivátů metodou extrakce na tuhé fázi. Používali jsme SPE kolonky s vázanou reverzní fází (C₁₈), Discovery[®] DSC C-18 (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Kolonky jsme prvně ekvilibrovali ethanolem (2 ml) a poté promyli ve dvou krocích deionizovanou vodou (2 x 2 ml) při průtoku asi 1 ml/min. Na takto připravenou kolonku jsme aplikovali vzorek. Celý postup je uveden v tabulce 4. Purifikací jsme dosáhli zlepšení chromatografických záznamů, ovšem výsledky byly nereprodukovatelné a stejně jsme nedokázali odstranit interferující látku elující v nulovém standardu. Proto jsme od purifikace extrakcí na tuhé fázi upustili, neboť se jedná o další časově náročný krok, navíc s nereprodukovatelnými výsledky.

Kolonka byla ekvilibrována ethanolem (2 ml)	-
Kolonka byla promyta deionizovanou vodou (2 x 2 ml)	-
Na kolonku byl aplikován přefiltrovaný supernatant	Efluent vyhozen
Kolonka byla promyta deionizovanou vodou (2 x 2 ml)	Efluent vyhozen
Kolonka byla promyta 30% ethanolem v deionizované vodě (2 x 2 ml)	Efluent vyhozen
HNE-akridinový derivát byl eluován 100% ethanolem (2 x 0,5 ml)	-

Tab. 4 SPE procedura

Zkoušeli jsme několik postupů přípravy vzorku před HPLC analýzou. Při přípravě vzorků je zapotřebí použít vhodné precipitační činidlo pro precipitaci proteinů. K tomuto účelu se nejčastěji používají roztoky kyselin nebo organická rozpouštědla (Bailey a kol. 1997, Linden a kol. 2008). Zaměřili jsme se na testování kyseliny chloristé (1 mol/l) a ethanolu. Otázkou je, zda deproteinovat vzorky před derivatizační procedurou, či až po ní. Někteří autoři doporučují precipitaci proteinů organickými rozpouštědly (methanol, acetonitril, ethanol) (Bailey a kol. 1997, Linden a kol. 2008, Luo a kol. 1995). Komerčně používaná organická rozpouštědla obsahují kontaminující karbonylové sloučeniny (Bailey a kol. 1997, Luo a kol. 1995), proto je nutné precipitovat proteiny až po derivatizaci s 1,3-cyklohexandionem. U vzorků seminální plazmy je precipitace proteinů obtížná a k dostatečné precipitaci je zapotřebí velkých objemů precipitačních činidel. Zatímco pro precipitaci proteinů u vzorků krevní plazmy často postačuje dvojnásobný objem precipitačního činidla, u vzorků seminální plazmy alespoň desetinásobný. Pokud jsme používali k precipitaci proteinů kyselinu chloristou (1 mol/l), pak nastal problém s aplikací silně kyselého supernatantu na SPE kolonku. Z toho důvodu jsme supernatant museli neutralizovat. Při použití ethanolu jako precipitačního činidla, byl supernatant prakticky 90 % ethanol, tudíž extrakce tuhou fází byla nepoužitelná, jelikož první frakce obsahovala jak HNE-akridinový derivát, tak také veškeré kontaminující látky. Pokud tedy chceme u vzorků seminální plazmy použít purifikaci vzniklých derivátů extrakcí na tuhé fázi, je nutné precipitovat proteiny ještě před derivatizací. V tomto případě ale nemůžeme používat organická rozpouštědla, která obsahují kontaminující karbonylové sloučeniny (Bailey a kol. 1997, Luo a kol. 1995), nýbrž roztoky kyselin. Pro naše účely jsme zvolili kyselinu chloristou (1 mol/l).

Nejlepších výsledků jsme dosáhli při přípravě vzorků uvedené v kapitole 4.1.5.1. Namísto nereprodukovatelné extrakce tuhými fázemi jsme použili gradientovou eluci, která sice také nedokázala odseparovat kontaminující látku eluující v nulovém standardu, ale získali jsme reprodukovatelné výsledky.

Již v dřívější práci zabývající se stanovením 4-hydroxy-*trans*-nonenalů v krevní plazmě (Martínková a kol. 2007), byly problémy s čistotou derivatizačního činidla. Bylo ověřeno, že s nižší koncentrací derivatizačního činidla klesá výtěžnost metody a naopak s vyšší koncentrací derivatizačního činidla přibývá kontaminujících látek. Tyto problémy se nám taktéž nepodařilo odstranit, protože stanovení 4-hydroxy-*trans*-nonenalů v seminální plazmě je mnohem obtížnější než v krevní plazmě. Z tohoto důvodu nemělo význam měřit nasbírané vzorky seminální plazmy.

Pro ověření metody by bylo vhodné mít k dispozici referenční materiál, který ale není v současné době běžně dostupný. Z důvodu výše zmíněných problémů, je prezentovaná metoda pro stanovení 4-hydroxy-*trans*-nonenalů v seminální plazmě nepoužitelná pro klinickou praxi. Jako vhodnější metody pro stanovení HNE v seminální plazmě se jeví GC/MS nebo HPLC/MS. Jelikož naše pracoviště nemá v současné době k dispozici takové přístrojové vybavení, pak možná alternativa je použití jiného derivatizačního činidla. Jako příklad lze uvést práci používající jako derivatizační činidlo 4-(2-karbazoylpyrrolidinyl)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (Liu a kol. 1999).

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo ověřit a modifikovat metodu Martínkové a kol. (2007) pro stanovení 4-hydroxy-*trans*-nonenalů v seminální plazmě. Tato metoda využívá reakci 4-hydroxy-*trans*-nonenalů a jiných karbonylových sloučenin s 1,3-cyklohexandionem za vzniku fluoreskujících akridinových derivátů, které se následně separují na koloně a detekují fluorescenčním detektorem. Analytické parametry prezentované metody jsou uspokojivé, ovšem výtěžnost standardních přídatků je nízká. Z důvodu nízké reprodukovatelnosti, zaviněné nedostupností derivatizačního činidla v dostatečné čistotě a obtížemi s kontaminujícími karbonylovými sloučeninami, není tato metoda vhodná pro klinické studie.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1) ABDUL-RASHEED O. F.: Association between seminal plasma copper and magnesium levels with oxidative stress in iraqi infertile men. *Oman Medical Journal* 2010, **25**, 168-172.
- 2) ALARY J., GUERAUD F., CRAVEDI J. P.: Fate of 4-hydroxynonenal in vivo: disposition and metabolic pathways. *Molecular Aspects of Medicine* 2003, **24**, 177-187.
- 3) BACKOS D. S., FRITZ K. S., ROEDE J. R., PETERSEN D. R. a kol.: Posttranslational modification and regulation of glutamate-cysteine ligase by the α,β -unsaturated aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011, **50**, 14-26.
- 4) BAILEY A. L., WORTLEY G., SOUTHON S.: Measurement of aldehydes in low density lipoprotein by high performance liquid chromatography. *Free Radical Biology and Medicine* 1997, **23**, 1078–1085.
- 5) BRUENNER B. A., JONES A. D., GERMAN J. B.: Direct characterization of protein adducts of the lipid peroxidation product 4-hydroxy-2-nonenal using electrospray mass spectrometry. *Chemical Research in Toxicology* 1995, **8**, 552-559.
- 6) BUONOCORE G., PERRONE S., TATARANNO M. L.: Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Seminars in Fetal and Neonatal Medicine* 2010, **15**, 186-190.
- 7) CARINI M., ALDINI G., FACINO R. M.: Mass spectrometry for detection of 4-hydroxy-trans-2-nonenal (HNE) adducts with peptides and proteins. *Mass Spectrometry Reviews* 2004, **23**, 281-305.
- 8) CATALA A.: Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxyl-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chemistry and Physics of Lipids* 2009, **157**, 1-11.
- 9) COCUZZA M., SIKKA S. C., ATHAYDE K. S., AGARWAL A.: Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: An evidence based analysis. *International Brazillian Journal of Urology* 2007, **33**, 603-621.

- 10) DIANZANI M. V.: 4-hydroxynonenal from pathology to physiology. *Molecular Aspects of Medicine* 2003, **24**, 263-272.
- 11) DOSTÁLEK M.: Oxidativní stres, biomarkery oxidativního stresu. *Postgraduální medicína* 2007, **4**, 385-390.
- 12) ESTERBAUER H., CHEESEMAN K. H.: Determination of aldehydic lipid peroxidation product: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology* 1990, **186**, 407-421.
- 13) FORMAN H. J., DICKINSON D. A., ILES K. E.: HNE signalling pathways leading to its elimination. *Molecular Aspects of Medicine* 2003, **24**, 189-194.
- 14) GIL-GUZMAN E., OLLERO O., LOPEZ M. C., SHARMA R. K. a kol.: Differential production of reactive oxygen species by subset of human spermatozoa at different stages of maturation. *Human Reproduction* 2001, **16**, 1922-1930.
- 15) GOLDRING C., CASINI A. F., MEALLARO E., BELLO B. D. a kol.: Determination of 4-hydroxynonenal by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. *Lipids* 1993, **28**, 141-145.
- 16) HENKEL R. R.: Leukocytes and oxidative stress: dilemma for sperm function and male fertility. *Asian Journal of Andrology* 2011, **13**, 43-52.
- 17) HOLEČEK V.: Volné radikály, antioxidanty a jak dále? *Klinická biochemie a metabolismus* 2006, **14**, 140-145.
- 18) HOLLEY A. E., WALKER M. K., CHEESEMAN K. H., SLATER T. F.: Measurement of n-alkanals and hydroxyalkanals in biological samples. *Free Radical Biology and Medicine* 1993, **15**, 281-289.
- 19) CHARI M. G., COLAGAR A. H.: Seminal plasma lipid peroxidation, total antioxidant capacity, and cigarette smoking in asthenoteratospermic men. *Journal of Medieval History* 2011, **8**, 43-49.
- 20) IMHOF M., LACKNER J., LIPOVAC M., CHEDRANI P a kol.: Improvement of sperm quality after micronutrient supplementation. *e-SPEN Journal* 2012, **7**, 53-55.
- 21) JAGANJAC M., MATIJEVIC T.; CINDRIC M., CIPAK A. a kol.: Induction of CMV-1 promoter by 4-hydroxy-2-nonenal in human embryonic kidney cell. *Acta Biochimica Polonica* 2010, **57**, 179-183.

- 22) LANG J., CELLOTO C., ESTREBBAUER H.: Quantitative determination of the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 1985, **150**, 369-378.
- 23) LINDEN A., GÜLDEN M., MARTIN H. J., MASER E. a kol.: Peroxide-induced cell death and lipid peroxidation in C6 glioma cells. *Toxicology in Vitro* 2008, **22**, 1371-1376.
- 24) LOVELL M. A., MARKESBERY W. R.: Analysis of aldehydic markers of lipid peroxidation in biological tissues by HPLC with fluorescence detection. *Methods in Pharmacology and Toxicology* 2003, **7**, 17-21.
- 25) LIU Y., JINNO H., KURIHARA M., MIYATA N. a kol.: Determination of 4-hydroxy-2-nonenal in primary rat hepatocyte cultures by liquid chromatography with laser induced fluorescence detection. *Biomedical Chromatography* 1999, **13**, 75-80.
- 26) LUO X. P., YAZDANPANA M., BHOOI N., LEHOTAY D. C.: Determination of aldehydes and other lipid peroxidation products in biological samples by gas chromatography-mass spectrometry. *Analytical Biochemistry* 1995, **228**, 294-298.
- 27) MARKOVČIC L., WILDBURGER R., JAGANJAC M., CINDIRC M. a kol.: Lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal as factor of oxidative homeostasis supporting bone regeneration with bioactive glasses. *Acta Biochimica Polonica* 2010, **57**, 173-178
- 28) MARTÍNKOVÁ J. a kol.: Stanovení 4-hydroxynonenalu v biologickém materiálu pomocí HPLC. Diplomová práce, Univerzita Pardubice 2007.
- 29) OBORNA I., WOJEWODKA G., SANCTIS J. B., FINGEROVA H. a kol.: Increased lipid peroxidation and abnormal fatty acid profiles in seminal and blood plasma of normozoospermic males from infertile couples. *Human Reproduction* 2010, **25**, 308-316.
- 30) POLI G., SCHAUR R. J.: 4-hydroxynonenal in the pathomechanism of oxidative stress. *Critical Review* 2000, **50**, 315-321.
- 31) SAFARINEJAD M. R., HOSSEINI S. Y., DADKHAH F., ASGARI M. A.: Relationship of omega-3 and omega-6 acids with semen characteristics, and anti-oxidant status of seminal plasma: A comparison between fertile and infertile men. *Clinical Nutrition* 2010, **29**, 100-105.

- 32) SANOCKA D., KURPISZ M.: Reactive oxygen species and sperm cell. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2004, **2**, 1-7.
- 33) SALEH R. A., AGARWAL A.: Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *Journal of Andrology* 2002, **23**, 737-752.
- 34) SELLEY M. L., LACEY M. J., BARTLETT M. R., COPELAND C. M. a kol.: Content of signification amounts of a cytotoxic end-product of lipid peroxidation in human semen. *Journals of Reproduction and Ferility* 1991, **92**, 291-298.
- 35) SHIVA M., GAUTAM A. K., VERMA Y., SHIVGOTRA V. a kol.: Association between sperm quality, oxidative stress, and seminal antioxidant activity. *Clinical Biochemistry* 2011, **44**, 319-324.
- 36) SCHAUR R. J.: Basic aspect of the biochemical reactivity of 4-hydroxynonenal. *Molecular Aspects of Medicine* 2003, **24**, 149-159.
- 37) SCHNEIDER C., BOEGLIN W. E., YIN H., STEC D. F. a kol.: Synthesis of dihydroperoxides of linoleic and linolenic acids and studies on their transformation to 4-hydroperoxynonenal. *Lipids* 2005, **40**, 1155-1162.
- 38) SIEMS W., GRUNE T.: Intracellular metabolism od 4-hydroxynonenal. *Molecular Aspects of Medicine* 2003, **24**, 167-175.
- 39) STROHMAIER H., HINGHOFER-SZALKAY H., SCAHUR R. J.: Detection of 4-hydroxynonenal (HNE) as a physiological component in human plasma. *Journal of Lipid Mediators and Cell Signalling* 1995, **11**, 51-61.
- 40) SZWEDA L. I., UCHIDA K., TSAI L., STADTMAN E. R.: Inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. *The Journal of Biological Chemistry* 1993, **268**, 3342-3347.
- 41) ŠTÍPEK S. a kol. Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a nemoci. Grada Publishing, 2000.
- 42) TAVILANI H., GOODARZI M. T., VAISI-RAYGANI A., SALIMI S. a kol.: Activity of antioxidant enzymes in seminal plasma and their relationship with lipid peroxidation of spermatozoa. *Clinical Urology* 2008, **34**, 486-491.
- 43) UCHIDA K.: 4-hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in Lipid Research* 2003, **42**, 318-343.
- 44) UCHIDA T., GOTOH N., WADA S.: Method for analysis of 4-hydroxy-2-(E)-nonenal with solid-phase microextraction. *Lipids* 2002, **37**, 621-626.

- 45) UCHIDA K., ITAKURA K., KAWAKISHI S., HIAI H. a kol.: Characterization of epitopes recognized by 4-hydroxy-2-nonenal specific antibodies. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 1995, **324**, 241-248.
- 46) VALKO M., RHODES C. J., MONCOL J., IZAKOVIC M. a kol.: Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 2006, **160**, 1-40.
- 47) WINDSOR D. P., WHITE I. G., SELLEY M. L., SWAN M. A.: Effects of the lipid peroxidation product (E)-4-hydroxy-2-nonenal on ram sperm function. *Journal of Reproduction and Fertility* 1993, **99**, 359-366.

PŘÍLOHA



Zápis z jednání etické komise dne 13.7.2011

1. Etická komise souhlasí s řešením projektu „Vliv oxidačního stresu na množství a kvalitu lidských spermií, vliv suplementace antioxidanty“, „informovaný souhlas pacienta“ je v souladu se zákonem č. 96/2001 Sb. m.s. o ochraně osobních údajů.
2. Etická komise souhlasí s řešením projektu „Vliv kvality integrity chromatinu měřené disperzním testem chromatinu spermií a selektivní vazby spermií na hyaluronan na výsledky léčby neplodnosti metodami asistované reprodukce, „informovaný souhlas pacienta“ je v souladu se zákonem č.96/2001 Sb. m.s. o ochraně lidských práv a biomedicině a zákona č. 101/2000 Sb. o ochraně osobních údajů.
3. Etická komise souhlasí s řešením projektu „Analýza integrity chromatinu spermií mužů neplodných párů pomocí disperzního testu chromatinu spermií a studium účinku resveratrolu ve vztahu ke kvalitě spermií a výsledkům léčby neplodnosti pomocí asistované reprodukce“, „informovaný souhlas pacienta“ je v souladu se zákonem č. 96/2001 Sb. m.s. o ochraně lidských práv a biomedicině a zákona č. 101/2000 Sb. o ochraně osobních údajů.

V Hradci Králové dne 13.7.2011


Jiří Kliment – předseda komise

Tel.ústř.: 495 757 111
Fax: 495 523 427



**Prezenční listina
z jednání etické komise dne 13.7.2011**

Členové komise :

Jiří Kliment – předseda komise

MUDr. Jiří Štěpán, CSc.

MUDr. Břetislav Krátký

MUDr. Erik Antuš

Stanislava Jílovská

Renata Ježková

Přizván : MUDr. Jan Hiblbauer

Etická komise pracuje podle zásad správné klinické praxe /GCP/ a příslušných zákonů.

Jiří Kliment – předseda komise

Tel.ústř.: 495 757 111
Fax: 495 523 427