

Politechnika Gdańska
Wydział Chemiczny
Katedra Chemii Analitycznej

Rozprawa doktorska

OZNACZANIE BIOMARKERÓW STRESU OKSYDACYJNEGO W PRÓBKACH
BIOLOGICZNYCH Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI WYSOKOSPRAWNEJ
CHROMATOGRAFII CIECZOWEJ SPRZĘŻONEJ Z TANDEMOWĄ SPEKTROMETRIĄ
MAS

mgr inż. Monika Janicka

Promotor:

prof. dr hab. inż. Jacek Namieśnik

dr hab. inż. Agata Kot-Wasik

Gdańsk 2012

Dziękuję

PANU PROF. JACKOWI NAMIEŚNIKOWI
za wszelką pomoc, a także za porady oraz sugestie,
dzięki którym powstała niniejsza praca

PANI DR AGACIE KOT-WASIK
za przekazaną mi wiedzę oraz życzliwą pomoc podczas
wykonywania badań i redagowania pracy doktorskiej

dziękuję również

KOLEŻANKOM I KOLEGOM Z KATEDRY
CHEMII ANALITYCZNEJ,
w szczególności z pokoju 011 za wsparcie
i stworzenie niezapomnianej atmosfery pracy

podziękowania kieruję także do

MINISTERSTWA EDUKACJI I NAUKI
za przyznanie środków finansowych
na wykonanie części badań

szczególnie dziękuję

MAMIE I MOIM BLISKIM
za pomoc, cierpliwość i wiarę we mnie

SPIS SKRÓTÓW I AKRONIMÓW.....	5
WSTĘP.....	8
I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA	10
1. STRES OKSYDACYJNY – GENEZA.....	10
1.1 <i>Występowanie stresu oksydacyjnego.....</i>	<i>11</i>
1.2 <i>Biosynteza markerów stresu oksydacyjnego</i>	<i>12</i>
1.2.1 Układ oddechowy.....	15
1.2.2 Układ krwionośny	17
1.2.3 Układ wydalniczy.....	18
1.3 <i>Charakterystyka związków z grupy izoprostanów.....</i>	<i>20</i>
2. POBIERANIE PRÓBEK KONDENSATÓW WYDYCHANEGO POWIETRZA.....	21
3. TECHNIKI IZOLACJI BIOMARKERÓW Z PRÓBEK BIOLOGICZNYCH	24
4. TECHNIKI WYKORZYSTYWANE NA ETAPIE OZNACZEŃ KOŃCOWYCH.....	27
5. PROBLEMY ZWIĄZANE Z OZNACZANIEM BIOMARKERÓW STRESU OKSYDACYJNEGO	32
II CEL I ZAKRES PRACY.....	34
III CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA.....	36
1. ODCZYNNIKI I WZORCE.....	36
2. APARATURA	37
3. OPTYMALIZACJA METODYKI OZNACZANIA BIOMARKERÓW STRESU OKSYDACYJNEGO	39
3.1. <i>Przygotowanie roztworów wzorcowych</i>	<i>40</i>
3.2. <i>Dobór optymalnej techniki jonizacji analitów</i>	<i>41</i>
3.3 <i>Dobór optymalnego układu detekcji.....</i>	<i>42</i>
3.2. <i>Dobór optymalnych warunków procesu rozdzielania chromatograficznego.....</i>	<i>51</i>
4. SPOSÓB KALIBRACJI TECHNIKI CHROMATOGRAFICZNEJ.....	66
4.1. <i>Sporządzenie krzywych wzorcowych</i>	<i>66</i>
4.2 <i>Granica oznaczalności i wykrywalności proponowanych metodyk analitycznych</i>	<i>68</i>
5. OPTYMALIZACJA ETAPU PRZYGOTOWANIA PRÓBEK DO ANALIZY CHROMATOGRAFICZNEJ	70
5.1 <i>Badanie procesu sorpcji analitów na powierzchni polipropylenu (wg koncepcji 1 i 2)</i>	<i>70</i>
5.2 <i>Badanie stabilności izoprostanów w próbkach roztworów wzorcowych i kondensatach wydychanego powietrza w różnych warunkach przechowywania (wg koncepcji 3)</i>	<i>71</i>

5.3 Optymalizacja parametrów etapu wzbogacania próbki i izolacji związków z grupy izoprostanów (wg koncepcji 4).....	76
5.3.1. Optymalizacja parametrów przygotowania próbki z wykorzystaniem ekstrakcji do fazy stałej (wg koncepcji 4).....	77
5.3.2. Optymalizacja parametrów przygotowania próbki z wykorzystaniem liofilizacji jako techniki wzbogacania	81
6. PRÓBKI DO BADAŃ.....	82
6.1. <i>Próbki EBC</i>	82
6.2. <i>Próbki osocza</i>	84
7. PROCEDURA OZNACZANIA ZWIĄZKÓW Z GRUPY IZOPROSTANÓW, 3-NITROTYROZYNY I AMINOKWASÓW Z WYKORZYSTANIEM TECHNIKI LC-MS/MS	85
7.1. <i>Parametry pracy układu chromatograficznego do rozdzielania 3-nitrotyrozyny i aminokwasów w próbkach EBC</i>	86
7.2. <i>Parametry pracy układu chromatograficznego do rozdzielania związków z grupy izoprostanów w próbkach EBC i próbkach osocza myszy</i>	87
8. WEWNĄTRZLABORATORYJNA WALIDACJA OPRACOWANYCH METODYK ANALITYCZNYCH	89
9. ANALIZA PRÓBEK KONDENSATÓW WYDYCHANEGO POWIETRZA I OSOCZA POD KĄTEM OZNACZENIA ZAWARTOŚCI IZOPROSTANÓW, 3-NITROTYROZYNY I AMINOKWASÓW Z WYKORZYSTANIEM OPRACOWANYCH PROCEDUR ANALITYCZNYCH.....	93
9.1. <i>Analiza próbek kondensatów wydychanego powietrza</i>	93
10. WYNIKI I ICH OMÓWIENIE.....	102
STRESZCZENIE	105
ABSTRACT	106
LITERATURA	107
DOROBEK NAUKOWY.....	111

SPIS SKRÓTÓW I AKRONIMÓW

AKRONIM/ SKRÓT	TERMIN ANGLOJĘZYCZNY	TERMIN POLSKOJĘZYCZNY
3-NT	3-nitrotyrosine	3-nitrotyrozyna
AA	Acetic Acid	Kwas octowy
ACN	Acetonitrile	Acetonitryl
ALA	Alanine	Alanina
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization	Jonizacja chemiczna pod ciśnieniem atmosferycznym
API	Atmospheric pressure ionization	Jonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym
ArA	Arachidonic Acid	Kwas arachidonowy
ARG	Arginine	Arginina
ASP	Asparagine	Asparagina
BHT	Butylated hydroxytoluene	Butylowany hydroksytoluen
BMI	Body Mass Index	Wskaźnik masy ciała
BSTFA	N,O-Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide	N,O-bis(trimetylosylilo)trifluoroacetamid
BTJ	Beetroot Juice	Sok z czerwonych buraków
CEIA	Colorimetric Enzyme Immunoassay	Kolorymetryczna immunoanaliza enzymatyczna
CID	Collision Induced Dissociation	Wzbudzenie jonów przez kolizje
COX	Cyclooxygenase	Cyklooksygenaza
CYS	Cysteine	Cysteina
DHA	Docosahexanoic Acid	Kwas dokozaheksaenowy
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropylethylamine	<i>N,N</i> -diizopropyletyloamina
DMF	Dimethylformamide	Dimetyloformamid
DNA	Deoxyribonucleic acid	Kwas deoksyrybonukleinowy
DOX	Doxorubicin	Doksorubicyna
DVB	Divinylbenzene	Diwinylobenzen
EBC	Exhaled Breath Condensate	Kondensat wydychanego powietrza
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	Kwas etylenodiaminotetraoctowy
EIA	Enzyme Immunoassay	Immunoanaliza enzymatyczna
EPA	Eicosapentanoic Acid	Kwas eikozapentaenowy

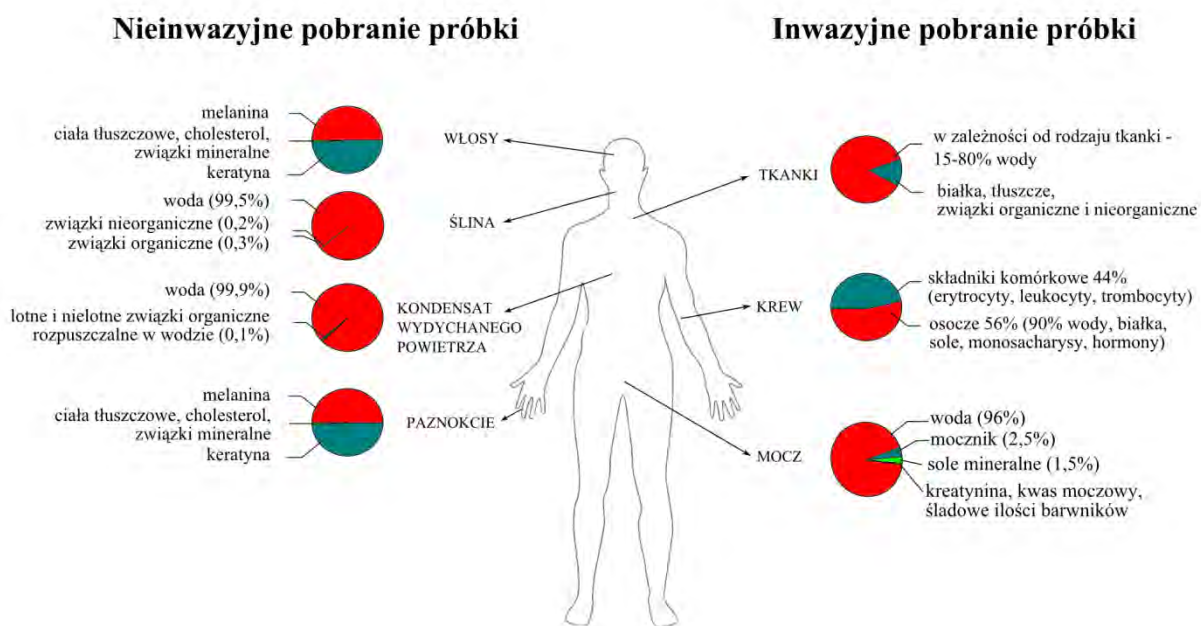
ESI	Electrospray Ionization	Jonizacja poprzez elektrorozpylanie
FA	Formic Acid	Kwas mrówkowy
FA – NH ₃	Ammonia – formic acid buffer	Bufor mrówczanowy z dodatkiem amoniaku
FIA	Flow-injection analysis	Analiza wstrzykowo-przepływowa
FEN	Phenylalanine	Feniloalanina
GC–NICI–MS	Gas chromatography-negative-ion chemical ionization mass spectrometry	Chromatografia gazowa sprzężona ze spektrometrią mas z ujemną jonizacją chemiczną
GC-MS/MS	Gas chromatography tandem mass spectrometry	Chromatografia gazowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
GLI	Glicine	Glicyna
GLU	Glutamine	Glutamina
HCl	Hydrochloric Acid	Kwas chlorowodorowy
HIS	Histidine	Histydyna
HYD	4-Hydroxyproline	4-hydroksyprolina
HLB	Hydrophilic-Lipophilic Balance	Równowaga hydrofilowo-lipofilowa
HPIC	High Performance Ion Chromatography	Wysokosprawna chromatografia jonowa
HPLC-EC	High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection	Wysokosprawna chromatografia cieczowa z detekcją elektrochemiczną
IS	Internal Standard	Wzorzec wewnętrzny
KASP	Aspartic Acid	Kwas asparaginowy
KGLU	Glutamic Acid	Kwas glutaminowy
LC-MS	Liquid Chromatography coupled with Mass Spectrometry	Chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas
LC-MS/MS	Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry Detection	Chromatografia cieczowa sprzężona z tandemową spektrometrią mas
LEU	Leucine	Leucyna
LIZ	Lysine	Lizyna
LOD	Limit of Detection	Granica wykrywalności
LOQ	Limit of Quantitation	Granica oznaczalności
LT	Leukotrienes	Leukotrieny
MeOH	Methanol	Metanol
MET	Metionine	Metionina

MRM	Multiple Reaction Monitoring	Monitorowanie wybranej reakcji
MS	Mass spectrometer	Spektrometr mas
MS/MS	Tandem mass spectrometry	Tandemowy spektrometr mas
PFBBr	Pentafluorobenzylbromide	Bromek pentafluorobenzylu
PG	Prostaglandines	Prostaglandyny
PRO	Proline	Prolina
Q	Quadrupole analyser	Analizator kwadrupolowy
QA	Quality Control	Kontrola jakości
QC	Quality Assurance	Zapewnianie jakości
RIA	Riadioimmunoassay	Radioimmunoanaliza
ROS	Reactive Oxygen Species	Reaktywne formy tlenu
RPLC	Reserved Phase Liquid Chromatography	Chromatografia cieczowa w odwróconym układzie faz
RSD	Relative standard deviation	Względne odchylenie standardowe
SCAN	Full scan	Tryb przemiatania całego widma
SD	Standard deviation	Odchylenie standardowe
SER	Serine	Seryna
SM	Multiple sclerosis	Stwardnienie rozsiane
SO	Oxidative Stress	Stres oksydacyjny
SPE	Solid Phase Extraction	Ekstrakcja do fazy stałej
TBHP	tert-Butyl hydroperoxide	Wodoronadtlenek tert-butyłu
TLC	Thin layer chromatography	Chromatografia cienkowarstwowa
TOF	Time of flight analyser	Analizator czasu przelotu
TRE	Threonine	Treonina
TX	Tromboxanes	Tromboksany
TYR	Tyrosine	Tyrozyna
VOC	Volatile Organic Compounds	Lotne związki organiczne
WAL	Valine	Walina

WSTĘP

Diagnostyka chorób na przestrzeni setek lat podlegała ciągłemu rozwojowi od prostych technik oceniających wygląd pacjenta (np. kolor skóry, gałek ocznych), jak i specyficzny zapach oddechu (owocowy zapach acetonu w cukrzycy, stęchła rybia woń oddechu w zaawansowanej chorobie wątroby), aż do wysoce specyficznych badań, jakimi jest np. wykonanie biopsji, w trakcie, której pobierany jest fragment tkanki, a wynik przeprowadzonych badań morfologicznych czy też wirusologicznych stanowi podstawę do stwierdzeń czy występują w niej zmiany chorobowe i jaki jest stan ich zaawansowania.

W chwili obecnej informacje niezbędne do postawienia diagnozy uzyskuje się zwykle w rezultacie inwazyjnego pobrania próbki krwi, szpiku kostnego, tkanek oraz moczu (Rysunek 1). Jednakże trwają intensywne badania nad możliwością wykonania i wykorzystania w praktyce innych rozwiązań metodycznych w tym przede wszystkim nieinwazyjnych rozwiązań w zakresie uzyskiwania wiarygodnych informacji o stanie zdrowia pacjenta. Diagnostyka medyczna, kryminalna, sądowa, toksykologiczna z powodzeniem wykorzystuje taki materiał biologiczny jak krew, mocz, paznokcie i włosy. Lecz najmniej rozpoznawalnym i prawdopodobnie, dlatego rzadko wykorzystywanym w praktyce jest kondensat wydychanego powietrza – EBC.



Rysunek 1. Rodzaje i skład próbek biologicznych wykorzystywanych w diagnostyce medycznej

Od kilku lat prowadzone są badania nad możliwością oznaczania w próbkach biologicznych różnych substancji, które można uznać za biomarkery chorób.

Znanych jest kilka definicji biomarkerów. Można je zaliczyć do trzech kategorii:

- zapewniających możliwość śledzenia rozwoju choroby w czasie i dobrze korelujących z wynikami uzyskanymi w trakcie stosowania znanych metod klinicznych,
- ujawniających efekt działania leku,
- pełniących rolę zastępczego punktu końcowego w badaniach klinicznych.

W tym samym czasie, gdy w wielu ośrodkach naukowych trwają poszukiwania nowych biomarkerów, eksperci zatrudnieni w firmach farmaceutycznych i biotechnologicznych prowadzą intensywne badania nad możliwością ich wykorzystania, jako narzędzi do tworzenia nowych leków – nie tylko do wykrywania odpowiedzi biologicznych w organizmie wywołanej przez leki eksperymentalne, ale także do wyznaczania nowych celów interwencji terapeutycznych.

Z praktycznego punktu widzenia biomarkery powinny specyficznie i czule odzwierciedlać stan choroby, być pomocne w diagnostyce i monitorowaniu postępów terapeutycznych.

Postępujący wzrost zainteresowania analityką biomarkerów różnych chorób cywilizacyjnych sprawiło, iż niezbędne stało się opracowywanie nowych i konkurencyjnych procedur analitycznych, które stwarzają nowe możliwości w zakresie wczesnej diagnostyki wielu chorób.

Do prowadzenia badań nad biomarkerami występującymi na śladowych, a najczęściej na ultra śladowych poziomach zawartości w próbkach materiału biologicznego niezbędne są trzy typy narzędzi analitycznych:

- procedury analityczne o odpowiednich parametrach metrologicznych,
- aparatura kontrolno-pomiarowa,
- materiały odniesienia i roztwory wzorcowe niezbędne do odpowiedniego poziomu kontroli i zapewnienia jakości uzyskiwanych danych pomiarowych.

I. CZĘŚĆ TEORETYCZNA

1. Stres oksydacyjny – geneza

Tlen to najbardziej rozpowszechniony pierwiastek na Ziemi, stanowi około 21% objętości atmosfery ziemskiej, a w związkach z innymi pierwiastkami wchodzi w skład litosfery i hydrosfery. Wchodzi w skład związków organicznych wszystkich głównych klas, takich jak proteiny, węglowodory i tłuszcze, tak samo jak związków nieorganicznych, które są składnikami organizmów żywych w postaci ich muszli, zębów i kości. Tlen, jako pierwiastek biogeny jest niezbędny dla organizmów tlenowych do procesu oddychania. Związki chemiczne zawierające atomy tlenu z niesparowanym elektronem nazywane są reaktywnymi formami tlenu (ROS). Należą do nich wolne anionorodniki tlenu, tlen singletowy oraz rozmaite nadtlenki i ponadtlenki. Związki te powstające naturalnie w trakcie procesów metabolizmu mogą wywierać korzystny wpływ na organizm, system immunologiczny wykorzystuje je do zwalczania patogenów, uczestniczą w metabolizmie substancji toksycznych oraz w przekazywaniu sygnałów między komórkami. Zwiększone stężenie reaktywnych form tlenu może być wywołane poprzez działania czynników zewnętrznych (np. promieniowania UV, promieniowania jonizującego) lub wewnętrznych (np. w stanach zapalnych, chorobach przewlekłych, po zabiegach operacyjnych). Równowaga oksydacyjno-antyoksydacyjna warunkuje homeostazę organizmu i jego prawidłowe funkcjonowanie. Szybkość powstawania i ilość powstających reaktywnych form tlenu powinna pozostawać w równowadze z ich neutralizowaniem i usuwaniem w wyniku zachodzących procesów antyoksydacyjnych [1].

Zaburzenie równowagi w organizmie najczęściej związane jest ze zwiększoną intensywnością tworzenia ROS i przesunięciem w kierunku procesów utleniania, co powoduje powstanie stanu określanego mianem stresu oksydacyjnego [2]. Jest to stan, w którym komórki narażone na działanie ROS ulegają uszkodzeniu, utlenione zostają białka (agregacja i denaturacja), lipidy (peroksydacja), węglowodany i nukleotydy. Reaktywne formy tlenu indukują zmiany w strukturze DNA, które prowadzą do mutacji lub efektów cytotoksycznych itp. [3-5].

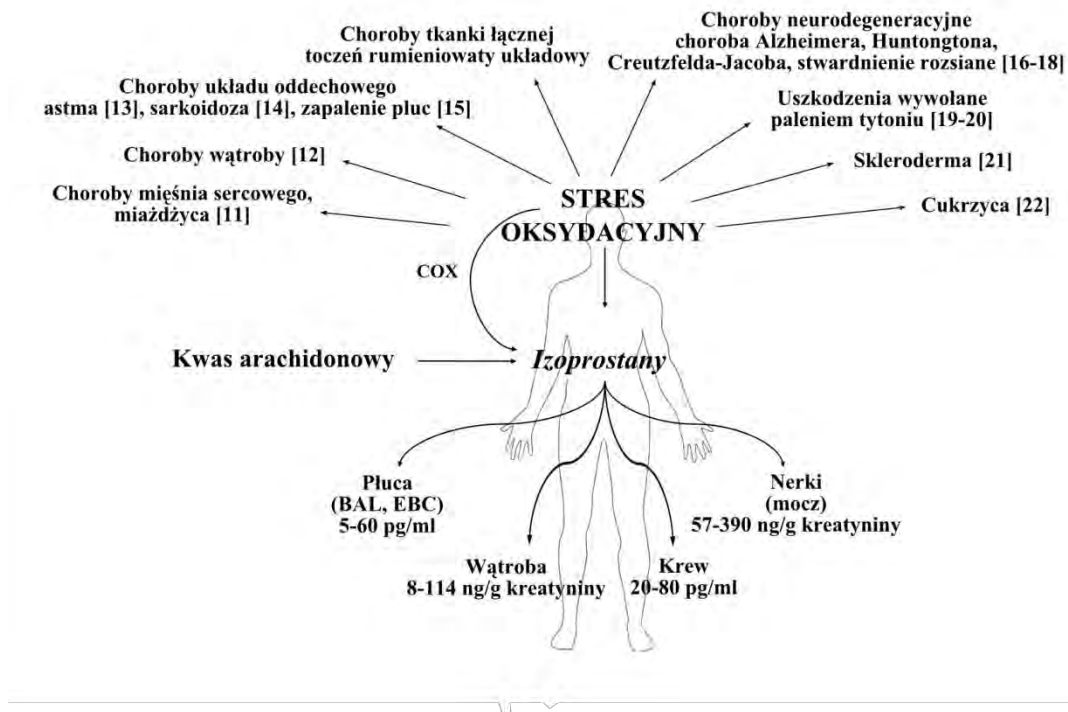
Organizmy wykształciły mechanizmy obronne przed działaniem wolnych rodników. Jednym z elementów takiego systemu jest odpowiednia organizacja strukturalna komórek, która umożliwia izolację miejsc, w których zachodzą reakcje z wytwarzaniem rodników, jako produktów ubocznych [6,7].

Ważną rolę w ochronie przed rodnikami odgrywają różne mechanizmy procesów metabolicznych. Można w tym miejscu wymienić [8]:

- reakcje z udziałem związków wygaszających wzbudzone cząsteczki (karotenoidy, witamina E),
- mechanizmy nieenzymatyczne: (obejmujące grupę drobnocząsteczkowych substancji zdolnych do neutralizacji ROS) ceruloplazmina, transferyna, poliamidy, jony metali przejściowych, sekwestr metali, metalotioneiny,
- mechanizmy enzymatyczne: dysmutaza ponadtlenkowa, katalazy (rozkładające nadtlenek wodoru do wody), peroksydaza glutationowa, reduktaza glutationowa, S-transferaza glutationu oraz grupa fosfolipaz wydzielniczych A2,
- reakcje z udziałem białek szoku cieplnego – białka opiekuńcze i proteazy.

1.1 Występowanie stresu oksydacyjnego

Wolne rodniki mogą być wytwarzane w procesach endogennych z różnych źródeł (np. w mitochondriach lub podczas aktywacji fagocytów - "wybuch tlenowy" [9]) lub pochodzić ze źródeł zewnętrznych (toksyny środowiskowe, dym papierosowy).



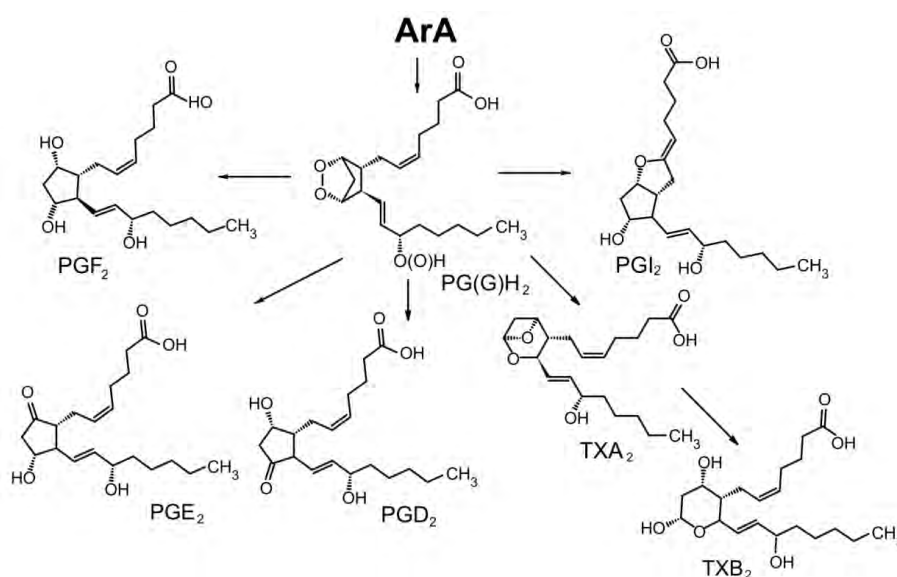
Rysunek 2. Występowanie stresu oksydacyjnego w organizmie człowieka wraz z poziomami stężeń izoprostanów w różnych płynach fizjologicznych i narządach człowieka

Niszczące działanie rodników może obejmować praktycznie wszystkie biocząsteczki występujące w organizmie wywołując uszkodzenia na poziomie molekularnym oraz organelli komórkowych [3]. Duża reaktywność wolnych rodników sprawia, że ich oznaczenie nie jest zadaniem łatwym, w związku z tym przedmiotem zainteresowania analityków są przede wszystkim produkty ich oddziaływania.

Peroksydacja lipidów związana z działaniem wolnych rodników prowadzi do powstania izoprostanów. Ich odkrycie zainicjowało powstanie nowego trendu w badaniach związanych z rolą wolnych rodników w fizjologii i patofizjologii. Obecność tych związków stwierdzono w płynach biologicznych, takich jak mocz, krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, a także w wydychanym powietrzu (Rysunek 2). Otrzymane dane analityczne, określające poziom izoprostanów mogą być wykorzystane w diagnostyce chorób przewlekłych, których jedną z przyczyn jest stres oksydacyjny.

1.2 Biosynteza markerów stresu oksydacyjnego

Eikozanoidy, zwane także prostanoidami, to biologicznie aktywne związki, które powstają w skutek enzymatycznego przekształcenia kwasu arachidonowego i innych kwasów C20, posiadających wiązania podwójne. Tworzące się związki to prostaglandyny (PG), tromboksany (TX) i leukotrieny (LT). Na Rysunku 3 przedstawiono schemat enzymatycznego przekształcania kwasu arachidonowego w prostanoidy [23].



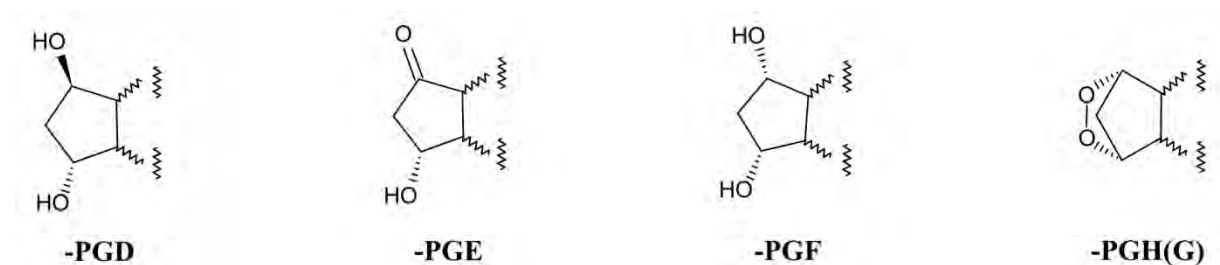
Rysunek 3. Schemat przebiegu procesu enzymatycznego przekształcania kwasu arachidonowego w prostanoidy

Izoprostany powstają w wyniku nieenzymatycznego mechanizmu wolnorodnikowego utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (kwasu arachidonowego - ArA, kwasu eikozapentaenowego - EPA oraz kwasu dokozaheksaenowego - DHA), przekształcane *in situ* w fosfolipidach, a uwalniane do krwi przez fosfolipazę A, są wydalone przez nerki. W Tabeli 1 zestawiono izoprostany zaliczane do ośmiu różnych typów ze względu na ich pochodzenie i budowę.

Tabela 1. Klasyfikacja izoprostanów ze względu na pochodzenie, długości łańcuchów i lokalizację grupy hydroksylowej

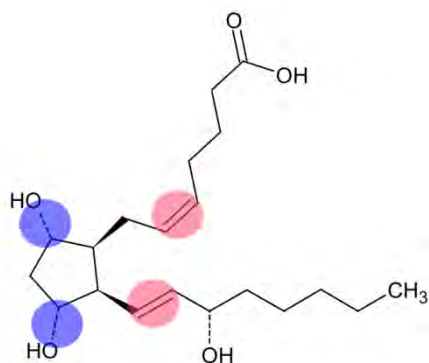
Typ	ArA	EPA	DHA
I			
II			
III			
IV			
V			
VI			
VII			
VIII			

Główne pochodne związków, wywodzących się z kwasu arachidonowego, zostały wykorzystane do stworzenia nomenklatury izoprostanów. Dla uproszczenia stosuje się skrót „izoP”, a główne klasy izoprostanów oznaczane są literami D, E, F, G i H ze względu na typ pierścienia cyklopentanowego (Rysunek 4).



Rysunek 4 Nazewnictwo związków z grupy izoprostanów ze względu na typ pierścienia cyklopentanowego

Analogicznie do nomenklatury prostaglandyn, liczba podwójnych wiązań w łańcuchach bocznych odpowiada liczbom 1, 2, 3 lub 4. Dla określenia stereochemii grup OH w pierścieniu cyklopentanowym zostały użyte symbole α i β (Rysunek 5). Dwie grupy OH rzutowane pod płaszczyznę cząsteczki oznaczone są symbolem α , natomiast β oznacza położenie grup OH nad płaszczyznę pierścienia. Jeżeli w cząsteczce występują grupy OH w różnym położeniu, symbol α ma pierwszeństwo przed β [24].

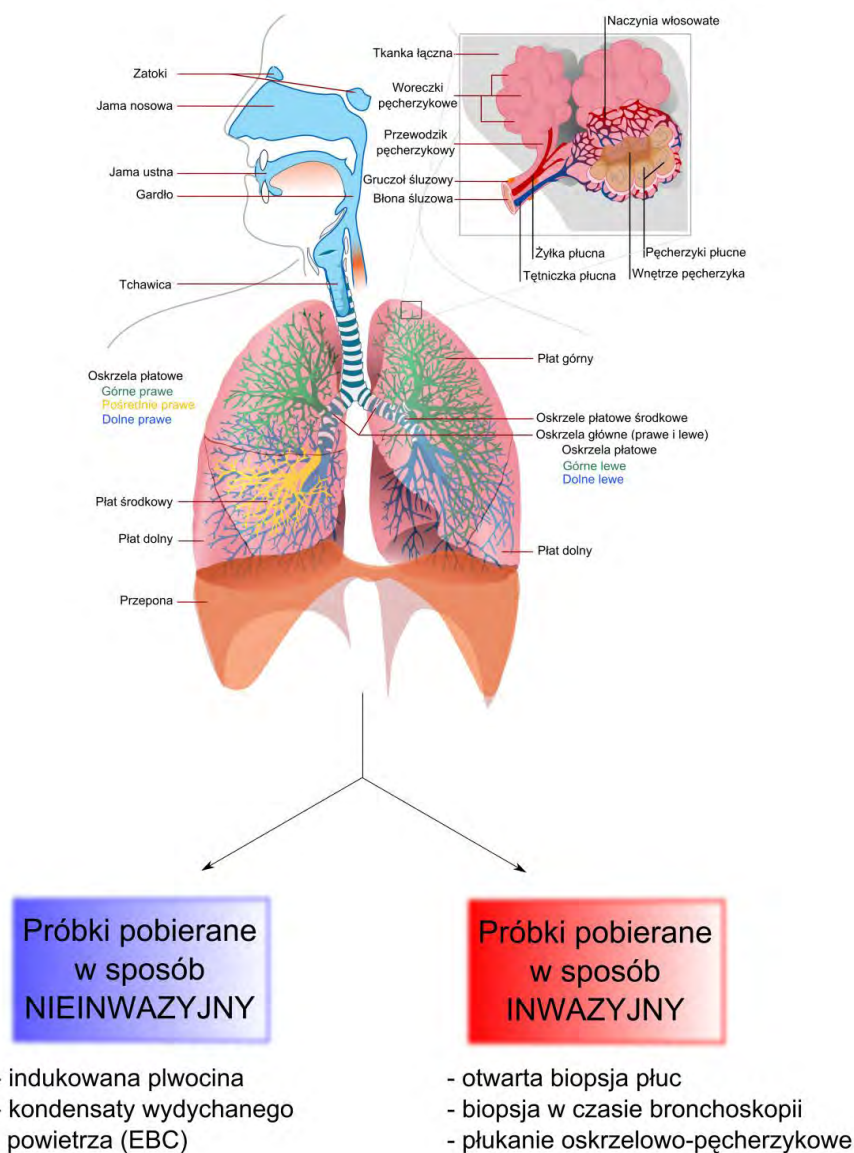


Rysunek 5. Schemat struktury jednego ze związków z grupy izoprostanów **8-iso-PGF_{2α}**. (Kolor niebieski - grupy -OH rzutowane pod płaszczyznę pierścienia (oznaczenie α), kolor różowy – podwójne wiązania w łańcuchach bocznych (oznaczenie β))

Orientacja *cis* obu łańcuchów w strukturze izoprostanów powoduje, iż różnią się one od powstających enzymatycznie prostanoidów, które posiadają łańcuchy w orientacji *trans*. Ten fakt sprawia, że izoprostany są interesującymi i wyjątkowymi produktami utleniania lipidów [25].

1.2.1 Układ oddechowy

Układ oddechowy tworzą drogi oddechowe (jama nosowa, gardło krtań, tchawica, oskrzela) oraz narządy oddechowe, czyli płuca zbudowane z pęcherzyków płucnych. Pęcherzyki płucne otoczone są siecią naczyń włosowatych (włośniczek płucnych) (Rysunek 6). Poprzez błonę pęcherzykowo-włośniczkową zachodzi wymiana gazów na zasadzie dyfuzji. Wnętrze pęcherzyków płucnych i dróg oddechowych wyścielane jest płynem, który zawiera wiele biomarkerów powstających w wyniku działania stresu oksydacyjnego bezpośrednio w układzie oddechowym, a także markerów przenoszonych przez krew, dyfundujących przez błonę pęcherzykowo-włośniczkową.

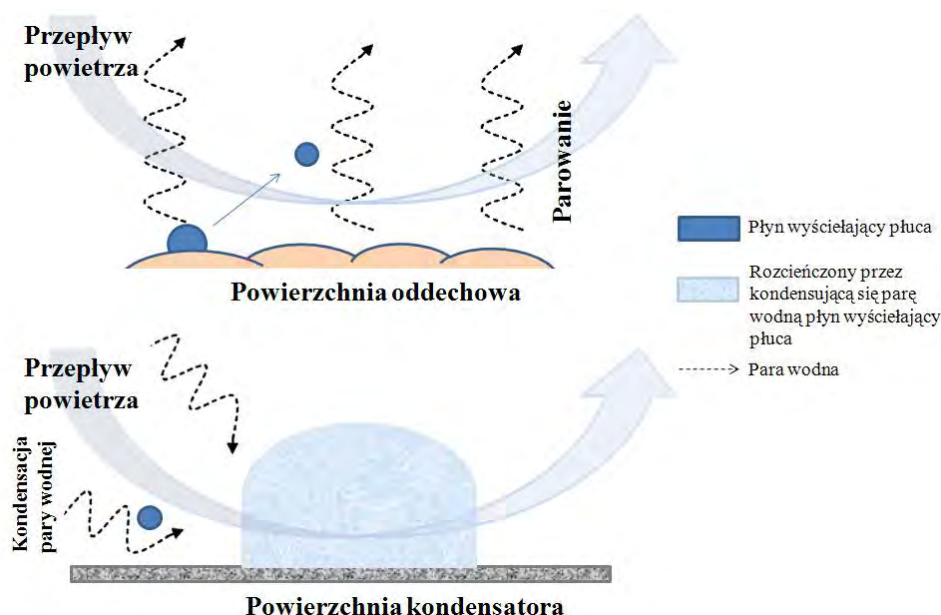


Rysunek 6. Schemat budowy układu oddechowego człowieka

Do oceny stanów zapalnych dróg oddechowych wykorzystuje się wyniki analiz próbek pobieranych w sposób inwazyjny i nieinwazyjny. Badania prowadzone w sposób inwazyjny są najlepszą metodą bezpośredniej oceny histologicznej nasilenia zapalenia dróg oddechowych jednak wiążą się one ze znacznym dyskomfortem pacjenta. Pobieranie próbek indukowanej płwociny jest mniej inwazyjne jednak może się łączyć z powikłaniami takimi jak skurcz oskrzeli, szczególnie u małych dzieci. Kondensaty wydychanego powietrza pobierane są w sposób całkowicie nieinwazyjny, bezpieczny, łatwy do wykonania, a wyniki ich analizy odzwierciedlają skład płynu wyściełającego oskrzela i pęcherzyki płucne. Dodatkową ich zaletą jest fakt, iż mogą być pobierane od pacjentów z ciężką czy źle kontrolowaną chorobą dróg oddechowych, od osób, którym życie podtrzymuje specjalistyczna aparatura medyczna (respirator) oraz od małych dzieci [26].

Powstawanie kondensatów wydychanego powietrza

Kropki płynu wyściełającego drogi oddechowe odrywają się od śluzówki i są rozcieńczane poprzez parę wodną kondensującą się na powierzchni kondensatora. Schemat powstawania kondensatów wydychanego powietrza przedstawiono na Rysunku 7.



Rysunek 7. Schemat powstawania kondensatów wydychanego powietrza (EBC)

Kondensaty wydychanego powietrza składają się z:

- cząstek aerozolu płynu wyściełającego układ oddechowy (zawierającego nietlotne substancje rozpuszczalne w wodzie), uwalnianego przez turbulentny ruch powietrza w układzie,
- skondensowanej pary wodnej,
- lotnych substancji rozpuszczalnych w wodzie [27].

Powietrze wydychane z płuc zawiera kilkaset różnych związków chemicznych, z których przynajmniej część potencjalnie może posłużyć do oceny i monitorowania procesów zachodzących w drogach oddechowych.

1.2.2 Układ krwionośny

Układ krwionośny jest zamkniętym systemem naczyń krwionośnych, w którym krążenie krwi jest wymuszone przez pracę serca. W naczyniach włosowatych odbywa się wymiana materii pomiędzy krwią i tkankami. Tak, więc krążenie krwi ma wiele funkcji np.:

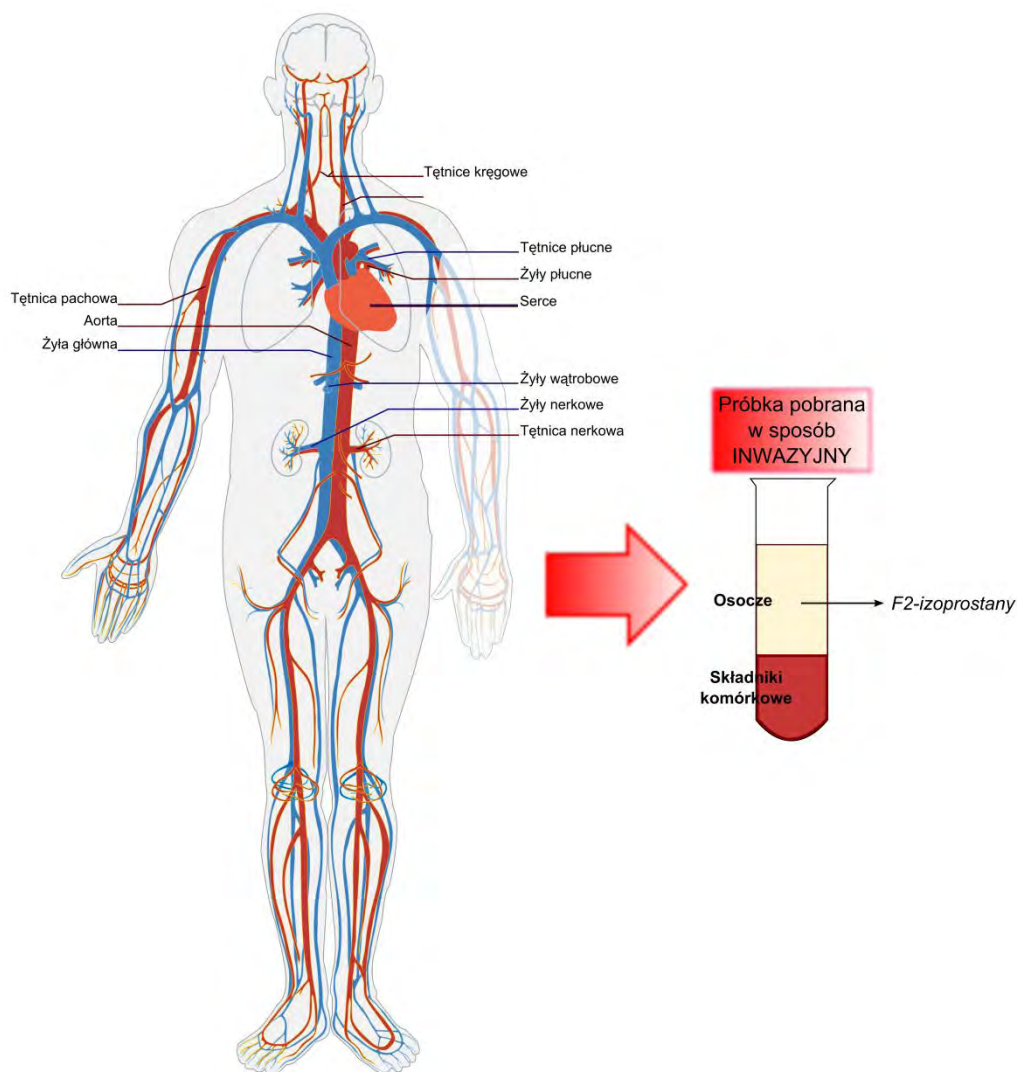
- wymiana gazów,
- przenoszenie podstawowych składników odżywczych,
- usuwanie zbędnych produktów przemiany materii z tkanek i przenoszenie ich do wątroby i nerek,
- utrzymywanie ciepłoty ciała,
- przenoszenie hormonów z miejsc ich powstawania do komórek docelowych.

Wszystkie te funkcje są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Schemat budowy układu krwionośnego pokazano na Rysunku 8.

Występowanie markerów stresu oksydacyjnego w układzie krwionośnym może być związane z wydzielaniem ich do krwi w trakcie chorób ogólnoustrojowych, ale także z samego układu krwionośnego [28].

W ścianach naczyń krwionośnych w trakcie procesów fizjologicznych metabolizmu komórkowego tlen ulega szeregu redukcji z utworzeniem reaktywnych form tlenu takich jak anion ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) czy nadtlenek wodoru. Reaktywne formy tlenu wykazują różnokierunkowe działanie w naczyniach krwionośnych np.: działanie cytotoksyczne, udział w procesach wzrostu i namnażania komórek oraz w procesach sygnalizacyjnych. Jest prawdopodobne to, że ROS indukują proces powstawania wielu chorób układu krwionośnego (wzmożona synteza F2-izoprostanów).

Występowanie stresu oksydacyjnego w naczyniach krwionośnych powoduje upośledzenie rozkurczu naczyniowego w wyniku peroksydacji lipidów błonowych, ograniczenie biodostępności naczyniorozszerzającego tlenu azotu oraz podwyższone stężenie naczyniokurczących F2-izoprostanów [29].



Rysunek 8. Schemat budowy układu krwionośnego człowieka

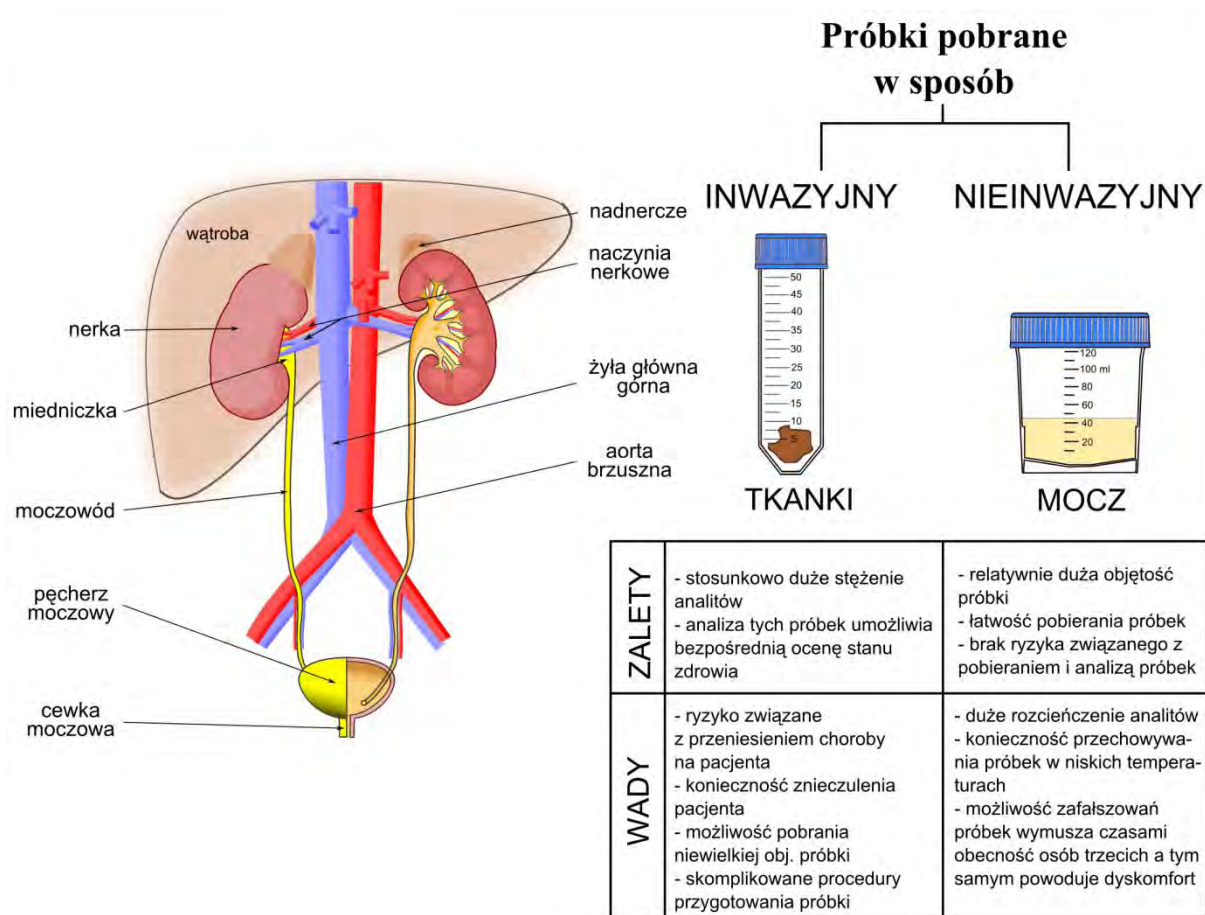
1.2.3 Układ wydalniczy

Układ wydalniczy to zespół narządów produkujących, magazynujących i usuwających mocz z organizmu (Rysunek 9). U ludzi składa się on z dwóch nerek, dwóch moczowodów, pęcherza i cewki moczowej. Nerki, które są najważniejszym organem w tym układzie, biorą udział w takich procesach jak:

- regulacja gospodarki elektrolitowej,
- zagęszczanie moczu,

- utrzymywanie równowagi kwasowo-zasadowej.

Występowanie stresu oksydacyjnego w układzie wydalniczym połączone jest głównie z chorobami nerek i stanami zapalnymi pęcherza moczowego (gdzie nacieki leukocytarne i zmiany zapalne w czasie infekcji bakteryjnej inicjują reakcje charakteryzujące się wzmożoną produkcją ROS [30, 31]).



Rysunek 9. Schemat budowy układu wydalniczego człowieka

Choroby nerek, w patogenezie, których rodniki tlenowe odgrywają istotną rolę to kłębuszkowe zapalenie nerek, ostra niewydolność nerek, nefropatia zaporowa, odmiedniczkowe zapalenie nerek i przewlekła niewydolność nerek [32].

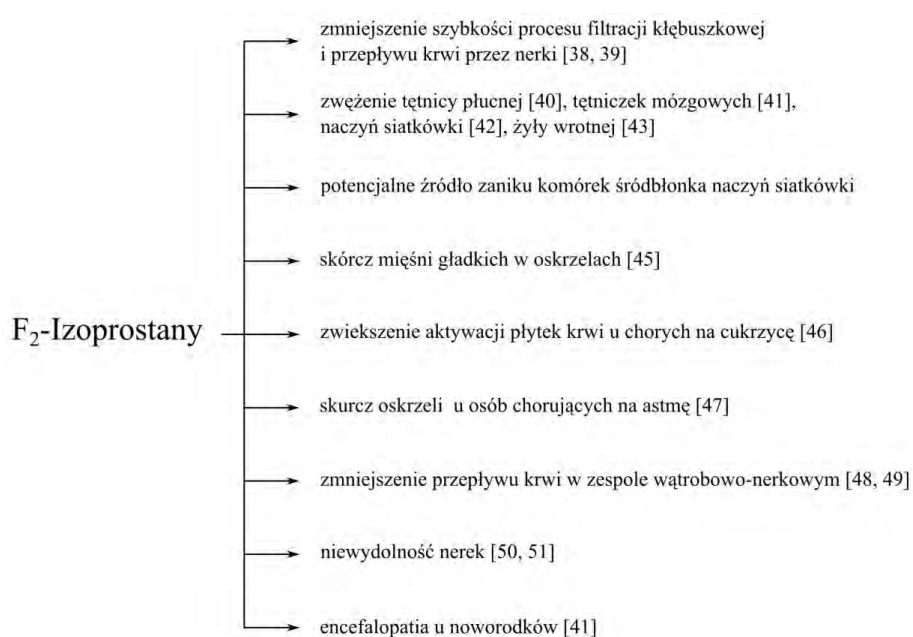
Przewlekła niewydolność nerek może prowadzić do powstania nowotworu. Do istotnych czynników predysponujących jego wystąpienie zalicza się: podwyższonego stężenie ROS, przewlekłe infekcje układu moczowego, obniżone stężenie aktywnej witaminy D, niektóre leki, palenie papierosów, uszkodzenie układu immunologicznego oraz zwiększenie intensywności oddziaływania związków wykazujących właściwości rakotwórcze [33, 34].

1.3 Charakterystyka związków z grupy izoprostanów

Zmiany wywołane przez wolne rodniki w organizmie są ważnym wskaźnikiem wielu procesów patologicznych i toksykologicznych. Pomimo wzmożonych w ostatnich latach, wysiłków ukierunkowanych na odkrycie nowych biomarkerów (czego efektem są między innymi wyniki badań prowadzonych na zwierzętach) istnieje ogromne zapotrzebowanie na badania określające zastosowanie biomarkerów w analizie uszkodzeń spowodowanych przez wolne rodniki. Proces utleniania lipidów związany z działaniem wolnych rodników prowadzi do powstania mediatorów, które mogą być wykorzystywane, jako wskaźniki występowania i przebiegu chorób przewlekłych i stanów zapalnych wywołanych stresem oksydacyjnym [35].

Klasycznym przedstawicielem biomarkerów stresu oksydacyjnego - głównie ze względu na stabilność chemiczną - są izoprostany. Izoprostany nie są wyłącznie biomarkerami SO, lecz posiadają również wiele funkcji biologicznych związanych z patofizjologicznym sygnalizowaniem uszkodzeń oksydacyjnych.

Powstawanie izoprostanów z lipidów błonowych może być przyczyną zmian płynności i integralności błon komórkowych. Wyniki licznych badań przeprowadzonych w celu ustalenia właściwości 8-iso-PGF_{2α} dowiodły, iż związek ten powoduje zwężanie się naczyń w nerkowym i płucnym układzie krążenia [36]. Poza tym przyczynia się do modyfikacji funkcji płytek krwi oraz stymuluje syntezę DNA w mięśniach gładkich [37].

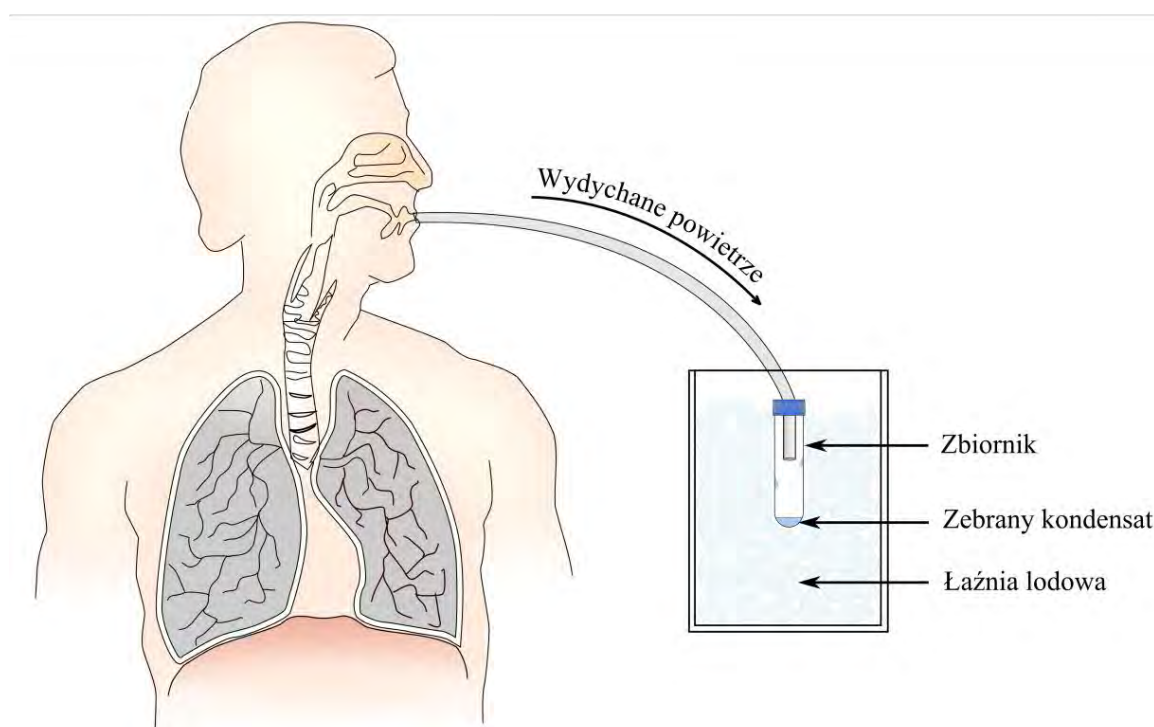


Rysunek 10. Zestawienie informacji o niekorzystnym oddziaływaniu biologicznym F₂-izoprostanów

Analiza dostępnych danych literaturowych prowadzi do wniosku, iż większość badań nad oddziaływaniem F_2 -izoprostanów skupia się wokół 8-iso-PGF_{2α}. Ten właśnie izoprostan jest najczęściej przedmiotem zainteresowania analityków. Na Rysunku 10 zebrano schematycznie informacje o różnych przejawach niekorzystnego oddziaływania izoprostanów na organizm człowieka.

2. Pobieranie próbek kondensatów wydychanego powietrza

Pobieranie próbek kondensatów wydychanego powietrza charakteryzuje się dwiema głównymi zaletami: nieinwazyjnością i prostotą wykonania. Na Rysunku 11 pokazano w sposób schematyczny zasadę pobierania próbek EBC.



Rysunek 11. Schemat pobierania próbek kondensatów wydychanego powietrza - EBC

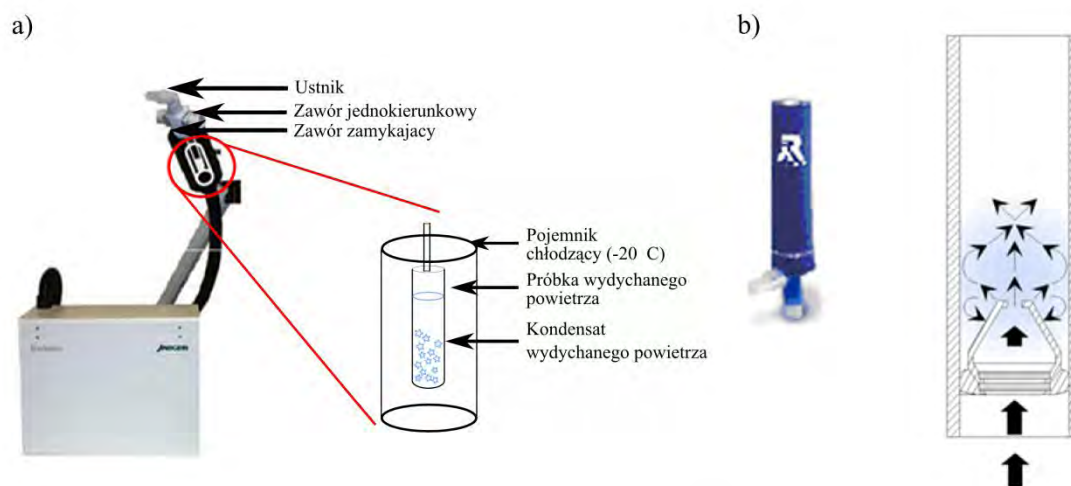
Próbki EBC są w chwili obecnej pobierane od pacjentów w sposób nieinwazyjny za pomocą urządzeń, które są dostępne na rynku. Informacje na ich temat zestawiono w Tabeli 2.

Urządzeniem najpowszechniej stosowanym w Europie jest aparat *EcoScreen*, który jest wyposażony w elektryczny system chłodzenia powietrza. Urządzenie to wyposażone jest w pułapkę uniemożliwiającą przedostanie się śliny do kondensatu, a tym samym zanieczyszczenia go amylazą (Rysunek 12a).

Tabela 2. Charakterystyka urządzeń do pobierania kondensatów wydychanego powietrza

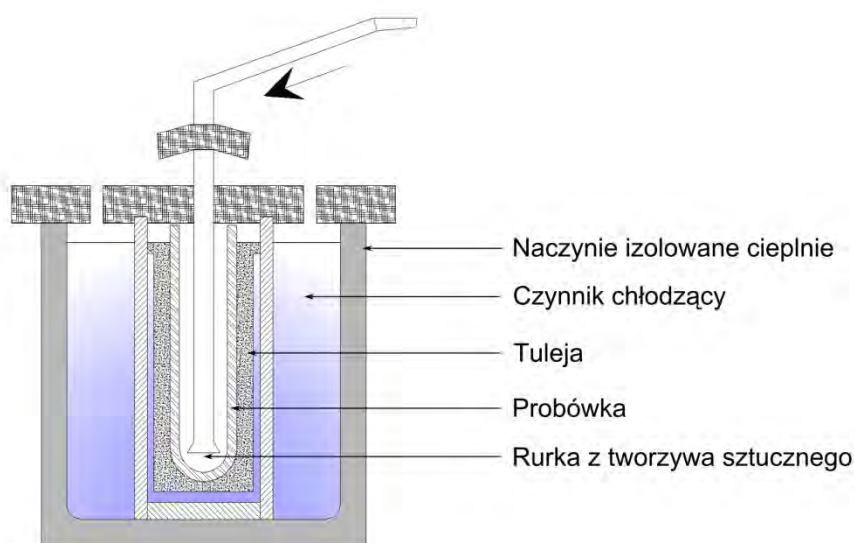
Nazwa urządzenia	Wytwórca	Uwagi
<i>EcoScreen</i>	USA; Viasys Europa; MEDIVAC di Romei Vanna	najczęściej stosowany system; popularny w Europie;
<i>RTube</i>	USA; Respiratory Research	możliwość użycia w domu; małe gabaryty, równoległe pobieranie kilku kondensatów;
<i>Anacon</i>	Hiszpania; Biostec	kontrolowana temperatura w czasie pobierania próbki; zaprojektowana do użycia dla pacjentów zaintubowanych;
<i>TurboDeccs</i>	Włochy; Italchil	łatwe czyszczenie;

Innym znanym rozwiązaniem jest urządzenie o małych rozmiarach znane pod nazwą *RTube*, które to jest najczęściej stosowane na terenie Stanów Zjednoczonych (Rysunek 12b). Pacjent oddycha przez ustnik, ślina oddzielana jest od strumienia oddechu i kierowana do zbiornika poniżej wlotu powietrza. Kondensat zbierany jest w cylindrze schłodzonym wcześniej do temperatury -20°C .



Rysunek 12. Wygląd oraz schematy budowy urządzeń do pobierania próbek kondensatów wydychanego powietrza a) *EcoScreen* i b) *RTube*

Inne znane urządzenia wykorzystywane do pobierania próbek EBC to *Anacon* i *TurboDeccs*. W tym miejscu warto wspomnieć o urządzeniu opracowanym w Uniwersytecie Medycznym w Łodzi [52], gdzie w izolowanym cieplnie naczyniu, wypełnionym czynnikiem chłodzącym, umieszczona jest tuleja z probówkami do pobierania materiału do badań (Rysunek 13). Dolna część rurki służącej do pobierania wydychanego powietrza jest rozszerzona, dzięki czemu kondensat nie jest porywany do góry przez prąd powietrza. Jako czynnika chłodzącego w tym urządzeniu można użyć suchego lodu, skroplonego powietrza, lodu lub wody. Urządzenie pozwala na pobieranie materiału od osób nieprzytomnych, również w warunkach polowych.



Rysunek 13. Schemat budowy urządzenia do pobierania próbek kondensatów wydychanego powietrza opracowanego przez pracowników Uniwersytetu Medycznego w Łodzi [52]

Pobieranie próbek EBC polega na oddychaniu w normalny sposób przez ustnik (10-15 min) z jednocześnie zatkany nosem. Ilość zebranego w tym czasie kondensatu może być różna, od 1 do 3 ml, w zależności od czasu pobierania próbki oraz od objętości płuc.

Wyniki badań nad zależnością pomiędzy objętością całkowitą wydychanego powietrza a objętością zebranego kondensatu (badania przeprowadzone zostały na grupie 20 zdrowych osób w przypadku, których brak udokumentowanych danych o występowaniu przewlekłych chorób układu oddechowego, z grupy tej wykluczono osoby zadeklarowane jako palące tytoń - w wieku powyżej 18 lat) wykazały, że średnia objętość powietrza wydychanego w czasie 15 minut wynosi od 112 do 125 l, a objętość uzyskanego z tego powietrza kondensatu wynosi średnio 1,8 ml (minimalna objętość zebranego kondensatu to 1,5 ml a maksymalna 2 ml). Wyniki analizy wariancyjnej dla trzech kolejnych próbek od tej samej osoby nie wykazują znaczących różnic w objętości zebranego kondensatu [53]. Pozwala to na wyznaczenie

bezpośredniej relacji pomiędzy objętością zebranego kondensatu a ilością całkowitą powietrza wydychanego. Korzysta się wtedy z następującej zależności (wzór 1):

$$Obj.EBC = 0,013 \cdot V_{p.w.} + 0.255 \quad (1)$$

gdzie:

Obj. EBC – objętość zebranego kondensatu [ml]

V_{p.w.} – objętość wydychanego powietrza [l]

Średnia wielkość cząsteczek aerozolu płynu, które odrywają się podczas oddychania jest rzędu 0,8 μm [54-56].

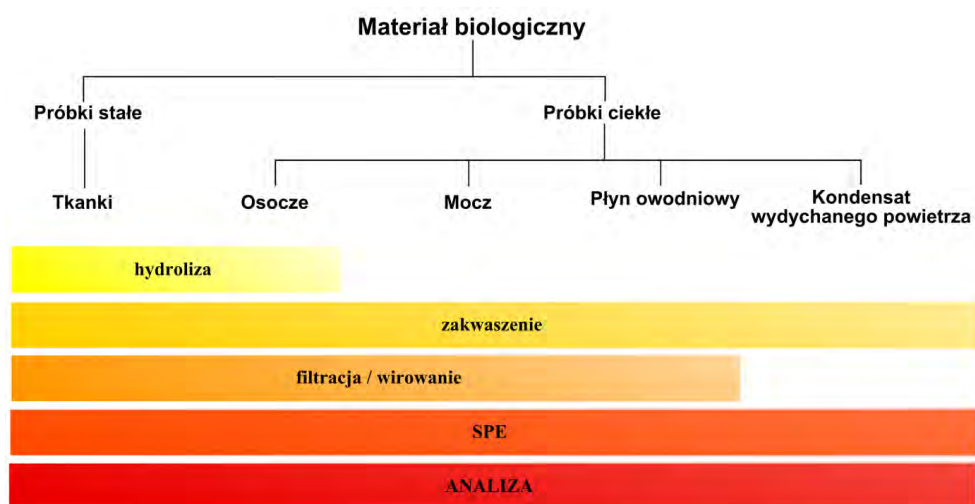
Zebrane próbki EBC powinny być natychmiast zamrożone (ok. -70°C). Przed etapem pobierania próbek kondensatów należy się upewnić, w jakim okresie czasu anality są stabilne. Jeżeli w zebranych próbkach mają być poszukiwane (oznaczane) różne typy biomarkerów oraz wykorzystywane będą do tego celu różne procedury analityczne to wskazane jest podzielenie próbki na części umieszczone w różnych naczyniach tak, aby uniknąć wielokrotnych cykli zamrażania-rozmrażania. Każdy taki cykl może, bowiem mieć wpływ na przyspieszenie procesu degradacji ważnych mediatorów takich jak prostaglandyny, leukotrieny czy H₂O₂.

3. Techniki izolacji biomarkerów z próbek biologicznych

Przygotowanie próbki do analizy jest krytycznym etapem w analizie substancji organicznych, ze względu na możliwość popełnienia wielu błędów, które będą skutkować zafałszowaniem wyników końcowych.

Zastosowanie rozmaitych zabiegów i operacji na etapie przygotowania próbki do analizy zapewnia możliwość przynajmniej częściowego rozwiązania problemów w nim występujących (Rysunek 14).

Optymalizacja procedury przygotowania próbki jest zasadniczym elementem wymaganym do osiągnięcia niskiej granicy wykrywalności i rzetelnych wyników analizy jakościowej i ilościowej. Szczegółowe informacje na temat przygotowania próbek w celu oznaczenia związków z grupy izoprostanów zostały zestawione w Tabeli 3.



Rysunek 14. Schemat toku postępowania analitycznego w celu oznaczenia izoprostanów w materiale biologicznym

W zależności od typu materiału biologicznego a także rodzaju techniki oznaczeń końcowych dokonuje się wyboru odpowiedniej techniki przygotowania próbek do analizy. Zauważyć można tendencję, iż próbki ciekłe najczęściej przygotowywane są z zastosowaniem techniki ekstrakcji do fazy stałej. Jednak można spotkać się też z wykorzystaniem chromatografii ciekłowej, jako etapem przygotowania próbek moczu i osocza, których ekstrakty następnie analizowane są za pomocą techniki chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas [57].

Używając techniki chromatografii ciekłowej sprzężonej ze spektrometrią mas lub tandemową spektrometrią mas (LC-MS, LC-MS/MS) procedura przygotowania próbki jest uproszczona, może obejmować jednokrotną ekstrakcję do fazy stałej, a anality nie muszą być przekształcane w odpowiednie lotne pochodne.

Tabela 3. Operacje stosowane podczas etapu przygotowania próbki do oznaczenia izoprostanów

Lp.	Typ materiału biologicznego	Operacje wchodzące w skład etapu przygotowania próbki	Technika analityczna	Literatura
1	Mocz Osocze	<ul style="list-style-type: none"> - mieszanie roztworów z wzorcem wewnętrznym - doprowadzenie do pH 3,3 przy pomocy 1 M HCl - ekstrakcja ciecz-ciecz - odparowanie warstwy organicznej, rozpuszczenie suchej pozostałości w 5% EtOH (pH 3) - ekstrakcja do fazy stałej (dyski ekstrakcyjne <i>Empore</i>) <ul style="list-style-type: none"> • Kondycjonowanie (MeOH + 1 mM HCl) • Przepłukiwanie złoża sorbentu (1 mM HCl + heptan) • Elucja (octan etylu + 1%MeOH) - odparowanie eluatu, rozpuszczenie w fazie ruchomej - filtracja (filtr 0,45µm) 	LC-MS	[58]

Tabela 3. c.d.

2	Mocz	<ul style="list-style-type: none"> - mieszanie próbki z wzorcem wewnętrznym (8-iso-PGF_{2α}-d₄) - zakwaszenie do pH 2,5 przy pomocy 6 M HCl - ekstrakcja eterem dietylowym - płukanie warstwy eterowej zakwaszonym roztworem wodnym - odparowanie warstwy organicznej, rozpuszczenie suchej pozostałości w wodzie (50 μl) - filtracja (filtr 0,5 μm) 	LC-MS	[18]
3	Mocz	<ul style="list-style-type: none"> - wirowanie zmrożonych próbek przez 3 min (8000 obr/min) w celu osadzenia białek - analiza płynu z nad osadu 	LC-MS	[20]
4	Mocz	<ul style="list-style-type: none"> - wirowanie przez 5 min (2500 obr/min) - dodatek wzorca wewnętrznego - wirowanie przez 5 min (13000 obr/min) 	LC-MS	[59]
5	Osocze	<ul style="list-style-type: none"> - mieszanie 0,5 ml próbki osocza z 1 ml wody, następnie z 1 ml roztworu wodorotlenku sodu (10 ml 50% NaOH, 10 ml H₂O, 100 ml MeOH) - kąpiel w łaźni wodnej przez 60 min w 37°C - zakwaszenie do pH 3 przy pomocy 3 N HCl - dodatek wzorca wewnętrznego - do analizy ArA: dwukrotna ekstrakcja heksanem, odparowanie do sucha, rozpuszczenie w eluencie do HPLC-MS/MS (MeOH + 0,1% FA) - do analizy 15-PGF: odrzucenie ekstraktu heksanowego, trzykrotna ekstrakcja warstwy wodnej za pomocą roztworu octanu etylu:heksanu (3:1), odparowanie, rozpuszczenie w octanie etylu (25 μl), MeOH + 0,1% FA (200 μl) 	LC-MS	[60]
6	Osocze	<ul style="list-style-type: none"> - próbki krwi zbierane do fiolek zawierających indometacynę (inhibitor cyklooksigenazy COX, uczestniczącej w syntezie prostaglandyn) - wirowanie- oddzielenie osocza- 1500 obr/min przez 10 min - mieszanie z wzorcem wewnętrznym - hydroliza próbki przy użyciu 1M NaOH - inkubacja w 37°C przez 30 min, ochłodzenie próbki - mieszanie z metanolem, HCl i kwasem mrówkowym (20 mM, pH 4,5) - ekstrakcja do fazy stałej SPE (kolumnienki Oasis) <ul style="list-style-type: none"> • Kondycjonowanie (2 ml MeOH + 2 ml 20mM FA pH 4,5) • Przepłukiwanie złoża sorbentu – 2 ml 2% NH₄OH + 2 ml MeOH: 20mM HCOOH pH 4,5 (4:6, obj/obj) • Elucja - 1,6 ml heksanu:EtOH:CH₃COOH (70:29,4:0,6) - odparowanie do sucha - derywatyzacja przy użyciu 15μl DIPEA i 30 μl PFBBR i suszenie - rozpuszczenie próbki w 70 μl izooktanu 	GC-MS	[61]
7	Osocze	<ul style="list-style-type: none"> - do zebrana krwi pępowinowej dodawano 0,005% EDTA - wirowanie przy 1500 obr/min przez 10 min - osocze przechowywane w temperaturze -80°C - rozcieńczenie próbki osocza w buforze fosforowym (0,1 M, pH 7,4) 1:5 - mieszanie próbki przez 1h ze złożem charakteryzującym się powinowactwem do izoprostanów - ekstrakcja 15-F_{2t}-IsoP na mini-kolumnach, wymywanie 500 μl 95% etanolem - odparowanie do sucha, rozpuszczenie próbki w 120 μl buforu fosforowego 	EIA	[62]
8	Płyn owodniowy	<ul style="list-style-type: none"> - zebrany płyn owodniowy zabezpieczono przed utlenianiem BHT - próbki wirowano przy 1000 obr/min, płyn z nad osadu przechowywano w -80°C - ekstrakcja do fazy stałej na kolumnkach C-18 Sep-Pak 	CEIA	[63]
9	Tkanki	<ul style="list-style-type: none"> - próbki tkanki umieszcza się w roztworze Folch'a (chloroform/metanol 2:1 obj/obj) - homogenizacja przez 60s - dodatek 4 ml NaCl, wirowanie przy 800 obr/min przez 10 min - oddzielenie warstwy organicznej, odparowanie do sucha 	GC-MS	[64]

Tabela 3. c.d.

- hydroliza (inkubacja w 37°C przez 30 min w roztworze 4 ml MeOH z 0,005% BHT i 4 ml KOH 15%)
- zakwaszenie do pH 3,0 1M HCl
- rozcieńczenie próbki w 80 ml H₂O (pH 3)
- dodanie wzorca wewnętrznego 15-F_{2t}-IsoP
- ekstrakcja do fazy stałej na kolumnie C-18 Sep-Pak
 - Wymywanie izoprostanów 10 ml roztworu octanu etylu/heptanu 1:1
- dodatek 4 g Na₂SO₄ w celu usunięcia resztek wody
- ekstrakcja do fazy stałej na kolumnie C-18 Sep-Pak
 - Wymywanie izoprostanów 10 ml roztworu octanu etylu/heptanu 1:1
- odparowanie do sucha
- derywatywacja –40 µl PFBB w ACN, 10 µl 10% DIPEA w ACN – 30 min
- odparowanie do sucha, rozpuszczenie suchej pozostałości w 50 µl MeOH
- rozdzielanie na płytkach do cienkowarstwowej chromatografii cieczowej TLC (faza ruchoma chloroform/etanol 93:7 obj/obj)
- zdrapanie krzemionki w obrębie estru metylowego PGF_{2α}
- wirowanie krzemionki w 1 ml octanu etylu przez 30 s
- odparowanie warstwy organicznej w strumieniu azotu
- dodatek 20 µl BSTFA i 6 µl DMF
- odparowanie w strumieniu azotu
- rozpuszczenie w 10 µl undekanu

4. Techniki wykorzystywane na etapie oznaczeń końcowych

Istnieje wiele możliwości przeprowadzenia oznaczeń końcowych biomarkerów w próbkach biologicznych. Wybór odpowiedniej techniki oznaczeń, która będzie odpowiednio czuła i selektywna, zależy głównie od badanej grupy związków.

W trakcie badań poziomu stężeń biomarkerów stresu oksydacyjnego w próbkach materiału biologicznego najczęściej wykorzystuje się techniki immunoanalityczne oraz chromatograficzne (Rysunek 15).



Rysunek 15 Schemat przedstawiający techniki analityczne wykorzystywane w celu oznaczenia izoprostanów w materiale biologicznym

Techniki immunoanalityczne (np. radioimmunoanaliza lub immunoanaliza enzymatyczna) oferują łatwość wykonania i niskie koszty. Jednakże wyniki uzyskane za pomocą tych technik

obrazują jedynie poziom stężeń, na jakim biomarkery występują w danej próbce. Zdarza się, że są one niemiernodajne ze względu na ryzyko wystąpienia reakcji krzyżowych.

Immunoanaliza

Technikę immunoanalizy enzymatycznej (EIA) wykorzystano do badań stężenia 8-izo-PGF_{2α} w próbkach osocza z krwi pępowinowej noworodków urodzonych naturalnie oraz poprzez cesarskie cięcie. Próbki były analizowane za pomocą zestawu do immunoanalizy enzymatycznej po oczyszczeniu z wykorzystaniem kolumniek ekstrakcyjnych (SPE) ze złożem charakteryzującym się powinowactwem do izoprostanów. Granica wykrywalności tej metodyki wynosi 2 pg/ml. Udział reakcji krzyżowych przeciwciała anti-8-izo-PGF_{2α} z innymi izoprostanami stanowił mniej niż 2%. Badania wykazały, iż stężenie izoprostanu 8-izo-PGF_{2α} jest większe u dzieci urodzonych drogą naturalną niż w wyniku cesarskiego cięcia [63].

Kolorymetryczną immunoanalizę enzymatyczną zastosowano do badań zawartości 8-izo-PGF_{2α} w płynie owodniowym pobranym od kobiet będących w 15 - 18 tygodniu ciąży. Uzyskana granica wykrywalności tej metodyki wyniosła 2 pg/ml. Występowanie stresu oksydacyjnego w rozwoju płodowym jest głównym wskaźnikiem ryzyka przedwczesnego porodu oraz uszkodzeń neurologicznych. Udowodniono, iż stężenie izoprostanów może być wskaźnikiem doświadczenia przez dzieci w stadium płodowym stresu oksydacyjnego, co ogranicza ich potencjał rozwojowy, w wyniku czego rodzą się one z mniejszą wagą [64].

Techniki chromatograficzne

Obserwowany od wielu lat rozwój technik chromatograficznych sprawia, iż to one są wiodącymi rozwiązaniami zapewniającymi rozdzielenie i identyfikację analitów występujących nawet na bardzo niskim (śladowym) poziomie.

Powszechnym i niezwykle efektywnym rozwiązaniem jest w chwili obecnej sprzężenie chromatografii gazowej ze spektrometrią mas. Spektrometr mas, jako detektor uniwersalny charakteryzuje się szerokim zakresem zastosowań i może być wykorzystywany do oznaczania analitów z różnych grup chemicznych, jakkolwiek rozwiązanie w postaci GC-MS stosowane jest zwykle do analizy zawartości lotnych związków (VOC) i/lub oznaczania substancji nielotnych po przeprowadzeniu derywatywacji analitów. Praco- i czasochłonność etapu przygotowania próbek do analizy to główne mankamenty tej techniki.

Zastosowanie techniki GC-MS

Czuła i specyficzna technika kapilarnej chromatografii cieczowej z jonizacją chemiczną i detektorem pracującym w trybie tworzenia jonów ujemnych (NICI) jest często wykorzystywana do oznaczeń końcowych izoprostanów w próbkach biologicznych. Derywatywacja kwasów karboksylowych, wykorzystywana przy wszystkich eikozanoidach, do estrów pentafluorobenzylowych jest koniecznym krokiem do uzyskania zadowalającej czułości. Rozdzielenia analitów najczęściej dokonuje się na kolumnach kapilarnych wykonanych ze stopionej krzemionki. Program temperaturowy zazwyczaj obejmuje temperatury od 190°C do 300°C. W opisaney w literaturze metodyce oznaczania izoprostanów wykorzystano 9 α ,11 β -PGF_{2 α} -d₇, jako wzorzec wewnętrzny. W okresie późniejszym najczęściej, jako wzorca wewnętrznego stosowano PGF_{2 α} -d₄.

Ze względu na występującą koelucję związków oraz straty analitów podczas czterech etapów oczyszczania próbki nie jest możliwe rozdzielenie 8-iso-PGF_{2 α} od pozostałych izomerów [35]. Zastosowanie chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas umożliwiło jedynie oznaczenie głównych klas izoprostanów [62].

Zastosowanie techniki GC-MS/MS

Bardzo przydatnym narzędziem, do oceny ilości powstających *in vivo* F₂-izoprostanów, jest technika chromatografii gazowej sprzężona z tandemową spektrometrią mas. Ta wysoce selektywna technika umożliwia rozdzielenie izoprostanów F₂ i klasycznie powstających prostanoidów. Redukcja tła w próbkach biologicznych poprawia analizę F₂-izoprostanów jednak, tak jak w przypadku GC-MS, nie jest możliwe całkowite rozdzielanie pików o takim samym stosunku masy do ładunku (*m/z*). Dzięki wprowadzeniu do etapu przygotowania próbki kroku oczyszczania (za pomocą HPLC) możliwe jest rozdzielenie 8-izo-PGF_{2 α} od jednego z prostanoidów, który ma taką samą masę cząsteczkową. Nie była jednak możliwa identyfikacja tego składnika z powodu braku odpowiedniego wzorca [65,66].

Zastosowanie techniki LC-MS/MS

Technika chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas i tandemową spektrometrią mas stała się w ciągu ostatnich kilku lat wiodącym narzędziem w wielu laboratoriach analitycznych. Połączenie LC-MS i LC-MS/MS daje możliwość rozdzielania i oznaczania polarnych i niepolarnych substancji średnio- i trudnoletnych, występujących w badanych próbkach w niewielkich stężeniach, a także – co jest niezwykle ważne z medycznego i chemicznego punktu widzenia – związków łatwo ulegających rozkładowi

termicznemu (substancje naturalne, leki, metabolity, białka) i izomerów, a w tym diastereoizomerów.

Najczęściej stosowaną metodą jonizacji jest rozpylanie cieczy w polu elektrycznym (ESI). Jest to łagodna jonizacja niepowodująca fragmentacji badanych cząsteczek. W technice tandemowej spektrometrii mas w celu wywołania wtórnej fragmentacji w drugim MS stosuje się przeważnie metodę wzbudzania jonów przez kolizje (CID). Rozdzielenie jonów wg wartości stosunku m/z prowadzi się najczęściej z zastosowaniem analizatora kwadropolowego. Układ LC-MS i LC-MS/MS pracować może w trybie tworzenia jonów dodatnio lub ujemnie naładowanych. Identyfikację i oznaczanie ilościowe analitów i ich metabolitów prowadzi się przeważnie w systemie monitorowania wybranych reakcji tworzenia jonów (pseudo)molekularnych (MRM). Technika LC w połączeniu ze spektrometrią mas jest czułym i specyficznym narzędziem wykorzystywanym też do potwierdzenia wyników uzyskanych podczas analiz immunoenzymatycznych. Wprowadzenie do praktyki analitycznej chromatografii ciekowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas (LC-MS/MS) pozwoliło na „wirtualne rozdzielanie” substancji o bardzo zbliżonych właściwościach fizykochemicznych lub strukturze takich jak izoprostan. LC-MS/MS pozwala na ilościowe oznaczenie pojedynczego izomeru z grupy izoprostanów już w próbce o objętości 1 ml [35].

Technika LC-MS/MS jest wykorzystywana powszechnie w analizie obecności izoprostanów w moczu i innych płynach ustrojowych. Analizę z wykorzystaniem LC-MS/MS można wykonać stosując zestaw pomiarowy pracujący w dwóch trybach:

- przemiatając całe widmo (full-scan) by dokonać analizy jakościowej,
- monitorowania wybranej reakcji (MRM), czyli monitorowania wybranych jonów do analizy ilościowej.

Zastosowanie kolumny z wypełnieniem z porowatego grafitu ułatwia rozdzielanie diastereoizomerów, jakimi są izoprostan. Związki jonowe mogą być rozdzielone w przypadku zastosowania fazy ruchomej o dużym pH i dużej zawartości rozpuszczalników organicznych, bez konieczności dodatku odczynnika do tworzenia par jonowych, co umożliwi osiągnięcie niskich wartości granicy wykrywalności techniki ESI-MS na etapie detekcji. Technika analityczna LC-MS/MS jest odpowiednia do szybkiego i powtarzalnego oznaczania izoprostanów w próbkach charakteryzujących się złożonym składem matrycy, jakimi są: mocz, osocze lub płyn owodniowy [18].

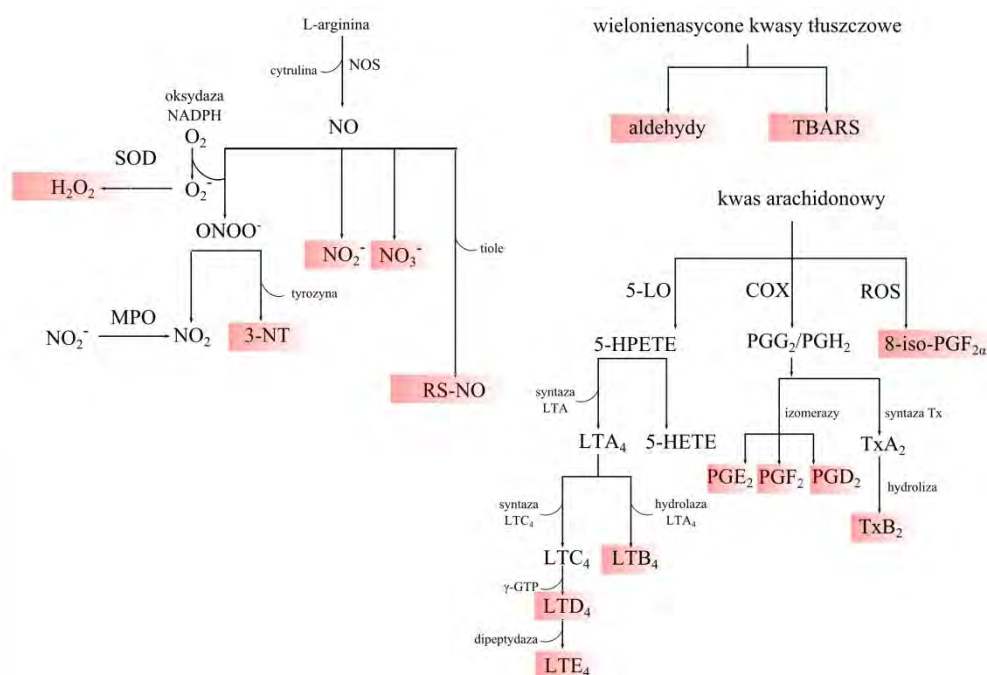
Poniżej przedstawiono literaturowe przykłady wykorzystania omówionych technik do oznaczania izoprostanów w próbkach biologicznych charakteryzujących się skomplikowanym składem matrycy.

Tabela 4. Informacje literaturowe o warunkach prowadzenia procesu oznaczania izoprostanów i prostaglandyn w próbkach materiału biologicznego z wykorzystaniem techniki GC-MS, LC-MS i LC-MS/MS

GC-MS					
Typ próbki	Anality – Monitorowane jony		Kolumna i gaz nośny	Program temperaturowy	Literatura
Osocze	8-iso-PGF _{2α}	569,3	-kolumna kapilarna Agilent Technologies (30 m×0.2 mm) -wypełnienie fenylometylo-polisiloksanowe (grubość warstwy 0,3μm) - hel (natężenie przepływu 1ml/min)	0-2 min - 170°C	[57]
	8-iso-PGF _{2α} -d ₄	573,3		2-9 min - 170-275°C	
	iPF _{2α} -V	569,3		9-20 min - 275°C	
	iPF _{2α} -VI-d ₄	573,3		20-21min-275-300°C	
	iPF _{2α} -IV-d ₄	573,3		21-24 min – 300°C	
LC-MS i LC-MS/MS					
Typ próbki	Anality – Monitorowane jony		Kolumna	Eluenty i program elucji	Literatura
Mocz	8-iso-PGF _{2α}	typ III 353→193	kolumna z grafitu porowatego (150×0,3mm, 3μm, 120Å)	A: H ₂ O + 0,5% NH ₃ (pH 9,5) B: ACN:MeOH (4:6) + 0,5% NH ₃ - natężenie przepływu 50μl/min - elucja gradientowa: 0-20 min - 50%-0% A 20-25 min – 0% A	[18]
	8-iso-15(R)PGF _{2α}	typ IV 353→127			
	8-iso-PGF _{2β}	typ V 353→151			
	PGF _{2α}	typ VI 353→115			
	8-iso-PGF _{2α} -d ₄	typ III 357→197			
Mocz	8-iso- PGF _{2α}	353→193	kolumna YMC ODS-AQ (50×2,0 mm, 3 μm)	A: metanol: acetonitryl (5:95) B: 2 mM octan amonu - elucja gradientowa: 0-6 min – 15%-70% A 6-8 min – 100% A 8-9 min – 100%-15% A natężenie przepływu - 0,2ml/min	[20]
	8-iso- PGF _{2α} -d ₄	357→197			
Osocze	8-iso- PGF _{2α}	353	kolumna Symmetry C ₈ (150×3mm, 3,5 μm)	A: 0,1% CH ₃ COOH (pH 3) B: ACN - elucja izokratyczna A:B (7:3)	[58]
Mocz	8-iso- PGF _{2α} -d ₄	357			
Mocz	8-iso- PGF _{2α}	353→193	kolumna Phenomenex Gemini C 18 (50×2,0 mm, 3 μm, 110Å)	A: 0,1% NH ₄ OH w H ₂ O B: 0,1% NH ₄ OH w ACN - elucja gradientowa: 0-6 min – 95%-80% A 6-7 min – 80% A 7-10 min – 80%-95% A	[59]
		8-iso- PGF _{2α} -d ₄		357→197	
Osocze	8-iso-PGF _{2α}	353→193	kolumny Synergi Hydro-RP (250×2mm, 4μm, 80Å)	A: H ₂ O + 0,01% CH ₃ COOH B: MeOH - elucja gradientowa: 0-0,5 min – 70% A 0,5-1,5 min – 70%-35% A 1,5-13,5 min – 35% A 13,5-18,5 min – 35%-30% A 18,5-19,5 min – 30%-0% A 19,5-32 min – 0% A	[60]
	8-iso-15(R)PGF _{2α}	353→193			
	11β-PGF _{2α}	353→193			
	15(R)-PGF _{2α}	353→193			
	PGF _{2α}	353→193			
	8-iso-PGF _{2α} -d ₄	357→197			

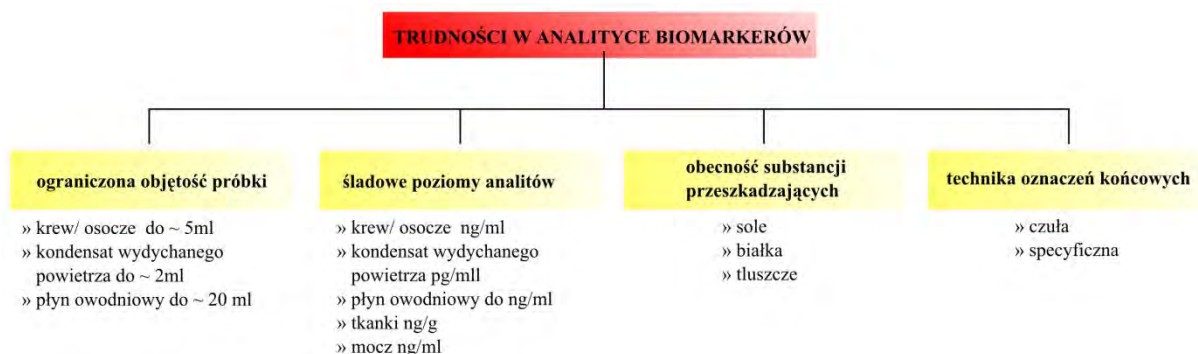
5. Problemy związane z oznaczaniem biomarkerów stresu oksydacyjnego

Zgodnie z definicją zaproponowaną przez ekspertów z Grupy Roboczej ds. Definicji Biomarkerów (ang. *Biomarkers Definition Working Group*) biomarker to charakterystyczna cecha biologiczna, którą można obiektywnie zmierzyć, wskaźnik prawidłowych procesów biologicznych, procesów patologicznych lub odpowiedzi farmakologicznej na interwencję terapeutyczną [68]. Biomarker powinien charakteryzować się specyficznością (pozwalając na odróżnienie chorób mu odpowiadających) a jego stężenie powinno być skorelowane pomiędzy różnymi próbkami biologicznymi. Na Rysunku 16 przedstawiono w sposób schematyczny informacje o szeregu biomarkerów oznaczanych w stanach zapalnych dróg oddechowych.



Rysunek 16. Biomarkery stanów zapalnych i/lub stresu oksydacyjnego oznaczane u zdrowych osób i/lub pacjentów ze stanem zapalnym dróg oddechowych (*COX*– cyklooksygenaza; *GSH*– glutation; *-GTP*– glutamylotransferaza; *H₂O₂*–nadtlenek wodoru; *5-HPETE*–5-hydroperoxyeicosatetraenoic acid; *8-iso-PGF_{2α}*–8-izoprostan; *5-LO*–5-lipoksygenaza; *LT*–leukotrien; *MPO*– mieloperoksydaza; *NADPH*– forma zredukowana dinukleotydu nikotynamidoadeninowego; *NO*– tlenek azotu; *NOS*– synteza tlenku azotu; *NO₂⁻*– azotyn; *NO₃⁻*– azotan; *3-NT*– 3-nitrotyrozyna; *O₂⁻*– jon nadtlenkowy; *ONOO⁻*– nadtlenoazotyn; *PG*– prostaglandyna; *ROS*– reaktywne formy tlenu; *RS-NO*– RS-nitrozotiole; *SOD*– dysmutaza nadtlenkowa; *TBARS*– związki reagujące z kwasem tiobarbiturowym; *Tx*– tromboksan)

Analiza danych literaturowych może być podstawą do wyróżnienia istotnych problemów i trudności związanych z analityką biomarkerów w próbkach materiału biologicznego (Rysunek 17).



Rysunek 17. Schemat przedstawiający trudności obecne w analityce biomarkerów

Próbki biologiczne, które mają być poddane analizie wymagają zwykle specjalnego przygotowania, jeżeli oznaczenia końcowe mają być źródłem rzetelnej informacji o stężeniu analitu. Oznaczanie biomarkerów w próbkach biologicznych wiąże się w większości przypadków z ograniczoną objętością dostępnej próbki oraz śladowymi poziomami analitów. Właściwości fizyko-chemiczne oznaczanych związków mogą różnić się diametralnie, a co za tym idzie czasami konieczne jest przygotowanie próbki kilkoma sposobami, co niekiedy jest niemożliwe w przypadku, gdy objętość próbki jest na poziomie μl .

W takim wypadku można rozcieńczyć próbkę w odpowiednim rozpuszczalniku, podzielić ją na porcje a następnie przygotować zgodnie z procedurami przygotowania próbki by usunąć obecne w niej zanieczyszczenia, a także wyizolować anality.

Istotnym problemem w analizie próbek biologicznych jest także obecność substancji przeszkadzających, które występują w próbce na poziomach znacznie przewyższających stężenia oznaczanych biomarkerów. Zanieczyszczenia i związki naturalnie występujące w próbce mogą powodować zakłócenia w analizie końcowej, np. maskować sygnał oznaczanych związków w wyniku intensywnego tła zanieczyszczeń lub powodować spadek sprawności układu chromatograficznego. Należy wtedy opracować metodę przygotowania próbki, która umożliwi izolację interesujących nas związków, oczyszczenie próbki i jeżeli to możliwe wzbogacenie analitów.

Do rzetelnego oznaczenia biomarkerów konieczny jest wybór odpowiedniej techniki analiz końcowych. Technika ta musi być czuła i specyficzna i posiadać odpowiednią siłę rozdzielczą. Testy immunoenzymatyczne charakteryzują się dużą specyficznością, jednak w niektórych przypadkach mogą dawać błędne lub zawyżone wyniki. Taki przypadek ma miejsce, gdy oznaczany jest 8-izo-PGF_{2 α} w próbkach kondensatów wydychanego powietrza z wykorzystaniem testów, które kalibrowane były na próbki o złożonym składzie matrycy. Otrzymywane wyniki są wówczas znacząco zawyżone w wyniku mniejszej ilości substancji

przeszkadzających w próbkach EBC niż np. w moczu lub krwi, które zazwyczaj maskują sygnał analitu. Niedostępne w analizie próbek o skomplikowanej matrycy są techniki chromatograficzne i elektroforetyczne, dzięki ogromnym możliwościom rozdzielania mieszanin wieloskładnikowych. Problemy takie jak koelucja lub identyfikacja nieznanymi składnikami zostały tu rozwiązane przez zastosowanie odpowiedniej techniki detekcji.

II CEL I ZAKRES PRACY

Współczesna medycyna maksymalizując wysiłki na rzecz przedłużenia życia pacjentów, nie ogranicza się jedynie do leczenia chorób, lecz stara się również uzyskać możliwie jak najbardziej wiarygodne wyniki diagnostyczne niezbędne do profilaktyki. Ostatnie kilkadziesiąt lat to okres znaczących postępów w medycynie. Przykładem tego może być rozwój badań nad zależnością związków obecnych w organizmie a etiologią chorób ogólnych. Obserwowany wzrost zainteresowania tym zagadnieniem wynika z odkrycia wielu czynników prognostycznych stanów chorobowych. Rozwój szybkich testów do oznaczania związków w warunkach szpitalnych umożliwi wczesną kwalifikację pacjentów, jednak w dalszym ciągu odczuwalny jest brak precyzyjnych markerów wielu schorzeń, które pomogłyby ocenić stopień zaawansowania choroby lub postępy leczenia.

Rozwój zaawansowanych technik analitycznych zapewnił możliwość wykrywania, identyfikacji i ilościowego oznaczenia biomarkerów występujących w śladowych a nawet ultra śladowych ilościach. Nowe techniki przygotowania próbek pozwalają na izolację coraz większej ilości analitów z próbek materiału biologicznego, charakteryzującego się złożonym składem matrycy. Dlatego też na całym świecie w środowiskach naukowych badania ukierunkowane są na odkrycia nowych, specyficznych biomarkerów, których oznaczenie przyniosłoby jak najwięcej informacji na temat ujawniającego się stanu chorobowego.

Analiza danych literaturowych prowadzi do wniosku, że dostępne procedury analityczne charakteryzują się wysoką granicą oznaczalności, małą selektywnością a także ograniczoną ilością oznaczanych biomarkerów. Dlatego też, aby zrealizować zaplanowany program badań próbek EBC i osocza konieczne jest opracowanie i optymalizacja metodyk analitycznych umożliwiających oznaczenie czterech związków z grupy izoprostanów, 3-nitrotyrozyny oraz dwudziestu aminokwasów z wykorzystaniem chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas. Izoprostany i 3-nitrotyrozyna uważane są za wiarygodne markery stresu oksydacyjnego natomiast aminokwasy zostały włączone do badań ze względu na możliwość monitorowania zmian ich zawartości w próbkach EBC w trakcie

chorób płuc, co w przyszłości może doprowadzić do rozpatrywania ich jako biomarkerów stanów zapalnych dróg oddechowych.

Opracowane metodyki powinny charakteryzować się odpowiednimi parametrami metrologicznymi, a przede wszystkim niskimi wartościami granicy oznaczalności (ze względu na niskie poziomy stężenie analitów w próbkach biologicznych), precyzją, powtarzalnością i odtwarzalnością by uzyskane wyniki były wiarygodne i zawierały jak największą ilość informacji.

Metodyki te będą następnie wykorzystywane, jako narzędzia analityczne do oznaczenia wyżej wymienionych związków w próbkach kondensatów wydychanego powietrza i osocza. Próbki EBC są pobierane od ludzi w sposób nieinwazyjny i charakteryzują się mało skomplikowanym składem matrycy przy jednocześnie dużej ilości związków uwalnianych z dróg oddechowych, specyficznych dla stanu układu oddechowego w momencie ich pobierania. Analiza próbek osocza ma na celu obserwację zmian poziomów stężeń biomarkerów stresu oksydacyjnego wywołanego przez ogólnoustrojowe zaburzenie równowagi oksydacyjno-antyoksydacyjnej.

Kolejne etapy opracowywania metodyk oznaczania biomarkerów stresu oksydacyjnego obejmować będą:

- opracowanie procedur przygotowania próbek EBC i osocza do analizy,
- wewnątrzlaboratoryjną walidację metodyk analitycznych,
- badania przesiewowe wśród studentów Politechniki Gdańskiej jak i pacjentów Instytutu Medycyny Hiperbarycznej w Gdyni.

Ponadto przeprowadzone będą badania stabilności związków z grupy izoprostanów w próbkach roztworów wzorcowych oraz w próbkach kondensatów wydychanego powietrza podczas ich przechowywania w różnych warunkach w dłuższym okresie czasu.

III CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

1. Odczynniki i wzorce

Podczas realizacji części doświadczalnej zastosowano następujące odczynniki i wzorce:

❖ Odczynniki

- * Metanol do HPLC - firma *Chempur* (Polska)
- * Metanol do LC-MS - firma *J.T. Baker* (Holandia)
- * Metanol do cz.d.a.- firma *POCH* (Polska)
- * Acetonitryl do LC-MS - firma *J.T. Baker* (Holandia)
- * Acetonitryl do HPLC – firma *Chempur* (Polska)
- * Aceton (cz.d.a.) – firma *Chempur* (Polska)
- * Amoniak (cz.d.a.) – firma *Chempur* (Polska)
- * Tetrahydrofuran do LC-MS - firma *J.T. Baker* (Holandia)
- * Octan etylu – firma *Sigma-Aldrich* (Niemcy)
- * Kwas octowy do LC-MS 98% - firma *Fluka* (Belgia)
- * Kwas mrówkowy do LC-MS 98% - firma *Fluka* (Belgia)
- * Kwas chlorowodorowy TraceSelect $\geq 37\%$ - firma *Fluka* (Belgia)

❖ Wzorce

- * 8-iso-PGF_{2α} – firma *Cayman Chemical* – dystrybutor SPI-Bio (Francja)
- * 8-iso-15(R)-PGF_{2α} - firma *Cayman Chemical* – dystrybutor SPI-Bio (Francja)
- * 15(R)- PGF_{2α} - firma *Cayman Chemical* – dystrybutor SPI-Bio (Francja)
- * 11β- PGF_{2α} - firma *Cayman Chemical* – dystrybutor SPI-Bio (Francja)
- * 8-iso-PGF_{2α}-d₄ – firma *Cayman Chemical* – dystrybutor SPI-Bio (Francja)
- * 3-nitrotyrozyna - firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)
- * L-alanina- firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)
- * Chlorowodorek L-argininy - firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)
- * L-asparagina- firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)
- * Kwas L-asparaginowy- firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)
- * Chlorowodorek L-cysteiny- firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)
- * Kwas L-glutaminowy- firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)

- * L-glutamina- firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)
- * Glicyna- firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)
- * Chlorowodorek L-histydyny- firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)
- * trans-4-hydroksy-L-prolina- firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)
- * L-leucyna- firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)
- * Chlorowodorek L-lizyny- firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)
- * L-metionina- firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)
- * L-fenyloalanina- firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)
- * L-prolina- firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)
- * L-seryna- firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)
- * L-treonina- firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)
- * L-tryptofan- firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)
- * L-tyrozyna- firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)
- * L-walina- firma *Sigma Aldrich* (Niemcy)

2. Aparatura

Podczas prowadzenia badań wykorzystano następujące urządzenia i sprzęt laboratoryjny:

- * Chromatograf cieczowy firmy *Agilent* seria 1200 wyposażony w:
 - pompę G1312A
 - termostat kolumny G1316C
 - automatyczny podajnik próbek G1367B
 - detektor tandemowy spektrometr mass z analizatorem typu potrójny kwadrupol/liniowa pułapka jonowa 4000 Q TRAP® LC/MS/MS, *AB Sciex Instruments* (Niemcy)
 - detektor spektrofotometryczny typu UV G1314B *Agilent Technologies* (USA)
- * Kolumny chromatograficzne:
 - Zorbax XDB-C18 (100 mm 4,6 mm x 3,5 μm) - firma *Agilent Technologies* (USA)

- Zorbax Extend C-18 (50 mm x 2,1 mm x 1,8 μm) - firma *Agilent Technologies* (USA)
 - Kinetex RP C18 (100 mm x 4,6 mm x 2,6 μm) - firma *Phenomenex* (Niemcy)
 - Lihrospher RP 18e (250 mm x 4 mm x 5 μm) - firma *Merck* (Niemcy)
 - Supelcosil LC-NH₂ (150 mm x 3 mm x 3 μm) – firma *Supelco* (USA)
 - Ascentis Si (150 mm x 2,1 mm x 5 μm) – firma *Supelco* (USA)
 - Kinetex PFP (150 mm x 2,1 mm x 2,6 μm) – firma *Phenomenex* (Niemcy)
- * Urządzenie do zbierania kondensatów wydychanego powietrza – firma *TurboDeccs* (Włochy)
 - * Liofilizator Freezone 2,5 l – firma *Labconco* (USA)
 - * Urządzenie z łaźnią wodną, do odparowania próbek w strumieniu azotu - TurboVap LV - firma *Caliper LifeSciences* (USA)
 - * Dejonizator wody HLP 5 - firma *Hydrolaz Polska* (Polska)
 - * Łaźnia ultradźwiękowa – firma *Bandelin Sonorex* (Niemcy)
 - * Waga analityczna XP50H – firma *Mettler Toledo* (Szwajcaria)
 - * Pipeta elektroniczna Handy Step - firma *Brand* (Niemcy)
 - * Automatyczna pipeta Eppendorf (10, 100, 1000, 2500 μl) - firma *Eppendorf* (Niemcy)
 - * pH-metr CI-316– firma *Elmetron* (Polska)
 - * Fiolki do automatycznego podajnika próbek, o objętości 1,5 ml, z membranami uszczelniającymi wykonanymi z politetrafluoroetyleny (PTFE) oraz nakrętkami z tworzywa sztucznego – firma *Sigma-Aldrich* (Niemcy)
 - * Komora do wykonywania ekstrakcji za pomocą techniki SPE– firma *Grace* (USA)
 - * Kolumnienki do SPE:
 - *Oasis HLB* 1 ml/10 mg - firma *Waters* (USA)
 - *Speedisk H₂O-Phobic DVB* 3 ml/50 mg - firma *J.T. Baker* (Holandia)
 - *Speedisk C18* 3 ml/50 mg - firma *J.T. Baker* (Holandia)
 - *Chromabond C18* 3 ml/200 mg - firma *Macherey-Nagel* (Niemcy)
 - * Szklane butelki o objętości 250 ml wykonane ze szkła przezroczystego całkowicie przepuszczalnego dla promieniowania UV - firma *Schott Glass* (Niemcy)
 - * Cylindry o objętości 50, 250, 500 ml - firma *LABART* (Polska)

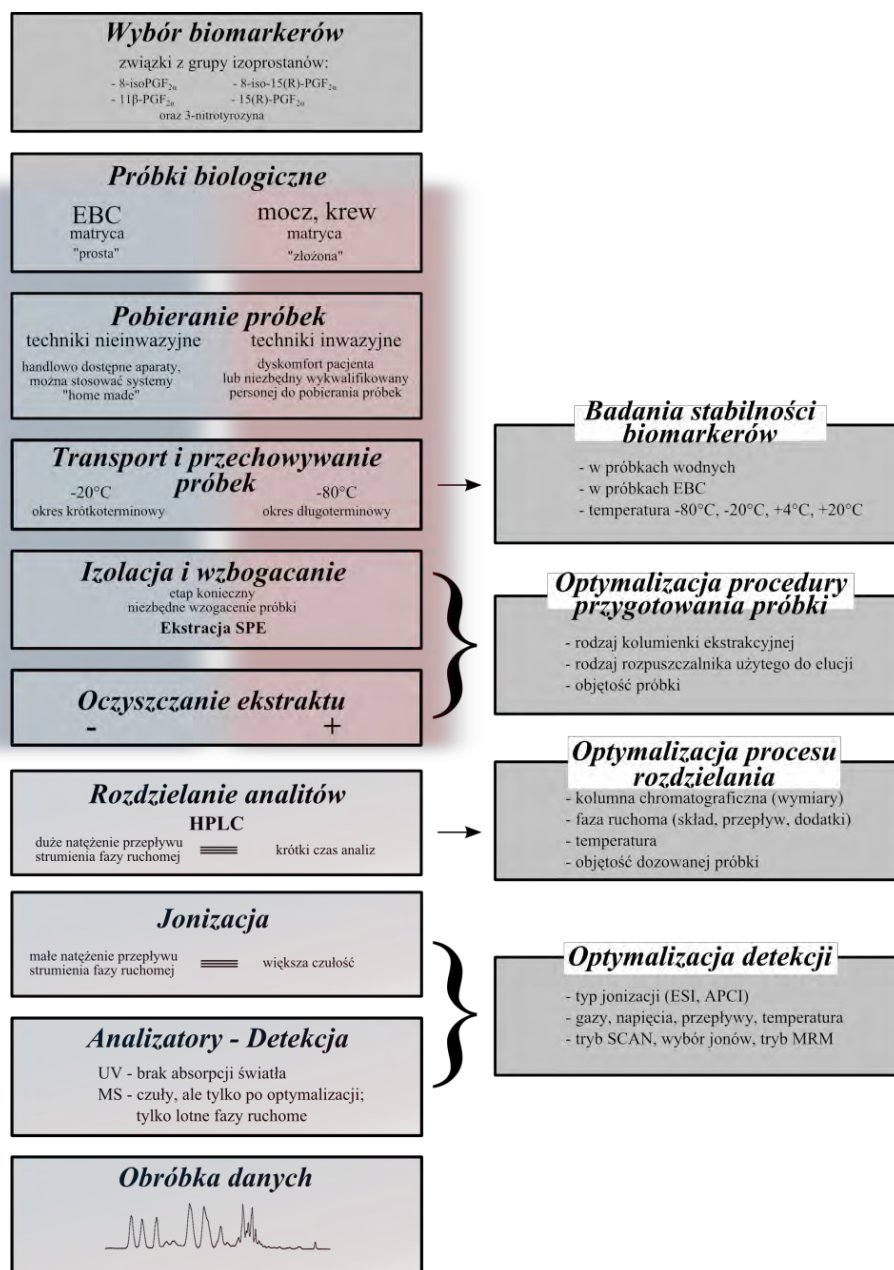
3. Optymalizacja metodyki oznaczania biomarkerów stresu oksydacyjnego

Procedura oznaczania biomarkerów stresu oksydacyjnego składa się z kilku etapów, które należy dokładnie optymalizować z uwzględnieniem praw specyficznych dla każdego etapu oddzielnie i nie zawsze wzajemnie współpracujących. Złożoność i wzajemne wykluczanie się wymagań stawianych poszczególnym elementom optymalizowanym w trakcie opracowywania metodyk analitycznych umożliwiających oznaczanie śladowych ilości substancji w próbkach biologicznych pokazano na Rysunku 17.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej podjęto próbę opracowania metodyki oznaczania związków z grupy izoprostanów i 3-nitrotyrozyny, które to związki są biomarkerami stresu oksydacyjnego, w próbkach materiału biologicznego. Na podstawie dostępnych danych literaturowych, jako technikę oznaczeń końcowych wybrano technikę chromatografii cieczowej w połączeniu z tandemową spektrometrią mas. Zastosowanie tej techniki umożliwi identyfikację i oznaczenie związków występujących nawet na śladowych poziomach stężeń. Jednak należy zauważyć, iż połączenie technik HPLC i MS/MS wymaga kompromisu na etapie optymalizacji parametrów pracy spektrometru mas i warunków prowadzenia procesu chromatograficznego.

Kolejnym etapem jest optymalizacja procedury przygotowania próbek biologicznych. Niewielka objętość próbek osocza i EBC oraz stężenia analitów na poziomie pg/ml (EBC) i ng/ml (osocze) wymuszają konieczność zastosowania techniki wzbogacania próbek. Dla próbek kondensatów wydychanego powietrza i osocza sprawdzono przydatność zastosowania techniki ekstrakcji do fazy stałej. Ze względu na stosunkowo prosty skład matrycy próbek EBC zbadano również możliwość wykorzystania procesu liofilizacji.

Należy również podkreślić fakt, iż optymalizacji kroków pokazanych na Rysunku 18 nie dokonuje się zgodnie ze schematem, ale począwszy od optymalizacji detekcji, a kończąc na optymalizacji sposobu przechowywania próbek, izolacji analitów i wzbogacania próbek. W związku z tym w następnych punktach niniejszej pracy doktorskiej opisane zostaną poszczególne kroki etapu optymalizacji procedury oznaczania biomarkerów stresu oksydacyjnego w kolejności ich wykonywania.



Rysunek 18. Schemat postępowania w trakcie optymalizacji kolejnych etapów metodyk analitycznych do oznaczania biomarkerów stresu oksydacyjnego w próbkach biologicznych

3.1. Przygotowanie roztworów wzorcowych

Wzorce związków z grupy izoprostanów 8-iso-15(R)-prostaglandin F_{2α}, (8-iso-15(R)-PGF_{2α}), 8-iso prostaglandin F_{2α} (8-iso-PGF_{2α}), 11β-prostaglandin F_{2α} (11β-PGF_{2α}), 15(R)-prostaglandin F_{2α} (15(R)-PGF_{2α}), 3-nitrotyrozyny(3-NT) oraz aminokwasów zakupione w formie stałej odważono do kolb miarowych i rozpuszczono w roztworze metanolu (izoprostan) lub mieszaninie metanol-woda (1:1) (3-NT, aminokwasy). Tak przygotowane roztwory podstawowe o stężeniu około 1mg/ml przechowywane były w temperaturze -20°C.

3.2. Dobór optymalnej techniki jonizacji analitów

Spektrometria mas zyskała w ostatnich 20 latach wielkie zainteresowanie w analityce ze względu na swoje unikalne właściwości jak wysoka czułość i selektywność. Aby przeprowadzić analizę przy użyciu tego rodzaju detekcji niezbędne jest, aby anality występowały w fazie gazowej, w postaci jonów. Najczęściej wykorzystywana w tej technice jonizacja pod ciśnieniem atmosferycznym (API) może być wykonana na dwa sposoby: poprzez jonizację chemiczną pod ciśnieniem atmosferycznym (APCI) i elektrorozpylanie (ESI). Technika APCI jest odpowiednia dla substancji charakteryzujących się małymi masami cząsteczkowymi i małą polarnością (lotnych i termostabilnych), natomiast ESI dla substancji o różnej polarności i dużych cząsteczek biologicznych.

Tabela 5. Porównanie przydatności techniki jonizacji oraz trybów jonizacji do identyfikacji i oznaczania wybranych biomarkerów stresu oksydacyjnego

Typ jonizacji	Izoprostany	3-nitrotyrozyna	Aminokwasy
APCI (+)	-	±	±
APCI (-)	±	-	-
ESI (+)	-	+	+
ESI (-)	+	-	±

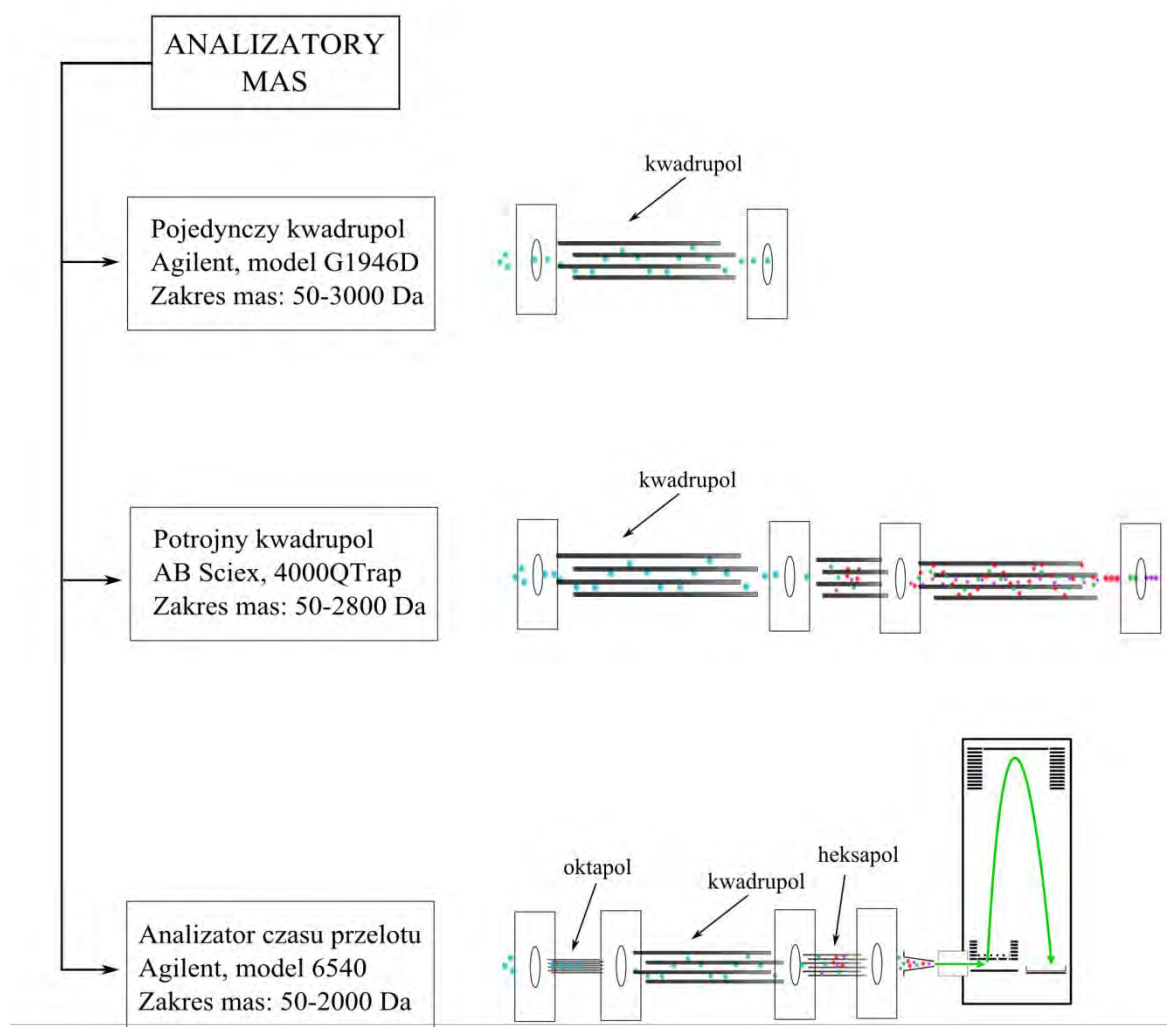
+ sygnał pozytywny - brak sygnału ± sygnał pozytywny, czułość śladowa

Podczas prowadzonych badań nad optymalizacją techniki jonizacji analitów spektrometr pracował w trybie przemiatacia całego widma (SCAN) od 50 do 1000 Daltonów, w którym czułość detektora MS jest niewielka. Dla wszystkich oznaczanych związków stosując technikę jonizacji ESI uzyskano sygnał jonów (pseudo)molekularnych o większej intensywności niż w przypadku wykorzystania techniki APCI (Tabela 5). Stosując tryb tworzenia jonów ujemnych w przypadku związków z grupy izoprostanów otrzymano intensywny sygnał, który umożliwił identyfikację związków. Natomiast w przypadku aminokwasów i 3-nitrotyrozyny największą intensywność jonów (pseudo)molekularnych obserwowano w trybie tworzenia jonów dodatnich.

3.3 Dobór optymalnego układu detekcji

Po wytworzeniu jonów w komorze jonizacyjnej należy je rozdzielić w zależności od wartości liczbowej stosunku masy do ładunku (m/z). Podobnie jak duża jest różnorodność źródeł jonów, tak wiele jest różnych typów analizatorów (pojedynczy kwadrupol, potrójny kwadrupol, analizator czasu przelotu).

W trakcie realizacji programu badawczego pracy doktorskiej wykorzystano trzy różne analizatory mas (Rysunek 19).



Rysunek 19. Analizatory mas wykorzystywane w trakcie optymalizacji układu detekcji biomarkerów stresu oksydacyjnego

Dobór optymalnego układu detekcji do oznaczania śladowych ilości biomarkerów stresu oksydacyjnego polegał na porównaniu zdolności rozdzielczej, dokładności oraz czułości analizatorów mas. W tym celu analizie MS z zastosowaniem pojedynczego kwadrupola, potrójnego kwadrupola oraz analizatora czasu przelotu poddano próbki roztworów wzorcowych związków wybranych do badań. Uzyskane wyniki zestawiono w Tabeli 6.

Tabela 6. Porównanie charakterystyki analizatorów mas wykorzystywanych na etapie optymalizacji układu detekcji wraz z podstawowymi parametrami opisującymi ten układ.

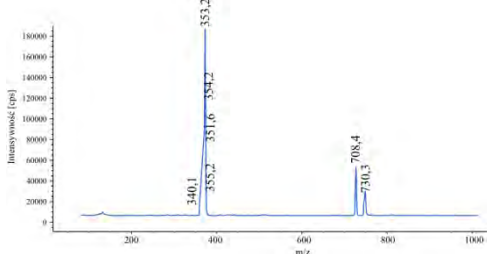
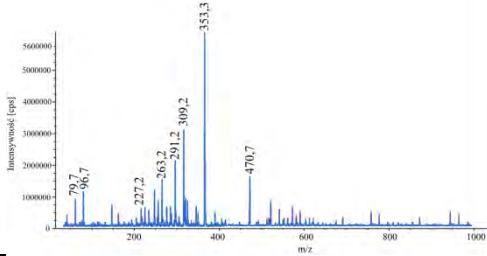
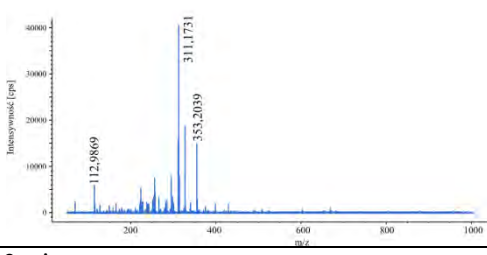
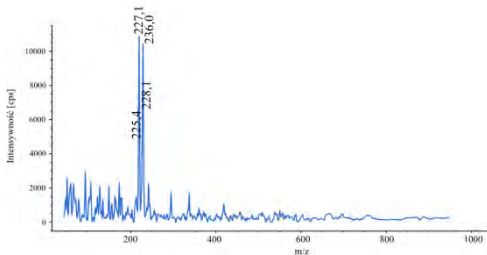
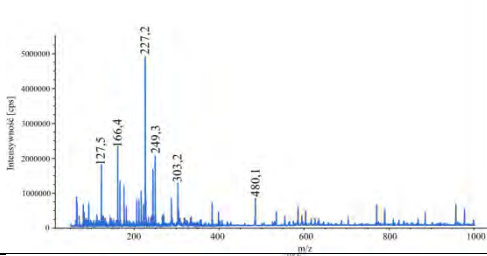
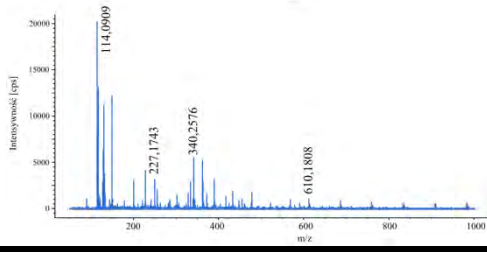
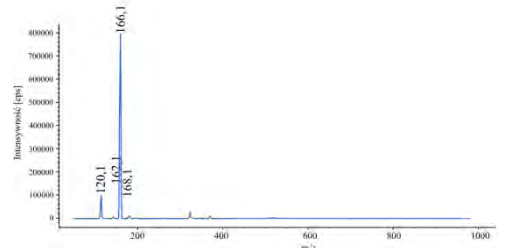
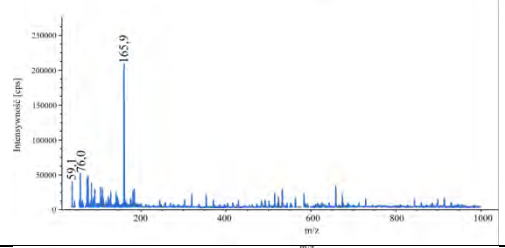
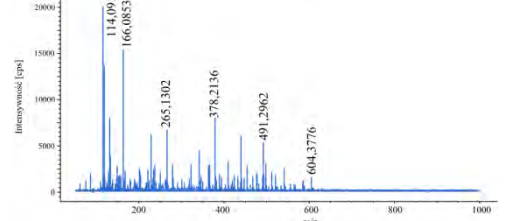
Analizator	Widmo MS w trybie <i>scan</i>	Uzyskana rozdzielczość R (FWHM)*	Uzyskana dokładność Δppm	Uzyskana czułość S/N
Izoprostany				
Pojedynczy kwadrupol (MS)		54,4	94 ppm	180
Potrójny kwadrupol (MS/MS)		680	64 ppm	560000
Analizator czasu przelotu (Q-ToF)		10511	8,3 ppm	2000
3-nitrotyrozyna				
Pojedynczy kwadrupol (MS)		45,4	149 ppm	110
Potrójny kwadrupol (MS/MS)		543	126 ppm	500000
Analizator czasu przelotu (Q-ToF)		10666	4,1 ppm	350

Tabela 6. c.d.

Aminokwasy (na przykładzie feniloalaniny)				
Pojedynczy kwadrupol (MS)		34,8	82 ppm	800
Potrójny kwadrupol (MS/MS)		752	473 ppm	25000
Analizator czasu przelotu (Q-ToF)		7415	5,0 ppm	800

*Rozdzielczość $R = \frac{m}{\Delta m}$

Analiza danych zestawionych w Tabeli 6 prowadzi do wniosku, iż niemożliwa jest analiza związków z grupy izoprostanów z wykorzystaniem analizatora w postaci pojedynczego kwadrupola z powodu uzyskiwanej niewystarczającej czułości. Śladowe zawartości izoprostanów w próbkach biologicznych wymagają do badań zastosowania analizatorów takich jak potrójny kwadrupol lub analizator czasu przelotu. Ze względu na wyjątkową czułość tandemowego spektrometru mas oraz możliwość jej zwiększenia poprzez podwójne filtrowanie sygnału poprzez pracę w trybie MRM to ten typ detekcji został wybrany do oznaczeń ilościowych biomarkerów w próbkach biologicznych.

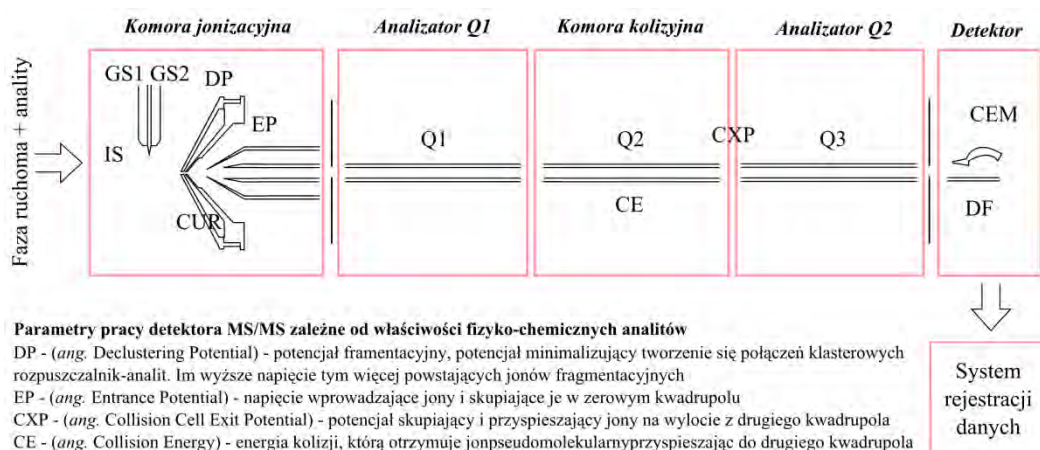
Optymalizacja warunków pracy tandemowego spektrometru mas

Tandemowy spektrometr mas posiada trzy kwadrupole, które pełnią różną rolę. Kwadrupol oznaczony symbolem Q1 działa na zasadzie filtru mas pracującego w trybie *scan* (tryb używany najczęściej przy analizie jakościowej) i służy do rozdzielania jonów o różnym stosunku masy do ładunku (m/z) lub w trybie *sim* monitoruje obecność wybranego jonu. W kwadrupolu Q2 wybrane wcześniej, na podstawie widma uzyskanego z kwadrupola Q1

jony, ulegają fragmentacji. W ostatnim kwadrupolu Q3, który tak jak Q1 jest filtrem mas, dochodzi do rozdzielenia jonów potomnych powstałych podczas fragmentacji jonu macierzystego (tryb MRM). Dzięki monitorowaniu odpowiedniego przejścia jonu (pseudo)molekularnego do fragmentacyjnego możliwa jest identyfikacja związków oraz ich oznaczenie ilościowe. Konsekwencją selektywności uzyskiwanej w tandemowym spektrometrze mas (w trybie MRM) jest czułość, tak bardzo konieczna w przypadku analizy próbek biologicznych.

W celu przeprowadzenia optymalizacji parametrów pracy tandemowego spektrometru mas analizie poddano roztwory pojedynczych wzorców (rozcieńczonych w metanolu lub mieszaninie metanol-woda) związków z grupy izoprostanów (8-iso-PGF_{2α}, 8-iso-15(R)-PGF_{2α}, 15(R)-PGF_{2α}, 11β-PGF_{2α}, 8-iso-PGF_{2α}-d₄), 3-nitrotyrozyny i aminokwasów.

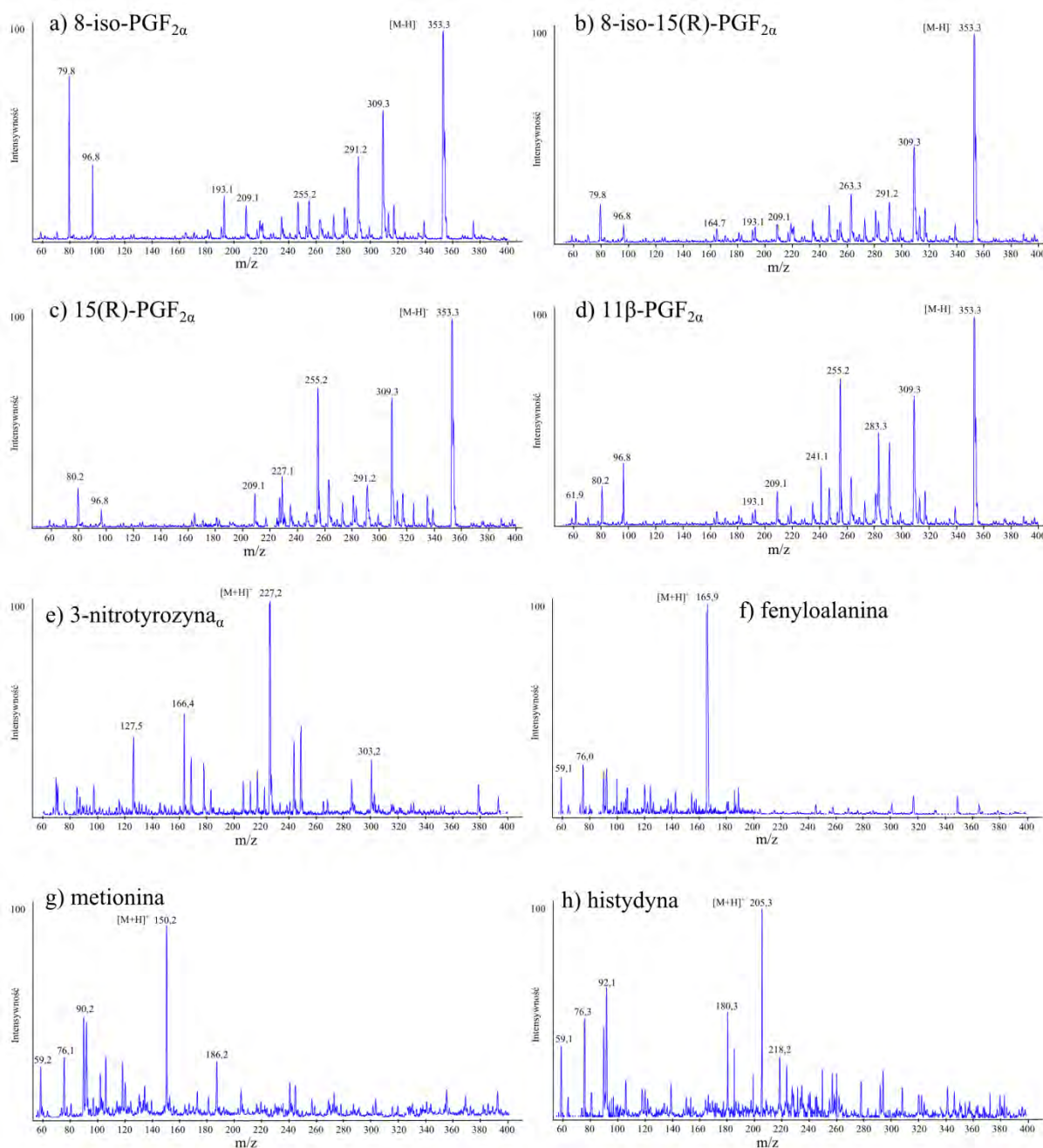
Optymalizacji parametrów pracy tandemowego spektrometru mas dokonuje się poprzez ustalenie optymalnych wartości parametrów związanych z właściwościami fizykochemicznymi analitu oraz parametrów związanych ze źródłem jonów. Optymalne wartości tych parametrów nie zależą od warunków pracy układu chromatograficznego, dlatego mogą być optymalizowane za pomocą różnych technik wprowadzania próbki np. poprzez analizę wstrzykowo-przepływową (FIA) lub wprowadzanie próbki za pomocą pompy strzykawkowej. Natomiast optymalne parametry pracy źródła jonów zależą od warunków pracy układu chromatograficznego takich jak objętościowe natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej i jej składu.



Rysunek 20. Schemat detektora MS/MS wraz z opisem jego parametrów pracy

Parametry pracy tandemowego spektrometru mas optymalizowano stosując technikę FIA, jako technikę wprowadzania próbek roztworów wzorcowych bezpośrednio do detektora. Na Rysunku 20 przedstawiono schemat budowy oraz opis parametrów pracy detektora MS/MS.

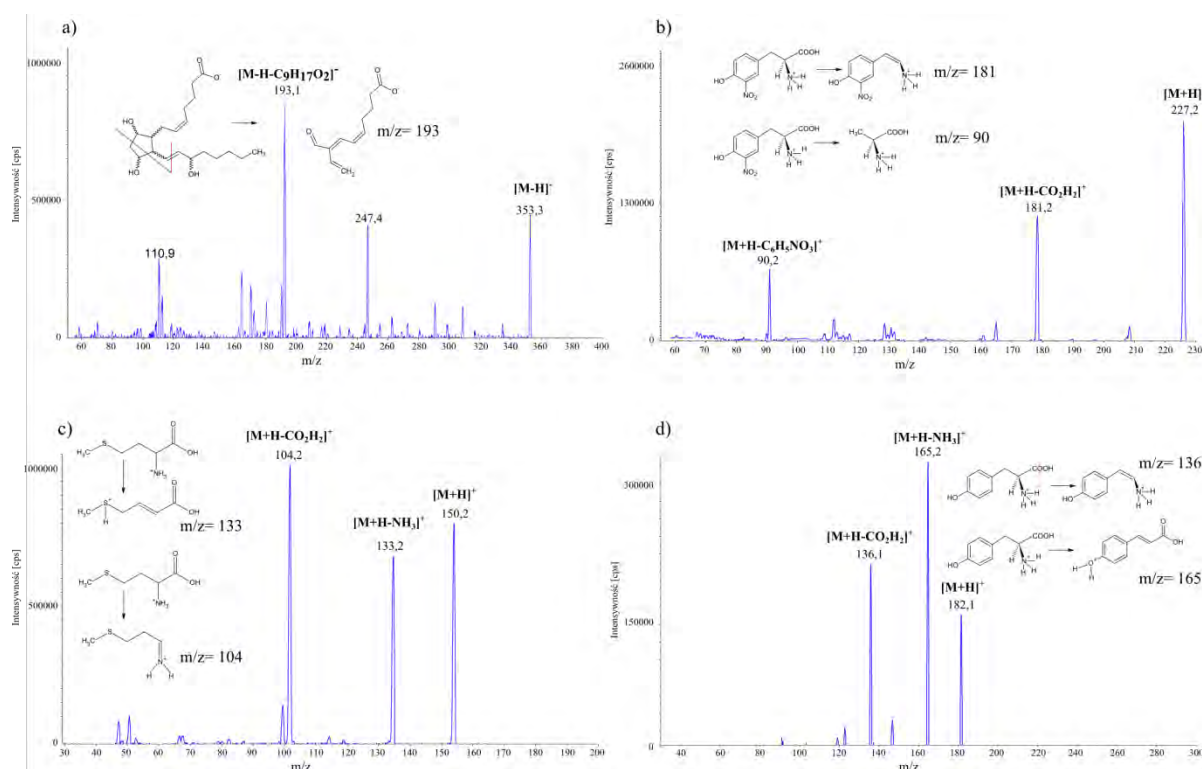
Wynikiem jest otrzymanie widm MS w trybie *scan* dla poszczególnych analitów, na których zaznaczony został jon (pseudo)molekularny ($[M-H]^-$ lub $[M+H]^+$) każdego ze związków (Rysunek 21).



Rysunek 21. Widma mas związków z grupy izoprostanów, 3-nitrotyrozyny oraz wybranych aminokwasów wykonane w trybie *scan* detektora MS/MS

Widma mas związków z grupy izoprostanów uzyskanych w trybie pracy *scan* detektora MS/MS ukazują, iż jonem o najwyższej intensywności jest jon pochodzący od analizowanej substancji. Tryb *scan* pozwala na zdobycie informacji na temat tła pochodzącego od rozpuszczalnika, a także możliwych występujących w roztworach wzorcowych zanieczyszczeń.

Wybrane jony (pseudo)molekularne w następnym etapie poddawane są fragmentacji (Rysunek 22). Podwójne filtrowanie sygnału, polegające na tym, że do końcowego detektora docierają nie te jony, które powstały w źródle, lecz te utworzone w skutek fragmentacji wyselekcjonowanych jonów macierzystych, drastycznie poprawia selektywność i czułość detektora.



Rysunek 22. Widma mas analizów uzyskanych w wyniku pracy detektora MS/MS a) 8-iso-PGF_{2α} (CE= -32 V, b) 3-nitrotyrozyna (CE= 17 V, c) metionina (CE= 15 V c) i tyrozyna (CE= 19 V c) wraz z przykładowymi schematami struktur cząsteczek jonów macierzystych oraz proponowanymi strukturami jonów powstałych przez ich fragmentację

W Tabeli 7 zestawiono charakterystykę oznaczanych aminokwasów wraz z jonami fragmentacyjnymi otrzymanymi w trakcie fragmentacji jonów (pseudo)molekularnych.

Tabela 7. Charakterystyka oznaczanych aminokwasów wraz z otrzymanymi jonami (pseudo)cząsteczkowymi i fragmentacyjnymi

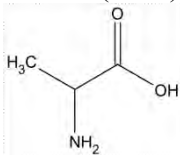
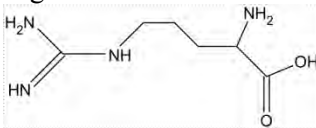
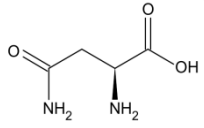
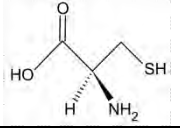
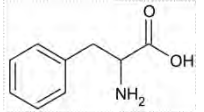
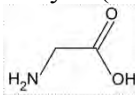
Nazwa	Polarność	Charakter chemiczny	$[M+H]^+$	$[M+H - CO_2H_2]^+$	$[M+H - NH_3]^+$	$[M+H - CO_2H_2 - NH_3]^+$	$[M+H - H_2O]^+$	Inne
Alanina (ALA) 	Niepolarny	Obojętny	90	44				
Arginina 	Polarny	Zasadowy	175					70; 116; 130
Asparagina (ASP) 	Polarny	Obojętny	133		116			
Cysteina (CYS) 	Polarny	Obojętny	122	76	105	59		
Fenylalanina (FEN) 	Niepolarny	Obojętny	166	120				149
Glicyna (GLI) 	Niepolarny	Obojętny	76	30	59			

Tabela 7. c.d.

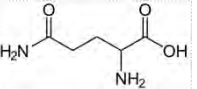
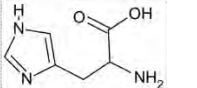
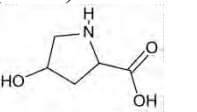
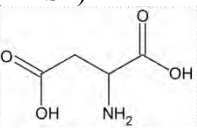
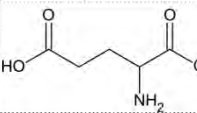
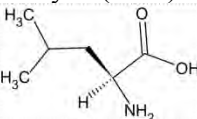
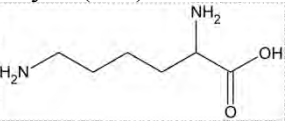
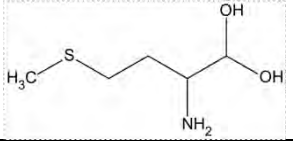
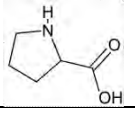
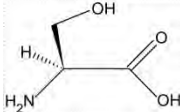
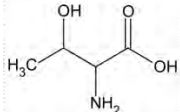
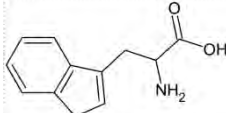
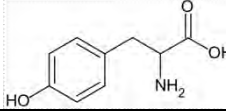
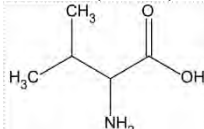
Glutamina (GLU) 	Polarny	Obojętny	147	130	84
Histydyna (HIS) 	Polarny	Zasadowy	156	110	
Hydrokxy-4-prolina (HYD) 	Polarny	Obojętny	132	86	
Kwas asparaginowy (KASP) 	Polarny	Kwaśny	134	88	74
Kwas glutaminowy (KGLU) 	Polarny	Kwaśny	148	102	84
Leucyna (LEU) 	Niepolarny	Obojętny	132	86	
Lizyna (LIZ) 	Polarny	Zasadowy	147	130	84

Tabela 7. c.d.

Metionina (MET)	Niepolarny	Obojętny			
			150	104	133
Prolina (PRO)	Niepolarny	Obojętny			
			116	70	43
Seryna (SER)	Polarny	Obojętny			
			106		88
Treonina (TRE)	Polarny	Obojętny			
			120	74	56
Tryptofan (TRY)	Niepolarny	Obojętny			
			205		188
Tyrozyna (TYR)	Polarny	Obojętny			
			182	136	165
Walina (WAL)	Niepolarny	Obojętny			
			118	72	55

*Pogrubioną czcionką zaznaczono jony fragmentacyjne wybrane do analizy w trybie MRM

Po etapie optymalizacji warunków pracy tandemowego spektrometru mas (Tabela 8), analizie poddano próbki roztworów wzorcowych wykorzystując do tego celu tryb pracy MRM (tryb monitorowania wybranej reakcji) detektora MS/MS.

Tabela 8. Optymalne parametry pracy tandemowego spektrometru mas

Parametr	Izoprostany	3-nitrotyrozyna		Aminokwasy	
	Przejście jonów			Zakres parametrów dla 19 aminokwasów	
	353→193 357→197	227→181	227→90		
Parametry analitu	DP	-115 V	60 V	50 V	20-120 V
	EP	-10 V	7 V	5 V	10 V
	CXP	-15 V	10 V	5 V	15V
	CE	-33 V	13 V	50 V	7-41 V
Parametry źródła	GS1	60 V	60 V	60 V	30 V
	GS2	80 V	20 V	50 V	40 V
	TEM	550°C	550°C	550°C	550°C
	CUR	20 V	30 V	30 V	10 V
	IS	4200 V	4200 V	4200 V	4200 V

Praca w trybie monitorowanie przejścia jonów (pseudo)molekularnego do fragmentacyjnego umożliwia przeprowadzenie analizy jakościowej i ilościowej bez całkowitego rozdzielania związków w kolumnie chromatograficznej. W przypadku pracy detektora trybie MRM każde monitorowane przejście jonów jest zapisywane, jako osobny chromatogram.

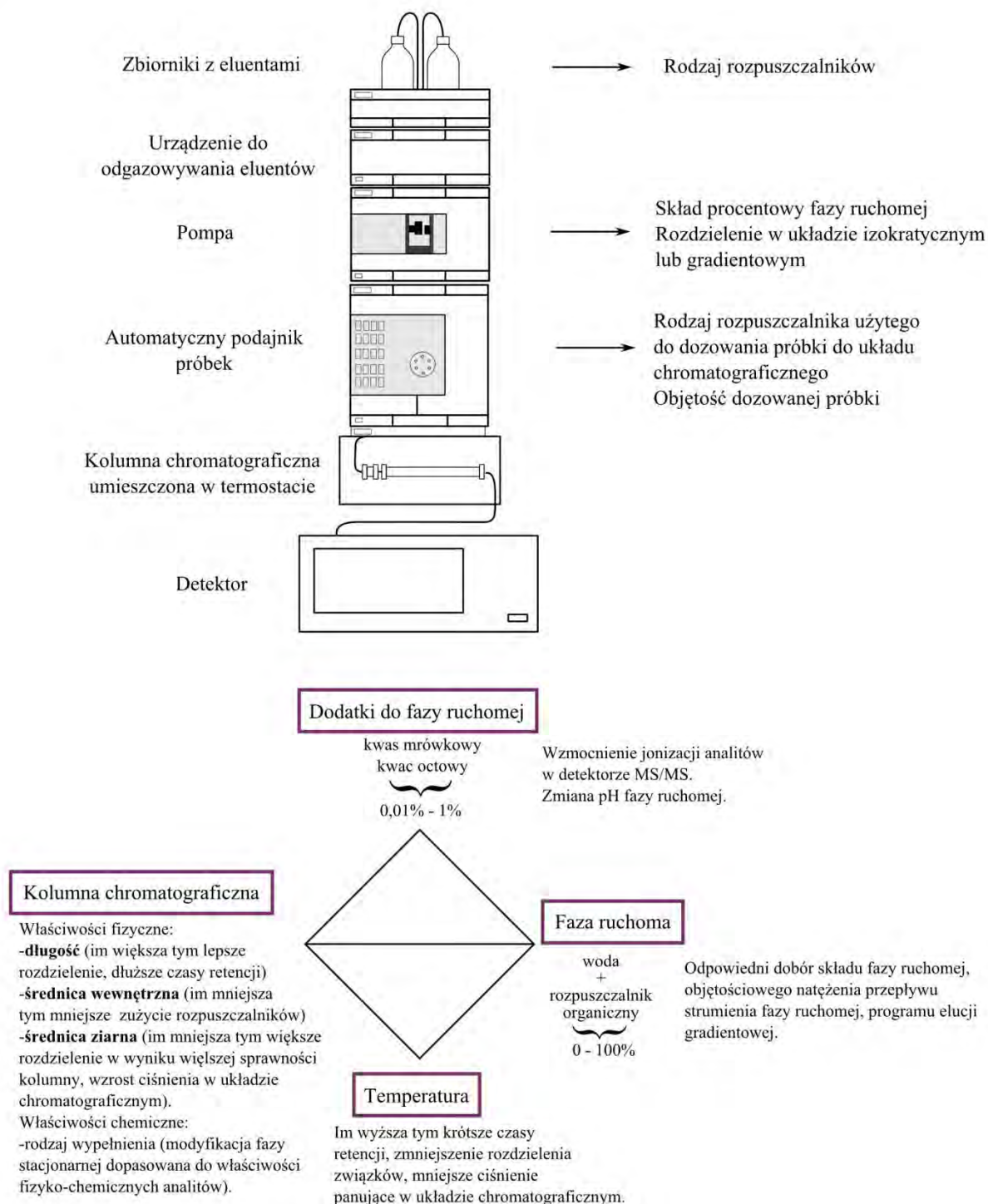
3.2. Dobór optymalnych warunków procesu rozdzielania chromatograficznego

W opracowanej procedurze analitycznej na etapie rozdzielania mieszanin składników obecnych w analizowanych próbkach wykorzystana została technika wysokosprawnej chromatografii cieczowej.

Przed rozpoczęciem analizy chromatograficznej należy określić charakter analitów zawartych w badanej próbce, poznać ich właściwości fizyko-chemiczne (masa cząsteczkowa, grupy funkcyjne, polarność, lipofilowość itp.). Wszystkie te cechy mogą być cennymi wskazówkami, które ułatwią dobór optymalnych warunków prowadzenia procesu

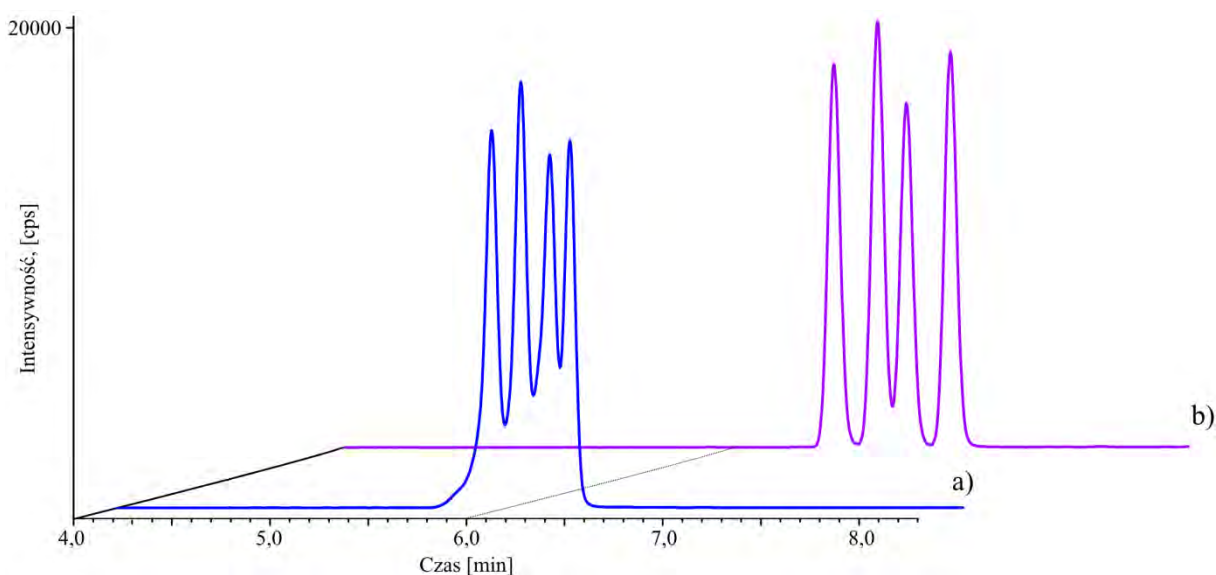
rozdzielania tak aby uzyskiwane chromatogramy zawierały możliwie jak największą ilość informacji.

Ze względu na fakt, iż układ chromatograficzny do HPLC składa się z wielu elementów, optymalizacji poddawane są kolejno wszystkie jego składowe. Złożoność tego etapu w sposób schematyczny pokazano na Rysunku 23.



Rysunek 23. Schemat układu chromatograficznego wykorzystywanego w trakcie badań wraz z opisem głównych składowych tego układu poddanych optymalizacji

Związki z grupy izoprostanów charakteryzują się tym, iż w ich strukturze obecne są grupy funkcyjne $-\text{COOH}$ nadające tym związkom charakter kwasowy (wartość liczbowa $\text{pK}_a \approx 5$ w roztworach wodnych o $\text{pH} \approx 7$). Oznacza to, że ich równowaga dysocjacji przesunięta jest w stronę form zjonizowanych. W celu cofnięcia dysocjacji analitów, a tym samym zwiększenia ich retencji w układzie RPLC, należy fazę ruchomą zakwasić do $\text{pH} \leq 4$. Jednakże rodzaj i ilość kwasu dodawanego do fazy ruchomej należy zoptymalizować takim zakresem, aby nie wpłynęło to na czułość odpowiedzi spektrometru mas (zwykle dodatek kwasów organicznych w ilości od 0,01 do 0,1% przyczynia się do wzmocnienia jonizacji związków, zaś dodatek 0,1 do 1% powoduje tłumienie sygnału w wyniku wzrastającej intensywności szumów).



Rysunek 24. Chromatogramy uzyskane w wyniku analizy próbek roztworów wzorcowych związków z grupy izoprostanów a) faza ruchoma $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (1:1, v/v), b) faza ruchoma z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego

Na Rysunku 24 pokazano chromatogramy obrazujące wpływ składu fazy ruchomej na rozdzielanie analitów z grupy izoprostanów. W trakcie analizy próbek roztworów wzorcowych z wykorzystaniem techniki HPLC gdy pH fazy ruchomej było w zakresie 5-7 obserwowano znaczne czołowanie oraz wyraźną koelucję analitów. Dodatek kwasu mrówkowego (w ilości 0,1%) do fazy ruchomej powodował cofnięcie dysocjacji związków z grupy izoprostanów, a tym samym polepszenie ich rozdzielania przy nieznacznym wydłużeniu czasów retencji. W przypadku mieszaniny 3-nitrotyrozyny i aminokwasów, gdzie nie jest konieczne rozdzielanie analitów ze względu na monitorowanie odpowiednich przejść

jonów (w trybie MRM), obserwowano zwiększenie czasów retencji oraz poprawę kształtu pików.

We wszystkich przypadkach dodatek kwasu mrówkowego (w ilości 0,1%) do fazy ruchomej wpływał na intensywność sygnału pochodzącego od jonów powstających w detektorze MS/MS.

Dobór kolumny chromatograficznej

Istotny wpływ na rozdzielanie analitów z grupy izoprostanów i aminokwasów ma rodzaj wypełnienia kolumny chromatograficznej. Ze względu na fakt, iż izoprostan są izomerami strukturalnymi, niezbędne jest uzyskanie całkowitego rozdzielania chromatograficznego by możliwa była przeprowadzenie poprawnej analizy jakościowej i ilościowej. Oznaczane związki z grupy izoprostanów posiadają w swojej strukturze pierścień cyklopentanowy oraz łańcuchy boczne o charakterze hydrofobowym, dlatego też dokonano doboru kolumny chromatograficznej spośród kolumn o wypełnieniu z żelu krzemionkowego modyfikowanego grupami C8 lub C18. W Tabeli 9 zestawiono informacje o kolumnach chromatograficznych, które będą wykorzystywane na etapie optymalizacji warunków rozdzielania chromatograficznego.

Tabela 9. Charakterystyka kolumn chromatograficznych wybranych do optymalizacji procesu rozdzielania związków z grupy izoprostanów

Kolumna chromatograficzna - nazwa	Kinetex RP C18	LiChrospher RP 18e	Zorbax XDB C-18	Zorbax Extend C-18
Firma	Phenomenex	Merck	Agilent	Agilent
Wymiary L×Id×d_p	100×4,6mm×2,6µm	250×4mm×5µm	100×4,6mm×3,5µm	50×2,1mm×1,8µm
Opis wypełnienia	Niecałkowicie porowate ziarno (technologia core-shell) przy małej średnicy ziarna generuje niskie ciśnienie wsteczne.	Wypełnienie przystosowane do rozdzielania związków o charakterze neutralnym, kwasowym i słabych zasad.	Wypełnienie typu krzemionka sol-żel (technologia „hard wall”), doskonały kształt pików dla zw. zasadowych, kwasowych i obojętnych	Unikalna technologia wiązania C18-C18 oraz mostek propylenowy między Si
Uwagi	Bardzo wysoka sprawność, małe ilości zużywanych rozpuszczalników. Szybkie zużycie kolumny przez zatykanie porów.	Niska sprawność, ale również niska cena kolumny oraz długi czas użytkowania. Duże ilości zużywanych rozpuszczalników.	Małe zużycie rozpuszczalników. Wysoka sprawność. Długi czas życia kolumny. Zakres pH 2-9.	Małe zużycie rozpuszczalników. Bardzo wysoka sprawność. Zakres pH 2-11,5.

Związki z grupy izoprostanów eluowano z kolumn, wymienionych powyżej, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę:

- 50% metanolu
- 50% wody
- dodatek w ilości 0,1% kwasu mrówkowego.

Kolumny te porównano wykorzystując do tego celu takie parametry jak: współczynnik retencji (k), asymetria piku (As), współczynnik selektywności (α), stopień rozdzielania (Rs) oraz sprawność kolumny (N) (Tabela 10).

Tabela 10. Zestawienie parametrów charakteryzujących proces rozdzielania mieszaniny izoprostanów z wykorzystaniem różnych kolumn chromatograficznych

Kolumna	Współczynnik retencji (k)	Asymetria piku (As)	Współczynnik selektywności (α)	Stopień rozdzielania (Rs)	Sprawność kolumny (N)
Kinetex RP C18	$k_1=10,83$ $k_2=11,46$ $k_3=11,88$ $k_4=12,47$	$As_1=1,33$ $As_2=1,57$ $As_3=1,24$ $As_4=1,12$	$\alpha_{1-2}=1,06$ $\alpha_{2-3}=1,04$ $\alpha_{3-4}=1,05$	$Rs_{1-2}=1,64$ $Rs_{2-3}=1,07$ $Rs_{3-4}=1,38$	$N=14573$
LiChrospher RP 18e	$k_1=9,11$ $k_2=9,70$ $k_3=10,00$ $k_4=10,50$	$As_1=1,06$ $As_2=0,63$ $As_3=1,39$ $As_4=1,44$	$\alpha_1=1,06$ $\alpha_2=1,03$ $\alpha_3=1,05$	$Rs_{1-2}=1,06$ $Rs_{2-3}=1,59$ $Rs_{3-4}=1,12$	$N=3968$
Zorbax XDB C 18	$k_1=10,02$ $k_2=10,68$ $k_3=11,12$ $k_4=11,79$	$As_1=1,18$ $As_2=1,26$ $As_3=1,69$ $As_4=1,54$	$\alpha_{1-2}=1,07$ $\alpha_{2-3}=1,04$ $\alpha_{3-4}=1,06$	$Rs_{1-2}=1,43$ $Rs_{2-3}=0,88$ $Rs_{3-4}=1,41$	$N=10758$
Zorbax Extend C-18	$k_1=0,25$ $k_2=0,27$ $k_3=0,29$ $k_4=0,34$	$As_1=1,16$ $As_2=1,57$ $As_3=1,36$ $As_4=1,87$	$\alpha_{1-2}=1,08$ $\alpha_{2-3}=1,07$ $\alpha_{3-4}=1,17$	$Rs_{1-2}=1,09$ $Rs_{2-3}=1,02$ $Rs_{3-4}=2,36$	$N=6656$

Zastosowanie wszystkich powyższych kolumn pozwoliło na rozdzielanie związków z grupy izoprostanów. Wartości liczbowe współczynników retencji dla trzech kolumn były zbliżone ze względu na porównywalne długości kolumn, natomiast wartości współczynników asymetrii piku różnią się od siebie w niewielkim stopniu.

Zdecydowano, że do analiz próbek rzeczywistych z wykorzystaniem opracowanej procedury analitycznej zostaną wykorzystane kolumny Zorbax Extend C-18 i Zorbax XDB C18 ze względu na dużą sprawność, a także stosunkowo niskie koszty eksploatacji.

Kolumna Zorbax Extend C-18 ze względu na możliwość zastosowania elucji izokratycznej – oferuje krótkie czasy analiz i dzięki temu zwiększoną ilość analizowanych próbek w określonym czasie. Tą kolumnę wykorzystywano do oznaczania zawartości izoprostanów w próbkach EBC.

Ze względu na fakt, iż próbki osocza charakteryzują się skomplikowanym składem matrycy i możliwe jest występowanie w nich innych związków z grupy izoprostanów, które nie są przedmiotem zainteresowania i ze względu na to, że charakteryzują się taką samą masą cząsteczkową, należy je traktować jako związki przeszkadzające. W związku z tym niezbędne jest nie tylko całkowite rozdzielanie analitów, ale także rozdzielanie ich od pozostałych izomerów strukturalnych. To osiągnąć można stosując kolumnę Zorbax XDB C18 oraz elucję gradientową.

W Tabeli 11 zestawiono informacje o kolumnach chromatograficznych, które będą wykorzystywane na etapie badań ukierunkowanych na oznaczanie 3-nitrotyrozyny i aminokwasów.

Tabela 11. Charakterystyka kolumn chromatograficznych wybranych do optymalizacji procesu rozdzielania 3-nitrotyrozyny i aminokwasów

Kolumna chromatograficzna - nazwa	Supelcosil LC-NH ₂	Kinetex PFP	Ascentis Si
Firma	Supelco	Phenomenex	Supelco
Wymiary L×Id×d _p	150×3mm×3μm	150×2,1mm×2,6μm	150×2,1mm×5μm
Opis wypełnienia	Wypełnienie z żelu krzemionkowego modyfikowanego grupami amino propylowymi. Kolumny tego typu wykorzystywane do rozdzielania cukrów w układzie NP.	Wypełnienie z żelu krzemionkowego modyfikowanego grupami pentafluorofenyłowymi do rozdzielania związków aromatycznych.	Wypełnienie z krzemionki o wysokiej czystości. Kolumna przeznaczona do rozdzielania związków małocząsteczkowych w układzie NP i HILIC.
Uwagi	Duża sprawność, małe ilości zużywanych rozpuszczalników. Zakres pH 2-7,5.	Bardzo wysoka sprawność, małe ilości zużywanych rozpuszczalników. Zakres pH 1,5-8.	Małe zużycie rozpuszczalników. Duża sprawność. Zakres pH 2-6.

Większość oznaczanych aminokwasów charakteryzuje się różnymi przejściami jonów, które monitoruje się w trybie MRM spektrometru mas. Z tego względu do przeprowadzenia analizy jakościowej i ilościowej nie jest konieczne rozdzielanie tych związków. Głównymi parametrami, którymi sugerowano się przy wyborze odpowiedniej kolumny chromatograficznej były:

- kształt piku
- sprawność kolumny.

Najlepsze wyniki osiągnięto stosując kolumnę Ascentis®Si, która jest fabrycznie przystosowana do rozdzielania aminokwasów.

Dobór składu fazy ruchomej do rozdzielania związków z grupy izoprostanów, 3-nitrotyrozyny oraz aminokwasów

W tym przypadku proces optymalizacji polegał na dobraniu proporcji składników eluentu, w taki sposób, aby podczas analizy roztworu mieszaniny wzorców wartość stosunku intensywności sygnału oznaczanych substancji do intensywności szumów była największa z zachowaniem podstawowych wymogów optymalnego rozdzielania chromatograficznego dla związków z grupy izoprostanów (R_s , A_s). Optymalizacji poddano parametry typu:

- rodzaj rozpuszczalników,
- zawartość dodatków w fazie ruchomej,
- program elucji.

Sprawdzono możliwość wykorzystania takich rozpuszczalników jak metanol, acetonitryl i woda ze stałą zawartością kwasu mrówkowego na poziomie 0,1%. Otrzymane wyniki zestawiono w Tabeli 12.

Tabela 12. Wpływ składu fazy ruchomej na rozdzielanie związków z grupy izoprostanów

Nr	Eluent		Stopień rozdzielania (R_s)	Sygnał/Szum (S/N)			
	Składnik A	Składnik B		1	2	3	4
1	H ₂ O (50%A:50%B)	MeOH	$R_s = 1,45$	4,2	4,6	3,7	2,8
2	H ₂ O (50%A:50%B)	MeOH:ACN	$R_s = 1,27$	4,5	5,4	4,6	4,6
3	H ₂ O (50%A:50%B)	ACN	$R_s < 1$	Elucja analitów w czasie martwym			

Zastosowanie fazy ruchomej o składzie H₂O i MeOH:ACN (1:1) spowodowało skrócenie czasów retencji analitów, tym samym zawężeniem pasma stężeniowego, co w rezultacie przełożyło się na wzrost wysokości pików. Niewielkie pogorszenie rozdzielania związków można zredukować poprzez dobranie odpowiedniego programu elucji. Dlatego też do dalszych badań użyto fazy ruchomej o składzie A: H₂O i B: MeOH/ACN (1:1, v/v).

Dla 3-nitrotyrozyny i aminokwasów, które posiadają różne przejścia jonów w trybie MRM, rozpatrując wpływ składu fazy ruchomej pod uwagę wzięto jedynie wartość stosunku sygnału do szumu (Tabela 13).

Tabela 13. Wpływ składu fazy ruchomej na stosunek intensywności sygnału analitycznego do szumów 3-nitrotyrozyny oraz wybranych aminokwasów

Nr	Eluent		Sygnał/Szum (S/N)			
	Składnik A	Składnik B	3-NT	Fen	Met	Tryp
1	H ₂ O (30%A:70%B)	MeOH	3,6	5,1	4,8	4,2
2	H ₂ O (30%A:70%B)	MeOH:ACN	4,5	5,7	5,2	4,9
3	H ₂ O (30%A:70%B)	ACN	5,0	6,1	5,7	5,3

Zastosowanie fazy ruchomej o składzie H₂O:ACN (30:70) umożliwiło częściowe rozdzielanie analitów przy zachowaniu odpowiedniego kształtu pików oraz w krótkim czasie.

Dodatki do fazy ruchomej

Dodatek kwasów organicznych (mrówkowego i octowego) i buforu mrówczanu amonu do fazy ruchomej prowadzi do obniżenia pH i ma wpływ na rozdzielanie izoprostanów i intensywność sygnałów analitycznych. Nie zaobserwowano pogorszenia rozdzielania pików, dlatego też w Tabeli 14 zebrano informacje dotyczące wyłącznie wartości liczbowych stosunku S/N.

Tabela 14. Wpływ dodatku kwasu organicznego na intensywność sygnału analitycznego i szumów w przypadku rozdzielania związków z grupy izoprostanów, 3-nitrotyrozyny i aminokwasów

Dodatek kwasu organicznego	Sygnał/Szum (S/N)							
	1	2	3	4	3-NT	Fen	Met	Tryp
+ 0,1% AA	1,7	2,6	1,7	2,0	3,1	2,8	1,7	2,5
+ 0,01% AA	4,5	5,9	5,6	4,8	3,7	3,3	2,5	2,8
+ 0,1% FA	4,4	5,2	4,3	4,0	4,2	4,5	5,1	5,8
+ 0,01% FA	6,0	6,6	5,5	5,5	7,1	6,5	6,9	7,3
+ 0,05% AA	4,5	5,4	3,6	4,6	4,8	5,1	5,3	5,1

Oba kwasy octowy i mrówkowy wpływają na zwiększenie intensywności procesu jonizacji, kiedy ich zawartość w obu składnikach fazy ruchomej wynosi 0,01%. Przy zastosowaniu kwasu mrówkowego jako dodatku do fazy ruchomej otrzymano piki o większej intensywności, jednak szумы w porównaniu z tymi uzyskanymi przy zastosowaniu kwasu

octowego są większe. Z kolei przy zastosowaniu kwasu octowego otrzymano piki o mniejszej intensywności, ale również szумы były mniejsze.

W trakcie badań chromatograficznych próbek rzeczywistych zdecydowano się zastosować dodatek (0,01%) kwasu mrówkowego co zapewnia większą intensywność sygnałów kosztem niższych szumów. Zwiększenie procentowej zawartości kwasu w fazie ruchomej, powyżej 0,01%, skutkowało spadkiem intensywności sygnału analitycznego. Jednocześnie obserwowano spadek wartości liczbowego stosunku S/N wraz ze spadkiem zawartości kwasu mrówkowego w fazie ruchomej (do wartości poniżej S/N=4).

W kolejnym etapie badano wpływ stężenia buforu (mrówczanu amonu pH 3) na wielkość sygnału analitycznego izoprostanów. Optymalizowano stężenie buforu FA-NH₃. Tak jak w przypadku stosowania kwasów, jako dodatków do fazy ruchomej, tak przy użyciu buforu o pH 3, jako jednego z eluentów, nie zauważono pogorszenia rozdzielania związków z grupy izoprostanów. Stosując bufor o stężeniach 1, 5, 10, 20 mM nie zaobserwowano wzrostu intensywności sygnału analitycznego w porównaniu do fazy ruchomej o składzie H₂O:MeOH/ACN + 0,01% FA (1:1). co uwidocznione zostało w Tabeli 15.

Tabela 15. Wpływ stężenia buforu mrówczanu amonu na wartość stosunku S/N dla związków z grupy izoprostanów

Stężenie buforu FA-NH ₃ pH 3	Sygnał/Szum (S/N)			
	1	2	3	4
1 mM	2,4	5,9	2,7	2,4
5 mM	2,9	7,9	2,5	2,2
10 mM	2,3	3,7	2,3	2,9
20 mM	3,5	2,3	2,2	3,6

Optymalizacja temperatury termostatu kolumny chromatograficznej w trakcie procesu rozdzielania związków z grupy izoprostanów, 3-nitrotyrozyny i aminokwasów

Wyniki analiz chromatograficznych serii próbek wzorcowych dozowanych do kolumny chromatograficznej utrzymywanej w różnej temperaturze (w zakresie od 30 do 60°C) umożliwiły określenie wpływu temperatury termostatu na intensywność sygnału analitycznego. Jest oczywiste, że wzrost temperatury, w której następuje rozdzielanie chromatograficzne powodował skrócenie czasów retencji oznaczanych substancji, wzrost sygnału, który jest wynikiem zmniejszenia się szerokości piku, ale także zmniejszenie

wartości liczbowej stopnia rozdzielania, którego optymalna wartość zawiera się w przedziale 1-1,5. Otrzymane w wyniku analiz dane zostały zestawione w Tabeli 16.

Tabela 16. Wpływ temperatury termostatu na rozdzielanie związków z grupy izoprostanów oraz wartość stosunku S/N

Temperatura	Współczynnik retencji (k)		Sygnał/Szum (S/N)			
	Stopień rozdzielania (Rs)		1	2	3	4
30°C	k ₁ = 7	Rs= 3,7	4,5	6,6	3,9	4,2
40°C	k ₁ =7 ,3	Rs= 3,6	7,0	8,4	5,4	6,2
50°C	k ₁ = 5,6	Rs= 2,6	4,6	4,4	4,5	5,3
60°C	k ₁ = 4,9	Rs= 2,3	5,5	7,3	5,3	4,7

Dla temperatur wyższych niż 40°C obserwowano znaczny spadek stopnia rozdzielania izoprostanów. Temperatura 40°C została wybrana, jako optymalna temperatura pracy termostatu kolumny. W tej temperaturze uzyskano największe wartości liczbowe S/N. Wyniki przedstawione w Tabeli 17 świadczą o konieczności przeprowadzenia optymalizacji programu elucji analitów by wartość liczbowa parametru Rs znajdowała się w optymalnym zakresie. Natomiast temperaturę termostatu kolumny chromatograficznej dla rozdzielania 3-nitrotyrozyny i aminokwasów ustalono na 20°C, z uwagi na fakt, iż ze wzrostem temperatury termostatu część analitów eluowała w czasie martwym kolumny.

Optymalizacja programu elucji

Znając już podstawowe warunki prowadzenia analizy chromatograficznej, takie jak:

- rodzaj rozpuszczalników,
- ilość i rodzaj dodatków do fazy ruchomej,
- temperatura,

następnym etapem badań była optymalizacja programu elucji tak aby:

- skrócić czasy retencji analitów,
- osiągnąć jak największą intensywność sygnału analitycznego
- osiągnąć optymalną wartość stopnia rozdzielania analitów.

W Tabeli 17 zestawiono programy elucji, które testowane były w trakcie badań.

Tabela 17. Informacje o programach elucji analitów testowanych w trakcie optymalizacji warunków pracy układu chromatograficznego

Nr	Program elucji	Współczynnik retencji (k)	Asymetria piku (As)	Współczynnik selektywności (α)	Stopień rozdzielania (Rs)	
A:H ₂ O B:MeOH/ACN						
Związki z grupy izoprostanów						
1	t [min]	%B	k ₁ =3,05	As ₁ =1,45	α_{1-2} =1,08	Rs ₁₋₂ =1,01
	0 – 4	50→55	k ₂ =3,30	As ₂ =1,35	α_{2-3} =1,10	Rs ₂₋₃ =1,24
	4 – 7	55→60	k ₃ =3,62	As ₃ =1,14	α_{3-4} =1,19	Rs ₃₋₄ =2,84
	7.0 – 11	50	k ₄ =4,31	As ₄ =1,36		
2	t [min]	%	k ₁ =2,04	As ₁ =1,17	α_{1-2} =1,09	Rs ₁₋₂ =0,98
	0 – 4	53→56	k ₂ =2,22	As ₂ =1,53	α_{2-3} =1,05	Rs ₂₋₃ =1,17
	4 – 7	56→60	k ₃ =2,34	As ₃ =1,62	α_{3-4} =1,27	Rs ₃₋₄ =2,70
	7.0 – 11	50	k ₄ =2,98	As ₄ =1,01		
3	t [min]	%	k ₁ =3,17	As ₁ =1,17	α_{1-2} =1,09	Rs ₁₋₂ =1,18
	0 – 4	50→53	k ₂ =3,47	As ₂ =1,35	α_{2-3} =1,10	Rs ₂₋₃ =1,32
	4-6,5	53→70	k ₃ =3,81	As ₃ =1,09	α_{3-4} =1,22	Rs ₃₋₄ =3,33
	6,5 – 12	50	k ₄ =4,63	As ₄ =1,42		
Nr	Program elucji	Współczynnik retencji (k)	Asymetria piku (As)			
A:H ₂ O B:ACN						
3-nitrotyrozyna i aminokwasy						
1	t [min]	%B	k _{3-NT} =1,01	As _{3-NT} =1,21		
	0-7	25→55	k _{Ala} =2,8	As _{Ala} =1,18		
	7-10	25	k _{Met} =2,15	As _{Met} =1,03		
2	t [min]	%B	k _{3-NT} =1,15	As _{3-NT} =1,17		
	0-7	22→55	k _{Ala} =3,1	As _{Ala} =1,15		
	7-10	22	k _{Met} =2,41	As _{Met} =1,17		
3	t [min]	%B	k _{3-NT} =0,95	As _{3-NT} =1,13		
	0-2	24→55	k _{Ala} =2,98	As _{Ala} =1,18		
	2-5	55	k _{Met} =2,23	As _{Met} =1,05		
	5-10	24				

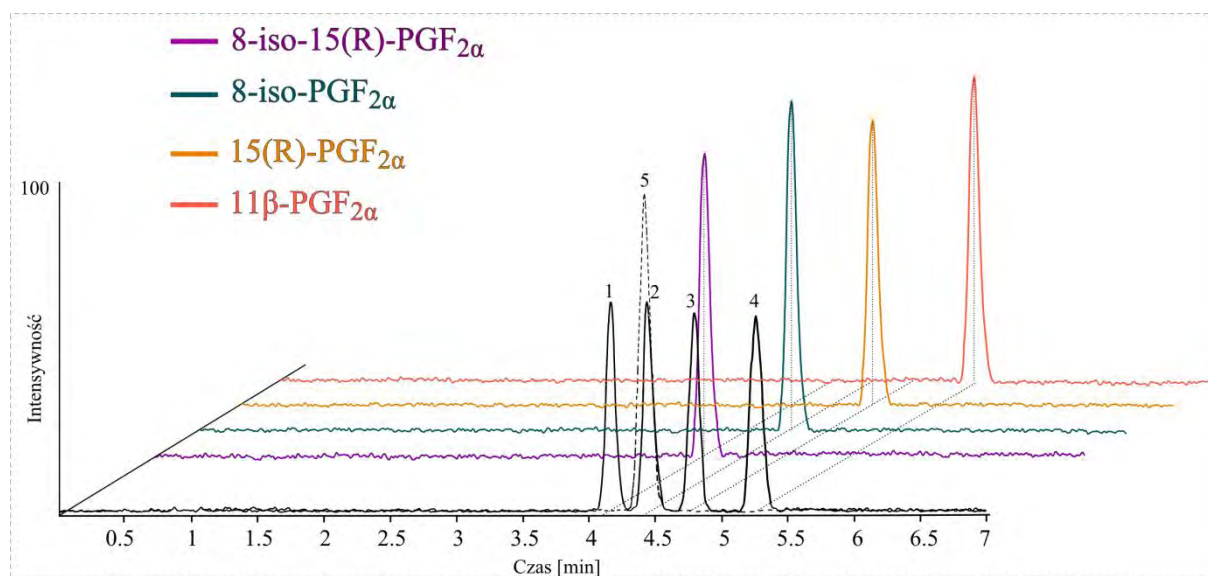
Najlepsze rozdzielanie związków z grupy izoprostanów w możliwie krótkim czasie (poniżej 7 minut) osiągnięto stosując program elucji nr 3.

Program elucji do rozdzielania 3-nitrotyrozyny i aminokwasów został zoptymalizowany tak, aby związki eluujące najwcześniej nie eluowały w czasie martwym kolumny, a te charakteryzujące się najdłuższym czasem retencji eluowały do 6 minuty. Wymagania te osiągnięto stosując program elucji nr 3.

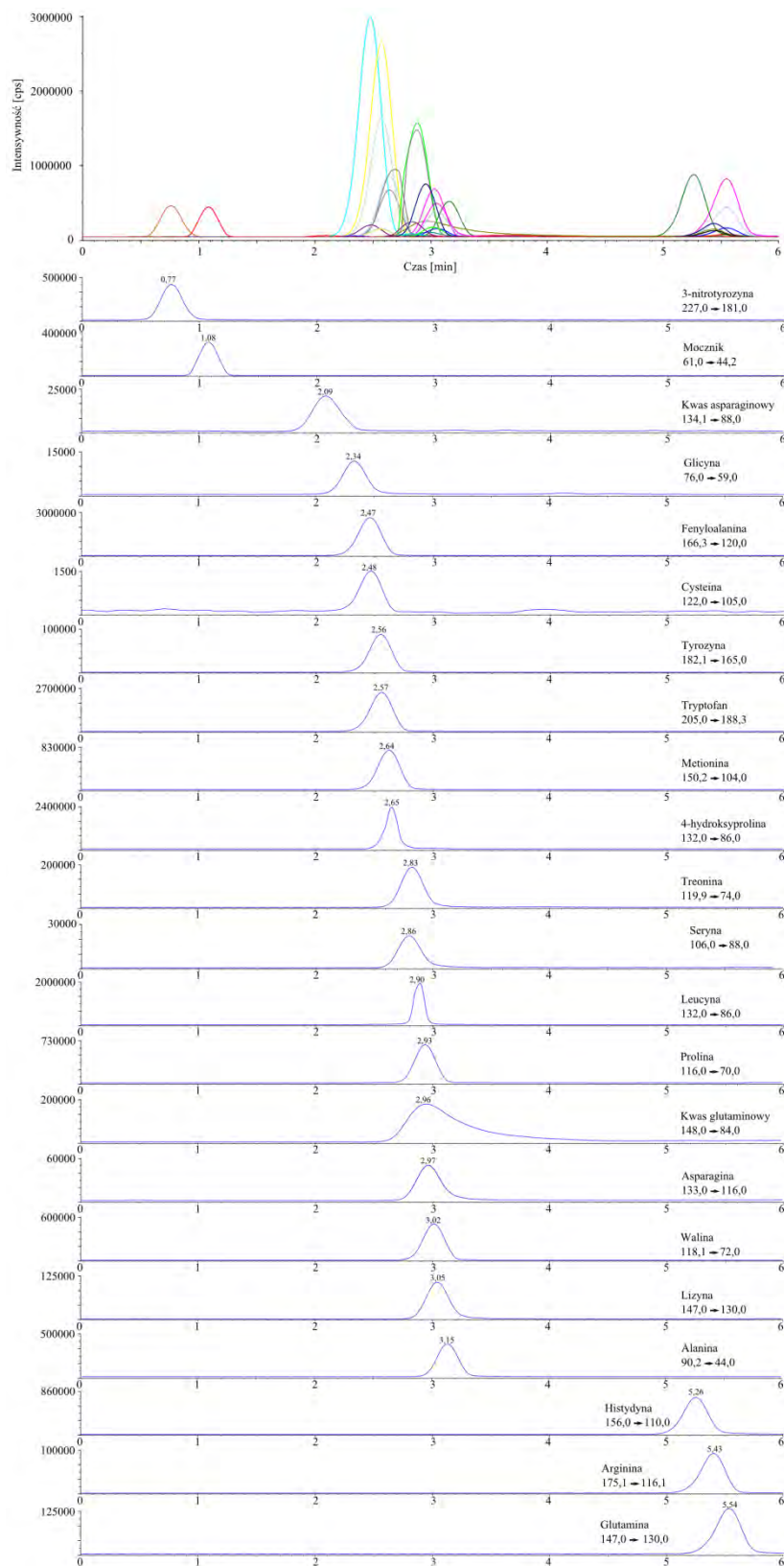
Identyfikacja związków z grupy izoprostanów, 3- nitrotyrozyny i aminokwasów

Ze względu na fakt iż wszystkie oznaczane związki z grupy izoprostanów posiadają jony (pseudo)molekularne (m/z 353,5) i fragmentacyjne (m/z 193,5) o takiej samej wartości, identyfikacji tych związków dokonano poprzez porównanie czasów retencji.

Analizie chromatograficznej poddano roztwory czterech substancji wzorcowych izoprostanów. Roztwory wzorcowe substancji 8-iso-PGF_{2α}, 8-iso-15(R)-PGF_{2α}, 8-iso-PGF_{2α}, 11β-PGF_{2α}, 15(R)-PGF_{2α} sporządzono w wodzie demineralizowanej tak by stężenie izoprostanów wynosiło 200 ng/ml. Uzyskano cztery chromatogramy, które pozwoliły na określenie czasu i kolejności elucji izoprostanów. Chromatogram ukazany na Rysunku 25a powstał w wyniku analizy próbki mieszaniny roztworów wzorcowych czterech związków z grupy izoprostanów. Chromatogramy uzyskane w wyniku analizy próbek pojedynczych wzorców połączono przedstawiono na Rysunku 25b. Skład fazy ruchomej, która została użyta podczas obu analiz chromatograficznych to: woda i metanol (1:1, v/v), oba składniki faz z dodatkiem 0,1% kwasu organicznego (mrówkowego).



Rysunek 25. Chromatogramy HPLC-MS/MS uzyskane w trybie pracy MRM w wyniku analizy próbki a) roztworu wzorcowego mieszaniny izoprostanów i b) roztworów pojedynczych związków



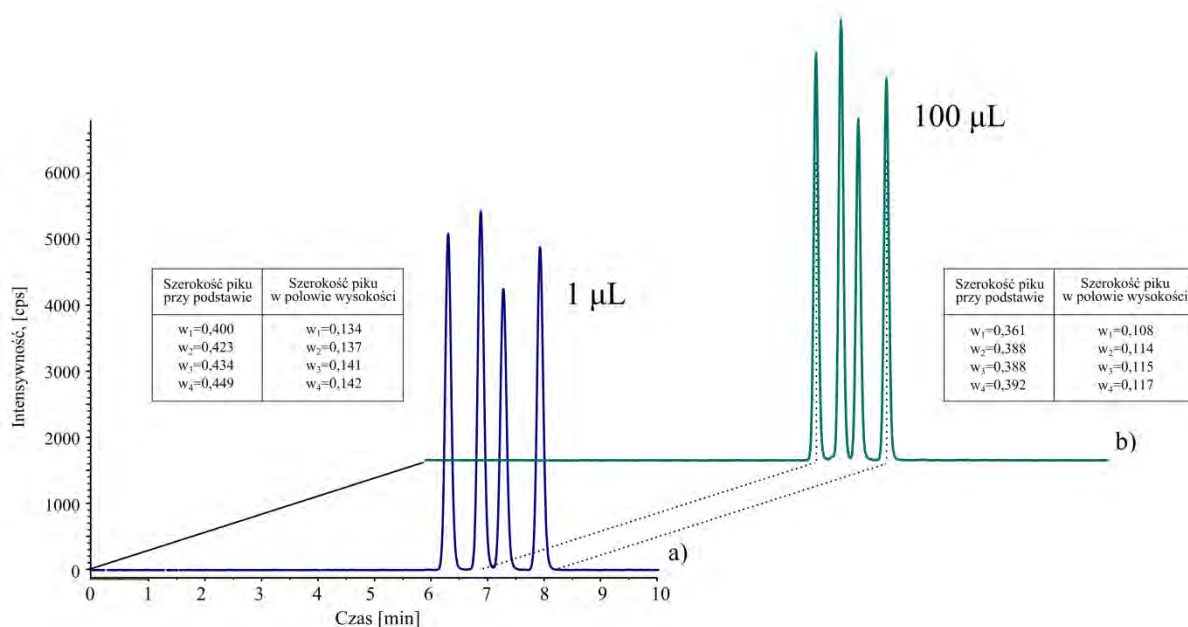
Rysunek 26. Chromatogram przedstawiający rozdzielenie mieszaniny wzorców aminokwasów i 3-nitrotyrozyny wraz z wyodrębnionymi chromatogramami pojedynczych analitów otrzymanych w trybie MRM.

Identyfikacji 3-nitrotyrozyny, aminokwasów i mocznika dokonano na podstawie porównania czasów retencji oraz monitorowanego przejścia jonów w trybie MRM (Rysunek 26).

Objętość dozowanej próbki

Biomarkery stresu oksydacyjnego występujące w próbkach EBC jak i osocza znajdują się na poziomie śladowym. Celem tego etapu badań było ustalenie, czy możliwe jest wprowadzenie próbek wodnych o dużej objętości bezpośrednio do układu chromatograficznego. Wprowadzenie próbki o objętości rzędu 100 μL skutkowało:

- zmianą w intensywności sygnału analitycznego na poziomie 20% w wysokości piku,
- nieznacznym wydłużeniem czasów retencji (zawężeniem pasma stężeniowego analitów w wyniku zatrzymania się dużej ilości wody na czole kolumny) (Rysunek 27).



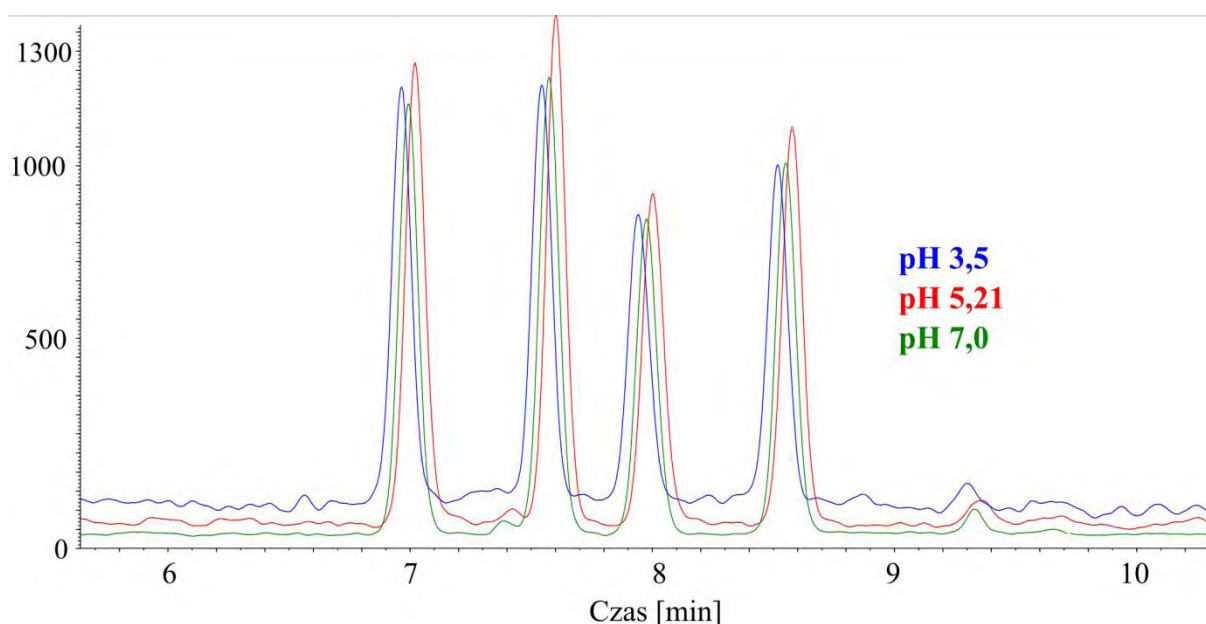
Rysunek 27. Chromatogramy uzyskane w wyniku wprowadzenia do układu chromatograficznego próbek roztworu wzorcowego o różnej objętości a) 1 μL , b) 100 μL

Wprowadzenie 100 μL próbki roztworu wodnego wzorców aminokwasów nie powodowało istotnej zmiany w czasie retencji związków ani w intensywności sygnału analitycznego.

Bezpośrednia analiza próbek kondensatów wydychanego powietrza

Przed przystąpieniem do optymalizacji parametrów etapu przygotowania próbki podjęto próbę analizy próbek EBC bez ich wcześniejszego przygotowania. Kondensaty wydychanego powietrza to próbki, które w większości składają się z wody. Próbki te charakteryzują się

stosunkowo prostym składem matrycy, ilość substancji przeszkadzających jest znikoma, a ich poziomy stężenie śladowe. Jednak niskie stężenia analitów skłaniają analityka do zastosowania w analizie chromatograficznej techniki polegającej na wprowadzeniu do kolumny chromatograficznej próbki o dużej objętości (100 μL). Wiąże się to z koniecznością opracowania optymalnego składu rozpuszczalnika, w którym anality będą wprowadzane do układu chromatograficznego. Jako najważniejszy parametr, który mógłby powodować zmiany w rozdzielaniu chromatograficznym izoprostanów i w intensywności sygnału analitycznego, uznano pH roztworu wodnego (i także kondensatu), w którym rozpuszczane były związki. Wpływ pH roztworu wodnego użytego podczas wprowadzania próbki do układu HPLC obrazuje chromatogram przedstawiony na Rysunku 28.



Rysunek 28. Chromatogramy uzyskane w wyniku analizy roztworów wzorcowych o różnym pH

Przez rozpuszczenie analitów w próbkach wody o określonym pH (3,5; 5,21; 7,0), a następnie wprowadzenie próbek roztworów wzorcowych do kolumny chromatograficznej otrzymano chromatogramy. Ich analiza prowadzi do wniosku, że pH analizowanej próbki nie ma znaczącego wpływu na retencję substancji, a także na intensywność sygnałów z detektora. Jednakże na chromatogramach uzyskanych w wyniku analizy próbek zakwaszonych (kwasem mrówkowym) obserwuje się wzrost poziomu szumów, co powoduje spadek wartości liczbowej stosunku S/N.

Próbka kondensatu wydychanego powietrza, w zależności od osoby, od której została pobrana, może charakteryzować się odmiennymi wartościami pH [69] (wyniki badań przeprowadzonych przez Krajowy Ośrodek Medycyny Hiperbarycznej w Gdyni pokazują, iż pH próbek kondensatów wydychanego powietrza wahało się w granicach od 6,5 do 8,2). Otrzymane wyniki analiz wpływu pH roztworu (próbki) zastosowanego do wprowadzania analitów do układu chromatograficznego wskazują na możliwość analizy próbek kondensatów wydychanego powietrza bez ich uprzedniego przygotowania (nawet zmiany pH).

4. Sposób kalibracji techniki chromatograficznej

Do oznaczania ilościowego zastosowano metodę wzorca wewnętrznego, która polega na dodaniu do próbki znanej ilości wzorca wewnętrznego. Wzorzec wewnętrzny musi się charakteryzować takimi cechami jak:

- ❖ nieobecność w próbkach rzeczywistych,
- ❖ właściwości fizyko-chemiczne zbliżone do analitów,
- ❖ stabilność chemiczna,
- ❖ czas retencji i odpowiedź detektora zbliżone do oznaczanych związków.

Jako wzorca wewnętrznego użyto deuterowanego związku jednego z oznaczanych izoprostanów 8-iso-PGF_{2α}. Związek 8-iso-PGF_{2α}-d₄ spełnia niemal wszystkie wyżej wymienione warunki. Problem jednakowego czasu retencji wzorca wewnętrznego i analitu jest rozwiązany poprzez zastosowanie odpowiedniego przejścia jonów 357 → 197.

Zastosowanie wzorca wewnętrznego jest niezbędne nie tylko do przeprowadzenia analizy ilościowej oznaczanych związków, ale jego dodatek do próbki przed etapem przygotowania pozwala uniknąć strat analitów na etapie izolacji i wzbogacania. Zaś podczas detekcji z użyciem techniki spektrometrii mas dodatek wzorca wewnętrznego umożliwia kompensację zmian w czułości detektora, które mogą być wynikiem zakłóceń układów elektronicznych lub zmian panujących wewnątrz komory jonizacyjnej i innych elementach detektora.

4.1. Sporządzenie krzywych wzorcowych

Sporządzono serię roztworów do analizy poprzez rozcieńczenie roztworu podstawowego (w którym stężenie izoprostanów jest na poziomie 1 ng/ml). Do tak przygotowanych roztworów wzorcowych dodano określoną ilość wzorca wewnętrznego (8-iso-PGF_{2α}-d₄), tak by uzyskać ostateczne jego stężenie wynoszące c=5 ng/ml. Na podstawie uzyskanych chromatogramów

sporządzono krzywe kalibracyjne opisujące zależność stężenia analitu w funkcji stosunku powierzchni piku analitu i powierzchni wzorca wewnętrznego (Tabela 18).

Tabela 18. Zestawienie parametrów krzywych kalibracyjnych uzyskanych w wyniku analizy próbek roztworów wzorcowych związków z grupy izoprostanów, 3-nitrotyrozyny i aminokwasów

Analit	Równanie krzywej	R²
8,15-isoP	$y=0.000473x+0.00456$	0,9923
8-isoP	$y=0.000505x+0.00146$	0,9961
11-isoP	$y=0.00337x+0.00543$	0,9953
15-isoP	$y=0.000386x+0.00537$	0,9912
3-nitrotyrozyna	$y=29,527x+222,17$	0,9989
Alanina	$y=184x+110000$	0,9984
Arginina	$y=4,38x+3340$	0,9971
Asparagina	$y=231x-18400$	0,9959
Cysteina	$y=23,3x+1670$	0,9913
Fenyloalanina	$y=392x+329000$	0,9950
Glicyna	$y=5,41x+2710$	0,9939
Glutamina	$y=6,98x+3970$	0,9931
Histydyna	$y=214x+323000$	0,9940
Hydroksy-4-prolina	$y=202x+132000$	0,9949
Kwas asparaginowy	$y=124x+12400$	0,9960
Kwas glutaminowy	$y=155x+17900$	0,9943
Leucyna	$y=117x+99300$	0,9963
Lizyna	$y=7,99x+39300$	0,9972
Metionina	$y=36,1x+9040$	0,9977
Prolina	$y=74,4x+66200$	0,9919
Seryna	$y=51,3x+25400$	0,9987
Treonina	$y=55,8x+27200$	0,9909
Tryptofan	$y=217x+98700$	0,9928
Tyrozyna	$y=19,6x+14700$	0,9918
Walina	$y=74x+45400$	0,9957

Biorąc pod uwagę wartość liczbową współczynnika regresji liniowej (R^2), który jest miarą stopnia skorelowania zmiennych (stosunki powierzchni piku analitu do powierzchni piku wzorca wewnętrznego i odpowiadające im stężenia analitu) można stwierdzić, że w badanym zakresie stężeń (10-250 pg/ml) istnieje liniowa zależność pomiędzy tymi zmiennymi.

4.2 Granica oznaczalności i wykrywalności proponowanych metodyk analitycznych

Obliczenia granicy wykrywalności dokonano na podstawie stosunku S/N dla badanej metody analitycznej. W oparciu o zasadę, że granica wykrywalności to trzykrotny poziom szumów, określono poziom szumów ($S=12$), mierząc na chromatogramie zakres zmiany sygnału w pobliżu czasu retencji dla analitów. Następnie tę wielkość pomnożono przez 3 i przeliczono uzyskane wartości sygnału na stężenie. Przy obliczaniu wartości granicy oznaczalności posłużono się zależnością, która ma następującą postać:

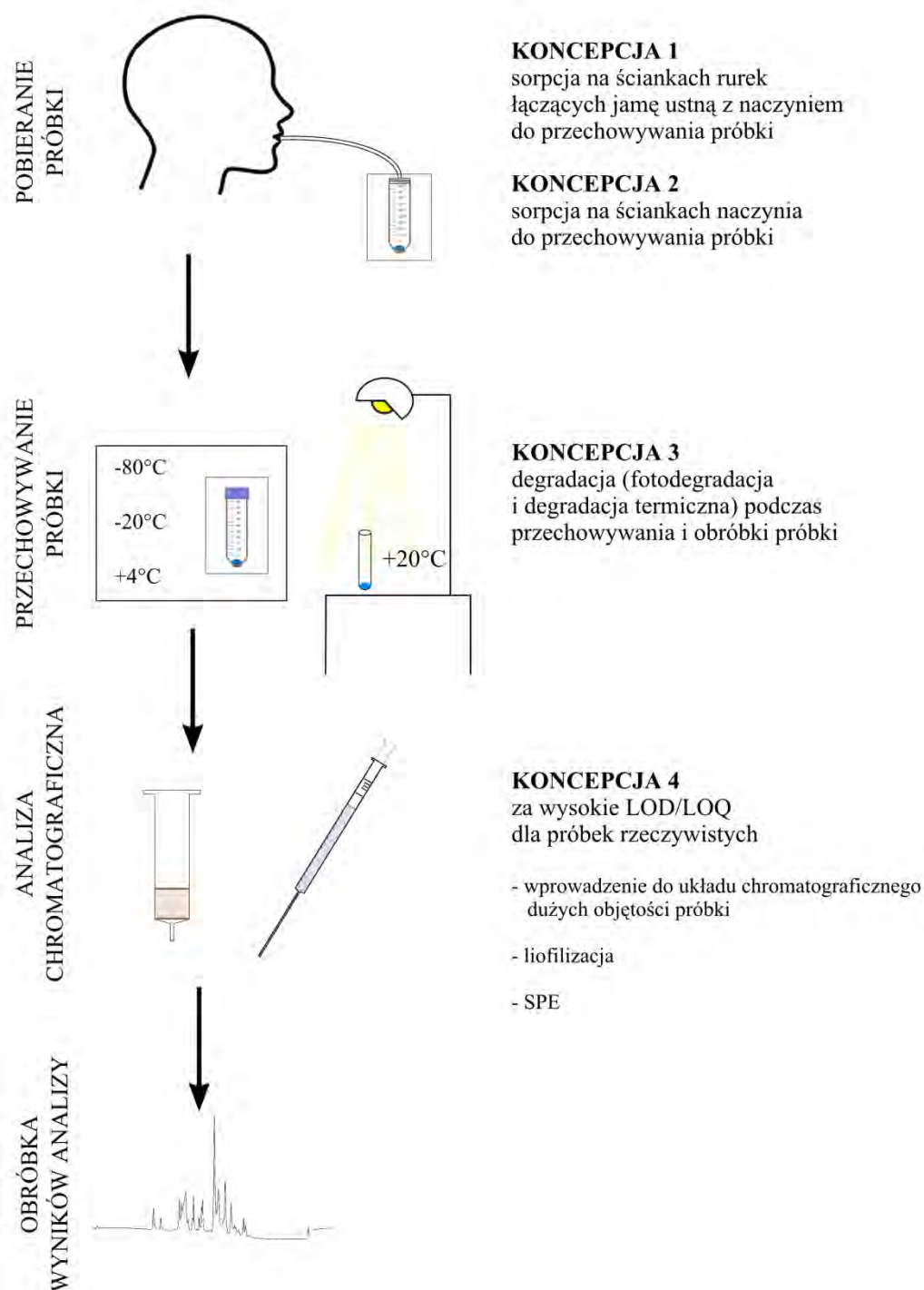
$$LOQ=3 \cdot LOD \quad (2)$$

Obliczone wartości liczbowe granic wykrywalności i oznaczalności opracowanej metody analitycznej oznaczania izoprostanów zestawiono w Tabeli 19.

Tabela 19. Wyznaczone wartości liczbowe granicy wykrywalności i oznaczalności opracowanej metodyki chromatograficznego oznaczania (LC-MS/MS) izoprostanów, 3-nitrotyrozyny i aminokwasów

	Analit	Granica wykrywalności LOD [pg/ml]	Granica oznaczalności LOQ [pg/ml]
Izoprostany	8-iso-15(R)-PGF _{2α}	78	234
	8-iso-PGF _{2α}	49	147
	11β-PGF _{2α}	81	243
	15(R)-PGF _{2α}	89	267
Aminokwasy	3-nitrotyrozyna	20	60
	Alanina	25	75
	Arginina	34	102
	Asparagina	262	786
	Kwas asparaginowy	98	294
	Cysteina	325	975
	Kwas glutaminowy	154	362
	Glutamina	205	615
	Glicyna	428	1284
	Histydyna	22	66
	Hydroksy-4-prolina	49	147
	Lizyna	62	186
	Metionina	28	84
	Fenylalanina	19	57
	Seryna	23	69
	Treonina	31	93
	Tryptofan	32	96
	Tyrozyna	28	84
	Walina	43	129
	Leucyna	58	174
Prolina	38	114	

Zanalizowano 20 próbek EBC dostarczonych przez Ośrodek Medycyny Hiperbarycznej w Gdyni. Przeprowadzone analizy próbek kondensatów wydychanego powietrza na zawartość izoprostanów bez uprzedniego ich przygotowania nie dały zadowalających rezultatów. We wszystkich próbkach stężenie izoprostanów znajdowało się poniżej granicy wykrywalności. W związku z tym postawiono kilka koncepcji wyjaśniających te wyniki (Rysunek 29).



Rysunek 29. Schemat postępowania w trakcie badań stabilności związków z grupy izoprostanów

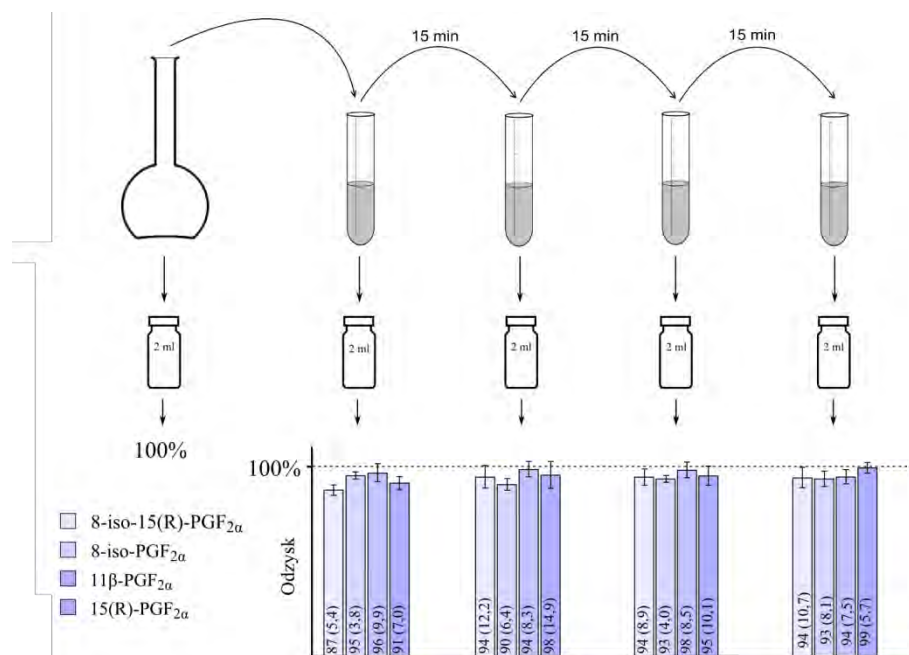
Wszystkie koncepcje zostały doświadczalnie wyjaśnione, a ich szczegółowego omówienia dokonano w rozdziale 5. – optymalizacja etapu przygotowania próbek do analizy chromatograficznej.

Obliczone wartości granicy wykrywalności i oznaczalności dla izoprostanów są wysokie i nie pozwalają na bezpośrednią analizę próbek kondensatów wydychanego powietrza z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS, ponieważ stężenie izoprostanów w tych próbkach według danych literaturowych wynosi średnio 20 pg/ml (poniżej LOD) [13-15]. W związku z tym niezbędne jest wzbogacenie próbek EBC z wykorzystaniem techniki SPE lub liofilizacji. Natomiast oznaczenie aminokwasów w próbkach EBC jest możliwe bez uprzedniego przygotowania próbki EBC.

5. Optymalizacja etapu przygotowania próbek do analizy chromatograficznej

5.1 Badanie procesu sorpcji analitów na powierzchni polipropylenu (wg koncepcji 1 i 2)

Przeprowadzono badania procesu sorpcji analitów na ściankach naczynia polipropylenowego, które były niezbędne do określeniem ewentualnych strat analitów wynikających z ich degradacji.



Rysunek 30. Schemat pobierania próbek oraz odzysk związków z grupy izoprostanów w trakcie badań sorpcji analitów na ściankach naczyń polipropylenowych

W celu określenia wielkości sorpcji analitów na ściankach naczynia, do których były pobierane próbki roztworów kondensatów wydychanego powietrza w szklanym naczyniu sporządzono roztwory wzorcowe mieszaniny izoprostanów o stężeniu 400 pg/ml, które to przelewano do próbki polipropylenowej, a po 15 min próbkę analizowano. Z kolei pozostały roztwór przelewano do następnej próbki polipropylenowej i po 15 min analizowano. Schemat przebiegu doświadczenia wraz z uzyskanymi wynikami odzysku związków z grupy izoprostanów został przedstawiony na Rysunku 30.

Przypuszczenia, co do występowania zjawisk adsorpcji analitów z grupy izoprostanów na powierzchni naczynia polipropylenowego nie zostały potwierdzone. Wyniki zamieszczone na Rysunku 30 wskazują, iż sorpcja analitów na ściankach naczynia w tylko jednym tylko przypadku osiągnęła wartość powyżej 10%. Wyniki analizy kolejnych próbek roztworu wzorcowego nie wskazują na tendencję spadkową odzysku analitów, co wyklucza sorpcje analitów w kolejnych naczyniach, w których były przechowywane.

5.2 Badanie stabilności izoprostanów w próbkach roztworów wzorcowych i kondensatach wydychanego powietrza w różnych warunkach przechowywania (wg koncepcji 3)

Degradacja substancji organicznych jest procesem naturalnym, występującym wszechobecnie. Z analitycznego punktu widzenia należy ocenić wpływ procesów degradacji na poziom zawartości składników śladowych w pobranej próbce na etapie transportu i przechowywania przed etapem oznaczeń końcowych, ale także wpływ tychże procesów na poziomy stężenie składników śladowych w próbkach ekstraktów rozpuszczalnikowych po etapie przygotowania próbek.

Stabilność biomarkerów w próbkach biologicznych jest ściśle związana ze składem matrycy próbki. Próbki krwi muszą być przechowywane w temperaturze -80°C inaczej może dojść do samoistnego utlenienia próbki i zmiany stężenia występujących w niej biomarkerów. Zmiana warunków przechowywania osocza krwi może doprowadzić do wzrostu stężenia izoprostanów w wyniku utleniania się lipidów, które są obecne w tych próbkach [58]. Dlatego też niezbędne jest przeprowadzenie badań wpływu warunków przechowywania próbek na zawartość analitów.

Pierwszy etap badań nad stabilnością związków z grupy izoprostanów został przeprowadzony z wykorzystaniem próbek roztworów wzorcowych, które zostały poddane analizie po okresie przechowywania wynoszącym 1 tydzień. Okres czasu został dostosowany

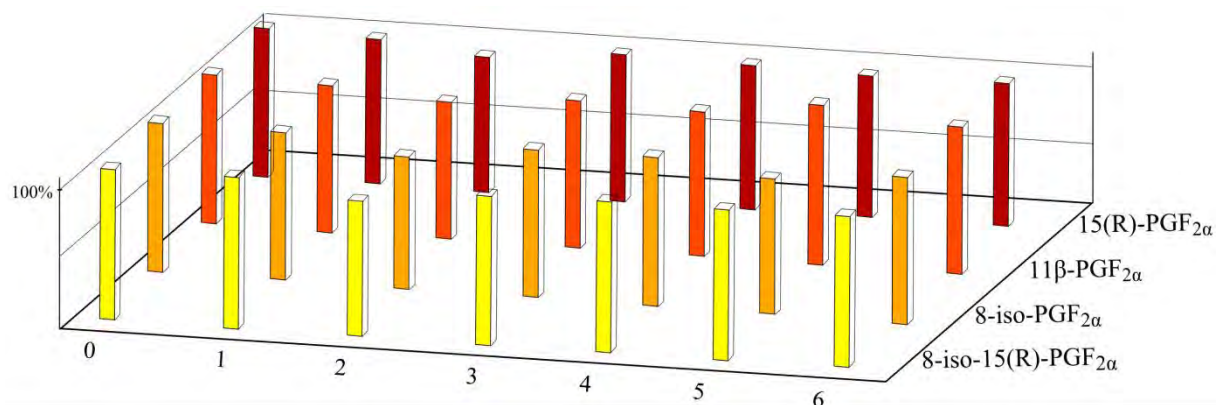
do praktyki laboratoryjnej, według której proces analizy próbek kondensatów wydychanego powietrza będzie zakończony w ciągu 1 tygodnia od momentu ich pobrania.

Próbki kondensatów wydychanego powietrza przechowywane są głównie w temperaturze -80°C , dlatego sprawdzono wpływ kolejnych rozmrożeń i zamrożeń próbki na odzysk związków z grupy izoprostanów. Ponadto sprawdzono wpływ temperatury i nasłonecznienia na stałość stężeń tych związków ze względu na możliwość wystąpienia problemów w trakcie przewożenia próbek z Instytutu Medycyny Hiperbarycznej w Gdyni.

Wszystkie badania prowadzone w ramach wyjaśniania słuszności tez stawianych w ramach koncepcji 3, prowadzono z użyciem roztworu wzorcowego mieszaniny izoprostanów o stężeniu 500 pg/ml przechowywanego w różnych warunkach w szklanych fiolkach i probówkach polipropylenowych.

Kolejne rozmrozenia próbki (zamiana z temperatury -80°C na pokojową)

Przygotowany roztwór wzorcowy izoprostanów umieszczano w lodówce w temperaturze -80°C . Po upływie 30 min próbkę rozmrażano i analizowano trzykrotnie. Ta samą próbkę ponownie umieszczano w lodówce. Schemat ten powtarzano sześciokrotnie, a uzyskane wyniki analiz przedstawiono na Rysunku 29.



Rysunek 31. Odzysk analitów z grupy izoprostanów w trakcie badań nas ich stabilnością podczas kolejnych rozmrożeń roztworu wzorcowego z temperatury -80°C

Otrzymane wyniki analiz próbki roztworu wzorcowego ujawniły, iż kolejne rozmrozenia nie powodują strat analitów, które byłyby statystycznie istotne.

Wpływ temperatury i nasłonecznienia

Ze względu na fakt, iż podczas różnych prac laboratoryjnych próbki EBC poddawane są wpływowi temperatury w zakresie $+4^{\circ}\text{C}$ (lodówka) do temperatury otoczenia oraz naturalnemu i sztuczemu nasłonecznieniu te parametry potraktowano jako zmienne graniczne i zbadano ich wpływ na trwałość związków z grupy izoprostanów.

W Tabeli 20 zestawiono warunki przechowywania roztworów wzorcowych mieszaniny izoprostanów w trakcie badań przeprowadzonych w ciągu siedmiu dni.

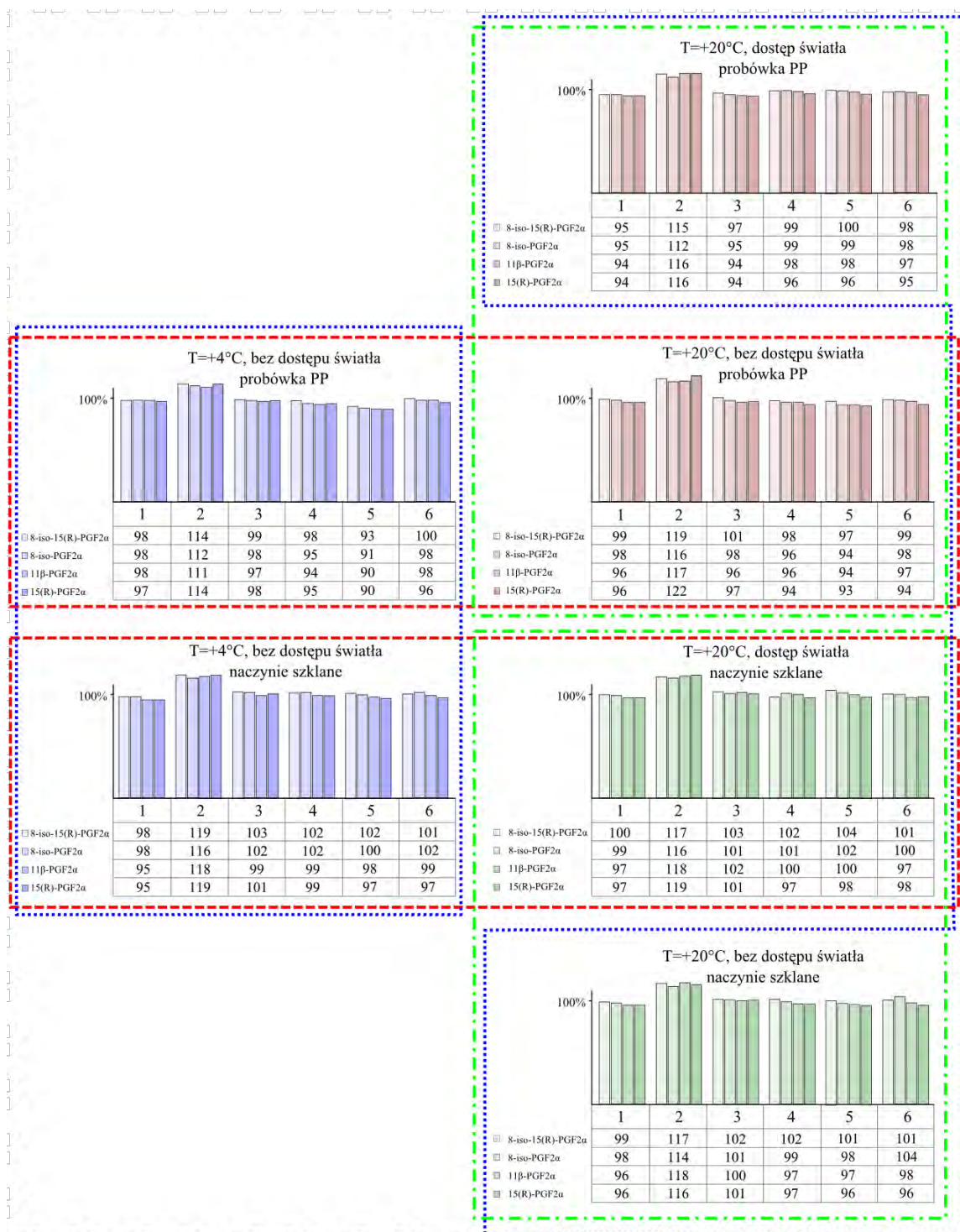
Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że w czasie 7 dni nie nastąpiła istotna zmiana stężenia izoprostanów w próbkach roztworu wzorcowego (Rysunek 32). Można stwierdzić, że warunki przechowywania próbek kondensatów wydychanego powietrza w trakcie tygodnia od pobrania próbki nie wpływają istotnie na wynik analizy końcowej.

Tabela 20. Warunki przechowywania roztworów wzorcowych związków z grupy izoprostanów w trakcie badań stabilności

Temperatura	$+4^{\circ}\text{C}$	$+20^{\circ}\text{C}$	
Nasłonecznienie	Brak dostępu światła	Brak dostępu światła	Dostęp światła
Rodzaj naczynia	Szklane fiolki Probówki PE	Szklane fiolki Probówki PE	Szklane fiolki Probówki PE

W dalszym etapie badań poddawano analizie roztwory wzorcowe przechowywane w temperaturze -80°C , -20°C , $+4^{\circ}\text{C}$ i $+20^{\circ}\text{C}$ przez okres ośmiu tygodni. Wyniki zostały zestawione w Tabeli 21.

Uzyskane wyniki pokazują, iż w próbkach wodnych nie zachodzą istotne wahania stężeń związków z grupy izoprostanów. Roztwory podstawowe izoprostanów w metanolu przechowywane są w temperaturze -20°C , dlatego też można wysnuć wniosek, iż nie będą one ulegały procesowi fotodegradacji i degradacji termicznej oraz sorpcji na ściankach naczyń polipropylenowych i szklanych przed etapem analiz końcowych.



Rysunek 32. Odzysk analitów z próbek roztworów wzorcowych w trakcie badań stabilności składu roztworów w różnych warunkach ich przechowywania

Tabela 21. Odzysk związków z grupy izoprostanów w trakcie badań stabilności

Czas [dni]	Odzysk (%) ± CV(%) (n=4)			
Temperatura -80°C				
	8,15-isoP	8-isoP	11-isoP	15-isoP
0	100 ± 5.8	100 ± 7.8	100 ± 8.9	100 ± 2.5
7	98 ± 6.3	100 ± 3.2	96 ± 1.7	100 ± 3.8
14	98 ± 2.9	96 ± 5.2	96 ± 3.0	99 ± 7.1
21	93 ± 5.3	99 ± 6.9	94 ± 5.4	102 ± 1.0
28	88 ± 3.2	89 ± 6.6	88 ± 2.7	90 ± 4.1
35	92 ± 6.2	98 ± 6.8	93 ± 8.9	96 ± 2.2
42	95 ± 6.0	95 ± 4.6	97 ± 2.9	91 ± 5.3
49	97 ± 2.7	97 ± 2.6	92 ± 8.1	97 ± 2.3
56	94 ± 4.0	93 ± 2.6	89 ± 1.5	92 ± 4.6
Temperatura -20°C				
0	100 ± 5.8	100 ± 7.8	100 ± 8.9	100 ± 2.5
7	99 ± 2.4	99 ± 3.2	99 ± 5.0	97 ± 0.3
14	93 ± 4.6	97 ± 1.6	91 ± 2.1	97 ± 5.2
21	95 ± 4.8	93 ± 1.9	95 ± 1.8	92 ± 3.8
28	90 ± 3.2	92 ± 1.8	92 ± 3.8	95 ± 6.0
35	92 ± 5.0	96 ± 7.4	100 ± 7.1	99 ± 10.6
42	96 ± 4.2	96 ± 4.2	96 ± 4.2	96 ± 4.2
49	94 ± 5.3	97 ± 4.4	95 ± 9.7	96 ± 2.8
56	91 ± 1.6	94 ± 4.8	90 ± 2.4	91 ± 6.2
Temperatura +4°C				
0	100 ± 5.8	100 ± 7.8	100 ± 8.9	100 ± 3.4
7	93 ± 3.1	93 ± 2.7	94 ± 4.2	100 ± 2.9
14	92 ± 4.8	93 ± 2.4	91 ± 1.4	97 ± 5.8
21	83 ± 6.8	86 ± 3.9	87 ± 2.7	82 ± 5.4
28	88 ± 0.2	93 ± 3.0	92 ± 4.0	92 ± 8.8
35	96 ± 1.5	101 ± 11.1	98 ± 8.5	98 ± 7.9
42	95 ± 1.7	95 ± 1.7	95 ± 1.7	95 ± 1.7
49	94 ± 1.1	94 ± 3.0	93 ± 4.3	100 ± 3.6
56	93 ± 0.3	96 ± 8.1	93 ± 4.2	95 ± 3.4
Temperatura +20°C				
0	100 ± 5.8	100 ± 7.8	100 ± 8.9	100 ± 2.1
7	94 ± 3.1	94 ± 2.4	95 ± 4.6	99 ± 1.5
14	93 ± 5.5	91 ± 2.4	91 ± 4.9	94 ± 2.6
21	80 ± 6.9	83 ± 1.6	80 ± 1.5	80 ± 3.0
28	85 ± 0.4	96 ± 1.8	88 ± 0.4	90 ± 0.3
35	95 ± 1.5	97 ± 2.0	98 ± 1.1	100 ± 1.4
42	95 ± 2.3	95 ± 2.3	95 ± 2.3	95 ± 2.3
49	93 ± 0.9	95 ± 0.3	87 ± 0.7	93 ± 0.9
56	91 ± 0.7	92 ± 1.1	88 ± 0.3	95 ± 0.7

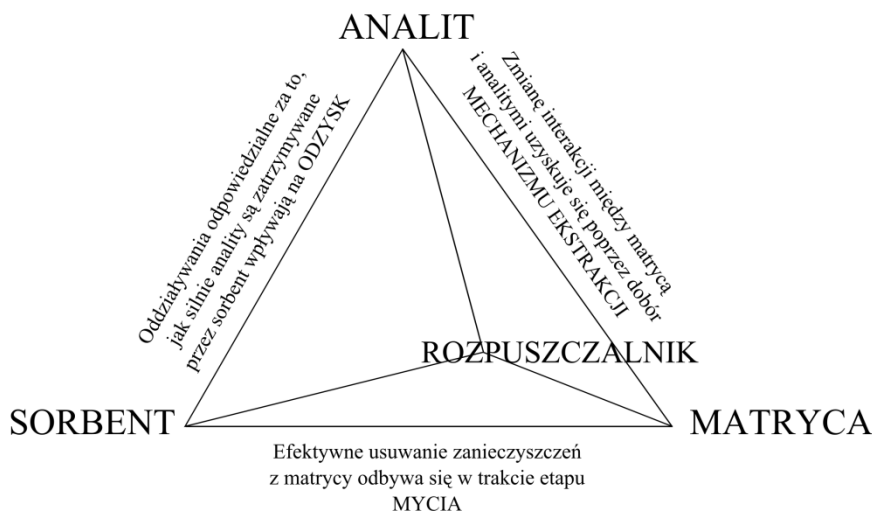
5.3 Optymalizacja parametrów etapu wzbogacania próbki i izolacji związków z grupy izoprostanów (wg koncepcji 4)

Etap przygotowania próbki jest najważniejszym elementem każdej procedury wykorzystywanej w analityce próbek o złożonym składzie matrycy, gdy konieczne jest oznaczenie składników śladowych i ultraśladowych. Jest to etap niezbędny dla próbek o skomplikowanym składzie matrycy, dużej ilości substancji przeszkadzających lub o niewielkiej zawartości interesujących analitów. W badaniach na etapie przygotowania próbek sprawdzono przydatność techniki ekstrakcji do fazy stałej oraz liofilizacji jako technik wzbogacania i izolacji związków z grupy izoprostanów.

W przypadku techniki SPE znalezienie optymalnego układu do konkretnego zastosowania może nastręczać kłopotów, albowiem dobór ten zależy od:

- właściwości (struktury, polarności, pKa, obecności grup funkcyjnych, rozpuszczalności) i stężenia analitów,
- właściwości sorbentu (struktura, grupy funkcyjne, ilość),
- właściwości matrycy próbki (skład, rodzaj, stężenia substancji przeszkadzających).

Zależności pomiędzy sorbentem, analitem a rozpuszczalnikiem stosowanym w SPE przedstawiono na Rysunku 33.



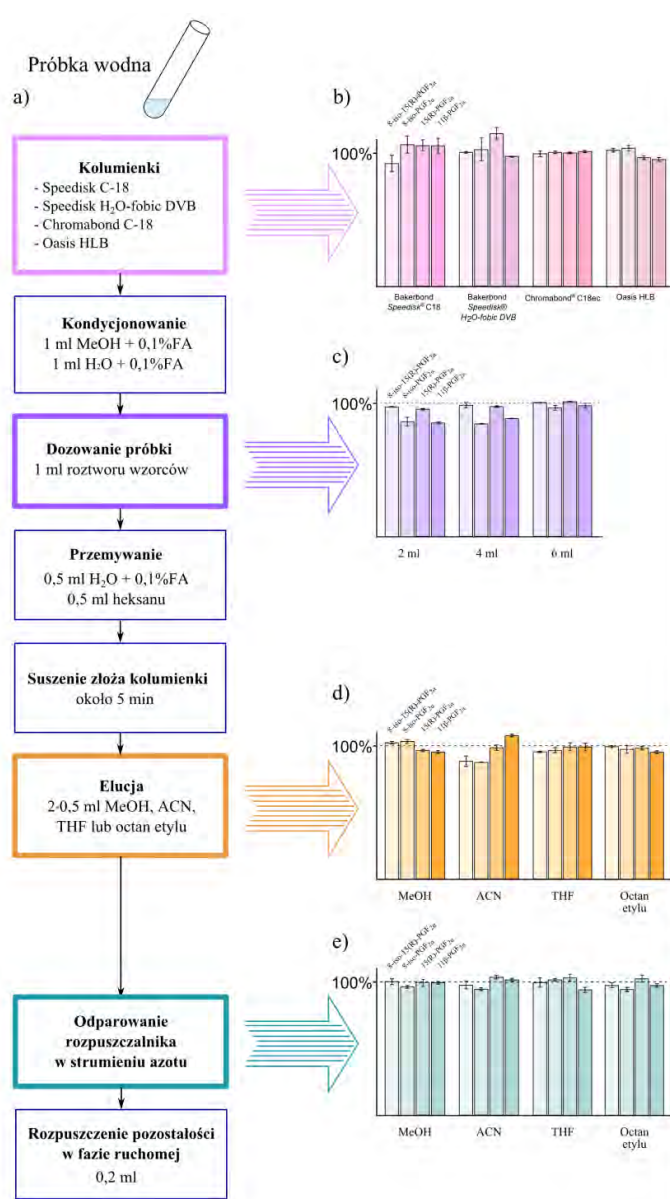
Rysunek 33. Schemat zależności występujących pomiędzy głównymi czynnikami podczas optymalizacji parametrów etapu wzbogacania próbki i izolacji analitów z wykorzystaniem techniki SPE

Dobranie optymalnych warunków prowadzenia procesu przygotowania próbki z wykorzystaniem techniki SPE dokonano zgodnie ze schematem przedstawionym na Rysunku 34a.

5.3.1. Optymalizacja parametrów przygotowania próbki z wykorzystaniem ekstrakcji do fazy stałej (wg koncepcji 4)

Badanie przydatności różnego typu sorbentów

Sprawdzono przydatność różnego typu złóż sorbentów dostępnych na rynku pozwalających na wzbogacenie izoprostanów z próbek o charakterze wodnym. W tym celu sporządzono roztwory, w których każdy z izoprostanów występował w stężeniu równym 200 pg/ml. W trakcie prowadzonych badań do kolumnienki ekstrakcyjnej zawierającej złożo odpowiedniego sorbentu (ich charakterystyka jest zaprezentowana w Tabeli 22) wprowadzono próbkę roztworu wzorcowego o objętości 1 ml (zgodnie z procedurą przedstawioną na Rysunku 34a).



Rysunek 34. Schemat przygotowania próbek EBC do analizy z wykorzystaniem techniki SPE, a) próbka wodna, b) odzysk izoprostanów z roztworów wzorcowych w zależności od zastosowanego

typu sorbentu w kolumnie ekstrakcyjnej, c) wpływ objętości próbki na odzysk izoprostanów z próbek roztworów wzorcowych, d) wpływ rozpuszczalnika użytego do elucji izoprostanów ze złoża sorbentu w kolumnie ekstrakcyjnej na odzysk analitów, e) wpływ rozpuszczalnika organicznego użytego podczas etapu odparowania ekstraktów na odzysk analitów

Tabela 22. Charakterystyka złożów sorbentów kolumniek ekstrakcyjnych używanych podczas optymalizacji techniki przygotowania próbki

Nazwa złoża sorbentu	Charakterystyka	Zastosowanie
BAKERBOND Speedisk® C18	typ wypełnienia: żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi; średnica porów: 60 Å średnica ziarna: 40 µm powierzchnia właściwa: 480 m ² /g zakres pH: 2-10 masa złoża sorbentu: 100 mg	do wzbogacania związków niejonowych, niepolarnych do umiarkowanie polarnych
BAKERBOND Speedisk® H₂O-fobic DVB	typ wypełnienia: polimer diwinylobenzen średnica porów: 200 Å średnica ziarna: 10 µm zakres pH: 1-14 masa złoża sorbentu: 100 mg	do oznaczania związków od słabopolarnych do niepolarnych
CHROMABOND® C18 ec	typ wypełnienia: żel krzemionkowy modyfikowany grupami oktadecylowymi, średnica porów: 60 Å średnica ziarna: 45 µm powierzchnia właściwa: 500 m ² /g zakres pH: 2-8 masa złoża sorbentu: 200 mg	do oznaczania szerokiej gamy związków organicznych na zasadzie oddziaływań hydrofobowych oczyszczanie próbek zawierających związki o różnej polarności
Oasis HLB	typ wypełnienia: kopolimer <i>N</i> -winylopyrolidonu i diwinylobenzenu średnica porów: 80 Å średnica ziarna: 30 µm zakres pH: 0-14 masa złoża sorbentu: 10 mg	do oznaczania związków polarnych i niepolarnych; zaleta: nie jest wymagany etap kondycjonowania złoża sorbentu

Uzyskane wyniki (Rysunku 34b) wskazują, że zastosowane złoża sorbentów są odpowiednie do wzbogacania izoprostanów z próbek wodnych (odzysk we wszystkich przypadkach przekraczał > 90%). Jednakże można wysnuć konkluzję, iż wypełnienia kolumniek typu CHROMABOND® C18 ec i Oasis HLB pozwalają na uzyskiwanie danych obarczonych mniejszym rozrzutem wyników (którego miarą jest wartość liczbowa odchylenia standardowego dla zbioru wyników) niż kolumnieki typu *Speedisk*.

Duża wartość liczbowa odchylenia standardowego uzyskana w przypadku zastosowania kolumniek typu *Speedisk* (w tłumaczeniu znanych pod nazwą kolumniek do szybkich

ekstrakcji) może być spowodowana charakterystyką wypełnienia, albowiem wypełnienie stanowi zestaw filtrów, które pozwalają na uzyskiwanie dużego natężenia przepływu strumienia próbki przez kolumnkę ekstrakcyjną. Z kolei duże natężenia przepływu powodować może straty analitów spowodowane niecałkowitą sorpcją na złożu kolumnki.

Obserwowane przez wielu analityków stężenie izoprostanów w próbkach EBC nie przekracza wartości do 100 pg/ml, a w próbkach osocza 10 ng/ml dlatego, też do dalszej optymalizacji procedury przygotowania próbki wybrano kolumnki ze złożem sorbentu Oasis HLB, o masie 10 mg, przystosowane do próbek o niewielkiej objętości.

Badanie wpływu objętości próbki na odzysk izoprostanów

W celu określenia wpływu objętości próbki wprowadzonej do kolumnki ekstrakcyjnej na odzysk analitów sporządzono próbkę zawierającą mieszaninę izoprostanów i wzorca wewnętrznego. Do kolumnek ekstrakcyjnych wprowadzano próbki roztworu wzorcowego o objętości odpowiednio 2, 4 i 6 ml. Dalej postępowano zgodnie z procedurą przygotowania próbki przedstawiona na Rysunku 34a.

Uzyskane wyniki (Rysunek 34c) wskazują, że objętość próbki, nawet sześciokrotnie przewyższająca normalną objętość kondensatu wydychanego powietrza zebranego podczas 15-minutowego okresu pobierania próbek, nie wpływa na odzysk izoprostanów z próbek roztworów wzorcowych.

Wpływ rodzaju rozpuszczalnika na odzyska analitów

Dobierając rozpuszczalnik na etapie elucji analitów należy zwrócić uwagę na:

- właściwości fizyko-chemiczne analitów,
- właściwości matrycy próbki,
- wykorzystywany mechanizm retencji analitów.

Należy również uwzględnić polarność rozpuszczalnika, mieszalność z wodą oraz jego lotność.

W trakcie badań sprawdzono czy zastosowanie różnego rodzaju rozpuszczalników nie powoduje strat w trakcie odparowania jego nadmiaru z wykorzystaniem gazu obojętnego. W tym celu sporządzono roztwory wzorcowe mieszaniny izoprostanów i wzorca wewnętrznego w odpowiednich rozpuszczalnikach (metanol, acetonitryl, tetrahydrofuran, octan etylu). Roztwory wzorcowe o objętości 1 ml odparowano do sucha w strumieniu azotu w temperaturze 25°C z wykorzystaniem urządzenia *Turbovap LV Caliper Lifesciences*.

Suchą pozostałość rozpuszczono 0,2 ml roztworu fazy ruchomej (mieszanina 50% MeOH/ACN + 0,01% FA i 50% H₂O + 0,01% FA). Proces odparowywania roztworów wzorcowych prowadzony był pod ścisłą kontrolą. Objętościowe natężenie przepływu strumienia gazu obojętnego (N₂) dobrano tak by próbki nie były rozpraszane na ściankach naczynia. Wyniki przedstawione na Rysunku 34e potwierdzają, iż nie stwierdzono strat analitów na etapie odparowania rozpuszczalnika.

W dalszych badaniach nad doбором rozpuszczalnika używanego do elucji analitów ze złoża kolumnienki ekstrakcyjnej wykorzystano wszystkie cztery rozpuszczalniki. Postępując zgodnie ze schematem przygotowania próbki, na złożo kolumnienki ekstrakcyjnej wprowadzano 1 ml próbki roztworu wzorcowego, a następnie anality wymyto rozpuszczalnikiem o objętości 1 ml. Etap ten przeprowadzono przez zadozowanie dwóch porcji rozpuszczalnika po 0,5 ml w odstępie 5 minut, co zwiększa stopień odzysku analitów.

Ekstrakty rozpuszczalnikowe zostały odparowane a sucha pozostałość rozpuszczona w próbce fazy ruchomej. Wpływ rodzaju rozpuszczalnika użytego do elucji ze złoża sorbentu w kolumnie ekstrakcyjnej na odzysk izoprostanów pokazano na Rysunku 34d.

Używając metanolu, tetrahydrofuranu i octanu etylu osiągnięto odzyski izoprostanów powyżej 95%, dla acetonitrylu te wartości były niższe i obarczone były dużą wartością liczbową odchylenia standardowego. Do dalszej optymalizacji procedury SPE wybrano metanol, którego koszt zakupu jest około pięciokrotnie niższy niż tetrahydrofuranu.

Badanie wpływu przemywania złoża sorbentu n- heksanem na odzysk izoprostanów

Z uwagi na konieczność usuwania substancji o charakterze lipofilowym z próbek osocza, do procedury przygotowania próbki z wykorzystaniem techniki SPE konieczne jest włączenie etapu przemywania złoża za pomocą n-heksanu.

W związku z tym po wprowadzeniu 1 ml próbki roztworu wzorcowego na złożo kolumnienki ekstrakcyjnej, złożo to przemywano 1 ml wody zakwaszonej kwasem mrówkowym, suszono strumieniem azotu (2 min), a następnie przemywano 1 ml n-heksanu. Złożo sorbentu ponownie suszono, a anality eluowano z wykorzystaniem 1 ml metanolu. Podczas stosowania takiego toku postępowania nie stwierdzono istotnych strat izoprostanów.

5.3.2. Optymalizacja parametrów przygotowania próbki z wykorzystaniem liofilizacji jako techniki wzbogacania

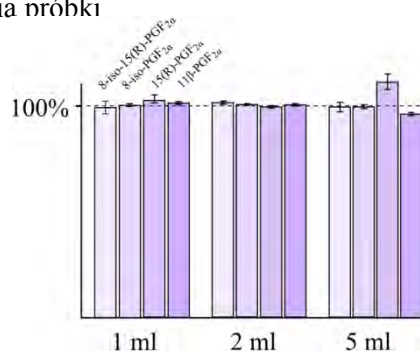
Liofilizacja jest techniką wzbogacania próbek przydatną dla związków zarówno stabilnych jak i niestabilnych termicznie. Poprzez obniżenie temperatury oraz ciśnienia (poniżej 10 Pa) możliwa jest sublimacja rozpuszczalnika. Stosując tę technikę dla próbek kondensatów wydychanego powietrza można uzyskać nawet 20-krotne wzbogacenie analitu w próbce przygotowanej do analizy chromatograficznej.

Wpływ objętości próbki na odzysk analitów

W celu określenia wpływu objętości próbki na odzysk analitów w procesie liofilizacji przygotowano próbki wodne, które zamrożono w temperaturze -80°C , a następnie poddawano liofilizacji w temperaturze -50°C , pod ciśnieniem 0,027 mBar przez okres 24 godzin. Po tym czasie próbki rozpuszczane były w 250 μl fazy ruchomej i poddawane analizie chromatograficznej. Obliczony odzysk analitów obrazują dane zestawione w Tabeli 23.

Tabela 23. Wpływ objętości próbki roztworu wzorcowego izoprostanów na odzysk analitów po zastosowaniu liofilizacji jako techniki wzbogacania próbki

Analit	Odzysk [%] (CV, n=3)		
	1 ml	2 ml	5 ml
1	99 (6,2)	101 (2,1)	99 (1,4)
2	100 (1,90)	100 (1,0)	99 (0,7)
3	102 (4,0)	99 (1,7)	111 (2,3)
4	101 (1,9)	100 (1,7)	96 (0,6)



Duże odzyski izoprostanów świadczą o możliwości zastosowania liofilizacji, jako techniki przygotowania próbek kondensatów wydychanego powietrza do analizy chromatograficznej w celu oznaczania izoprostanów. Należy jednak rozważyć czy zalety liofilizacji takie jak:

- wydajność,
- niski koszt,
- mała pracochłonność

przeważają nad faktem, iż jest ona bardzo czasochłonna, a wraz ze wzbogaceniem izoprostanów wzbogaceniu ulegają wszystkie substancje obecne w kondensatach wydychanego powietrza. Fakt ten może negatywnie wpłynąć na wartość liczbową granicy oznaczalności całej metodyki analitycznej w stosunku do granicy oznaczalności innych

możliwych rozwiązań metodycznych, w których wykorzystuje się technikę ekstrakcji do fazy stałej, która oprócz wzbogacenia umożliwi również oczyszczenie próbki. W porównaniu z próbkami biologicznymi takimi, jak mocz lub krew, w których stężenie substancji nielotnych i soli jest duże, próbki EBC charakteryzują się mało skomplikowanym składem matrycy (99,9% wody). Liofilizacja, jako technika wzbogacania analitów jest odpowiednia dla próbek o prostym składzie matrycy właśnie takich jak kondensaty wydychanego powietrza.

6. Próbki do badań

Opracowane metodyki oznaczania izoprostanów, 3-nitrotyrozyny i aminokwasów zastosowano do przeprowadzenia analiz próbek kondensatów wydychanego powietrza oraz próbek osocza myszy.

6.1. Próbki EBC

Ze względu na stosunkowo prosty skład matrycy próbki EBC należy traktować jako idealny typ materiału biologicznego do badań analitycznych. W zależności od oznaczanego biomarkera próbki te mogą być poddane natychmiastowej analizie bez uprzedniego przygotowania (np. oznaczanie białek przy pomocy testów immunoenzymatycznych). W przypadku stosowania techniki chromatografii cieczowej na etapie rozdzielania analitów przed ich oznaczeniem konieczne jest przeprowadzenie etapu wzbogacenia analitów.

Wyniki analiz próbek EBC mają na celu potwierdzenie występowania stresu oksydacyjnego, bezpośrednio ujawniającego się w układzie oddechowym, u osób palących tytoń lub poddawanych terapii z wykorzystaniem zwiększonego stężenia tlenu.

Próbki kondensatów wydychanego powietrza składają się z cząsteczek aerozolu płynu wyściełającego układ oddechowy (zawierającego nielotne substancje rozpuszczalne w wodzie), skondensowanej pary wodnej oraz lotnych substancji rozpuszczalnych w wodzie.

W trakcie studium doktoranckiego przeprowadzono badania przesiewowe zawartości izoprostanów, 3-nitrotyrozyny i aminokwasów w próbkach EBC pobranych od studentów Politechniki Gdańskiej oraz pacjentów Instytutu Medycyny Hiperbarycznej w Gdyni. Próbki pobierane były z wykorzystaniem urządzenia *TurboDeccs*. Polegało to na oddychaniu w normalny sposób przez ustnik (10-15 min) z jednocześnie zatkany nos. Ilość zebranego w tym czasie kondensatu była różna i wynosiła od 0,8 do 2 ml, zależało to głównie od czasu pobierania próbki, jak również od objętości płuc. Do czasu analizy próbki przechowywane były w temperaturze -80°C.

Tabela 24. Charakterystyka pacjentów Instytutu Medycyny Hiperbarycznej w Gdyni

Próbka nr	Wiek	Waga	Wzrost	BMI	Palenie tytoniu [szt. papierosów dziennie]
1	35	100	187	28,6	nie
2	23	97	185	28,3	tak [4]
3	21	82	187	23,5	tak [20]
4	28	60	167	21,5	nie
5	28	96	186	27,8	tak [12]
6	24	69	170	23,9	tak [20]
7	22	86	184	25,4	nie
8	31	68	168	24,1	nie
9	21	67	174	22,1	tak [20]
10	42	76	174	25,1	nie
11	39	78	176	25,2	nie
12	41	80	176	25,8	nie
13	33	83	180	25,6	nie
14	35	97	182	29,3	nie
15	32	75	173	26,2	nie
16	39	78	170	27,2	nie
17	32	84	176	27,1	nie
18	24	83	183	24,8	nie
19	31	82	180	25,3	nie
20	28	86	184	25,4	nie
21	28	84	181	25,6	nie
22	29	89	183	26,6	nie
23	24	93	190	25,8	nie
24	30	79	182	23,8	nie
25	33	69	165	25,3	nie
Średnia	30,1	81,6	178,5	25,6	

Próbki uzyskane z Instytutu Medycyny Hiperbarycznej w Gdyni zostały pobrane od żołnierzy poddawanych „testowi tolerancji tlenowej”, który wykonuje się w komorach hiperbarycznych pod ciśnieniem 280 kPa w czasie 30 minut. Test ten ma za zadanie ujawnienie indywidualnej wrażliwości na zatrucie tlenem. Wysokie cząstkowe ciśnienie tlenu może doprowadzić do wystąpienia takich objawów jak drżenie mięśni, zawrotów głowy, nudności, a w ciężkich przypadkach nawet konwulsji. Testy tolerancji tlenowej wykonywane są u osób pracujących w jednostkach specjalnych, wojsku i policji związanych z nurkowaniem zawodowym. Kondensaty wydychanego powietrza były pobierane od żołnierzy przed i po badaniu w komorze hiperbarycznej. Podstawowe informacje na temat osób od których pobierane były próbki EBC i osocza zostały przedstawione w Tabeli 24.

6.2. Próbki osocza

Do badań występowania stresu oksydacyjnego wykorzystano próbki osocza krwi pobieranej od żołnierzy poddawanych testowi tolerancji tlenowej w Instytucie Medycyny Hiperbarycznej w Gdyni, a także próbki osocza myszy otrzymane dzięki współpracy z Katedrą Chemii, Technologii i Biotechnologii Żywności Politechniki Gdańskiej.

Analiza próbek osocza myszy była prowadzona w celu ujawnienia występowania stresu oksydacyjnego w trakcie podawania myszom doksorubicyny lub wodoronadtlenku tert-butylu. Ponadto grupie zwierząt podawano dodatkowo sok z buraka, który miał zmniejszyć stres oksydacyjny i tym samym powodować zmniejszenie poziomu stężeń związków z grupy izoprostanów (ze względu na występowanie w soku związków przeciwutleniających).

Doksorubicyna jest szeroko stosowanym lekiem przeciwnowotworowym wywołującym działanie toksyczne na organizm powodując efekty takie jak: nudności, anemia, łysienie, niepłodność, uszkodzenia nerek. Wodoronadtlenek tert-butylu jest wykorzystywany w różnych procesach utleniania, w przemyśle używa się go jako startera w polimeryzacji rodnikowej.

W ramach badań przeprowadzono analizę próbek osocza myszy, która była pobierana od myszy podzielonych na 5 grup. Zwierzęta (samce F1 (C57BL/6xDBA/2)) były trzymane w plastikowych klatkach. Grupy zawierały po 6-7 osobników w grupach I i II, natomiast grupy którym podawane były związki wywołujące stres oksydacyjny zawierały po 4-5 osobników.

- grupa I – grupa kontrolna

Przez 7 dni myszy karmione były granulowaną karmą i pojone wodą. Zwierzętom wstrzykiwano roztwór soli fizjologicznej w objętości odpowiadającej dawkom doksorubicyny i wodoronadtlenku tert-butylu podawanym w grupach III-V na 2 h przed pobraniem próbki.

- grupa II – BRJ

Myszy zamiast wody pojone były przez 7 dni sokiem z buraka czerwonego oraz tak jak w grupie I przed pobraniem próbki wstrzyknięto im roztwór soli fizjologicznej.

- grupa III – DOX

W tej grupie zwierzętom po 7 dniach podawania wody i karmy wstrzykiwano pojedynczą dawkę toksyczną doksorubicyny (20 mg/kg) na 2 h przed pobraniem próbki.

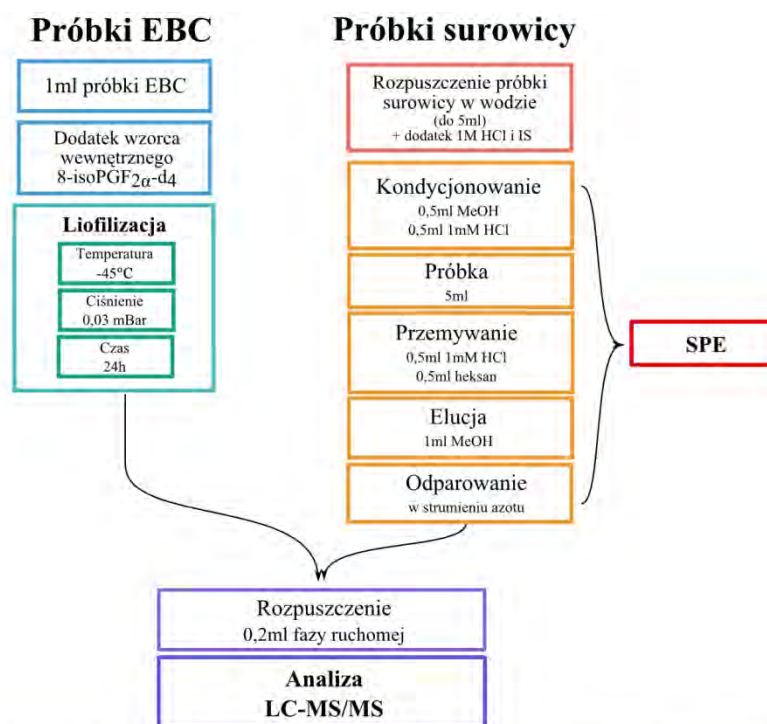
- grupa IV – DOX + BRJ

Zwierzętom podawano przez 7 dni sok z buraka oraz 2 h przed pobraniem próbki wstrzykiwano dawkę toksyczną doksorubicyny (20 mg/kg).

- grupa V – TBHP

Przez 7 dni myszom podawana była karma i woda. Na 2 h przed pobraniem próbki wstrzykiwano im wodoronadtlenek tert-butylu (1,35 mg/kg).

7. Procedura oznaczania związków z grupy izoprostanów, 3-nitrotyrozyny i aminokwasów z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS



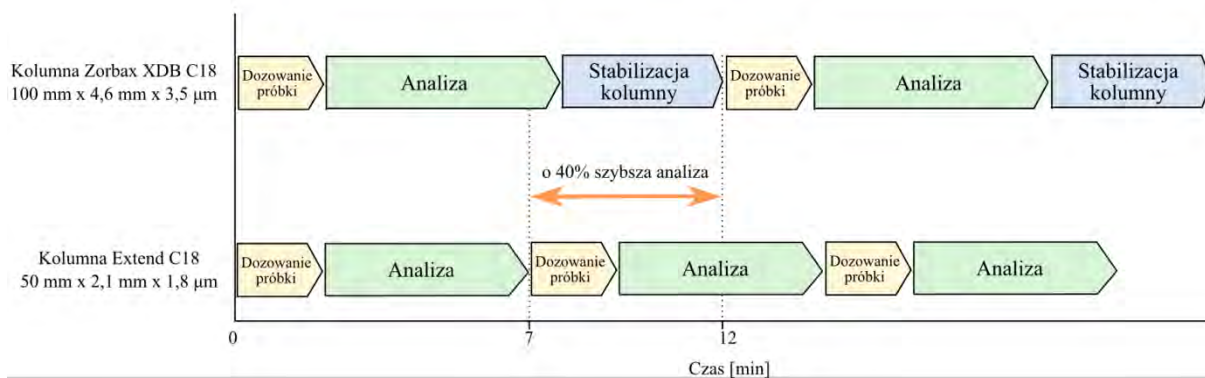
Optymalne warunki pracy układu chromatograficznego			Optymalne parametry pracy detektora MS/MS			
	IZOPROSTANY	3-NITROTYROZYNA + AMINOKWASY	Jonizacja: ESI			
Kolumna	EBC <i>Agilent Extend C-18</i> 50x2,1 mm, 1,8 μm Surowica <i>Zorbax XDB C-18</i> 100x4,6 mm, 3,5 μm	EBC Ascentis®Si 150x2,1 mm, 5 μm	Tryb tworzenia jonów	IZOPROSTANY	3-NITROTYROZYNA	AMINOKWASY
				ujemny	dodatni	dodatni
			Parametr	Przebieg jonów		
				353 → 193	227 → 181	Zakres parametrów dla 19 aminokwasów
Skład fazy ruchomej	EBC Składnik A H ₂ O + 0,01% FA Składnik B ACN + 0,01% FA Surowica Składnik A H ₂ O + 0,01% FA Składnik B MeOH/ACN + 0,01% FA	Składnik A H ₂ O + 0,01% FA Składnik B ACN + 0,01% FA 1:1 (v:v)	DP	-115 V	60 V	20-120 V
Skład fazy ruchomej	EBC 74% A - 26% B Surowica 50% A - 50% B	24% A - 76% B	EP	-10 V	7 V	10 V
Natężenie przepływu strumienia fazy ruchomej	EBC 0,35 ml/min Surowica 1 ml/min	1 ml/min	CXP	-15 V	10 V	15 V
Temperatura termostatowania kolumny	40°C	20°C	CE	-33 V	13 V	7-41 V
Objętość dozowanej próbki	100 μl	10 μl	GS1	60 V	60 V	30 V
			GS2	80 V	20 V	40 V
			TEM	550°C	550°C	550°C
			CUR	20 V	30 V	10 V
			IS	4200 V	4200 V	4200 V

Rysunek 35. Schemat procedury oznaczania związków z grupy izoprostanów i 3-nitrotyrozyny w próbkach biologicznych

Przeprowadzone badania optymalizacyjne etapu wzbogacania próbek kondensatów wydychanego powietrza i osocza oraz doboru warunków prowadzenia analizy chromatograficznej umożliwiły opracowanie procedury oznaczania biomarkerów stresu oksydacyjnego

w próbkach biologicznych z wykorzystaniem techniki HPLC-MS/MS, która została przedstawiona schematycznie na Rysunku 35.

Do oznaczania biomarkerów stresu oksydacyjnego w próbkach kondensatów wydychanego powietrza wygrano kolumnę Zorbax Extend 50mm × 2,1 mm × 1,8µm (mała średnica wewnętrzna i niewielkie uziarnienie). Parametry te umożliwiają uzyskanie pików o małej szerokości, a tym samym o większej intensywności sygnału, co w konsekwencji prowadzi do obniżenia granicy wykrywalności. Inne zalety stosowania krótkich kolumn wypełnionych fazą stacjonarną o niewielkim uziarnieniu to zmniejszenie zużycia rozpuszczalników, ponieważ pracują one przy znacznie niższym objętościowym natężeniu przepływu strumienia fazy ruchomej. Użycie kolumn o takich parametrach, charakteryzujących się wysoką sprawnością, pozwala na zastosowanie programu elucji izokratycznej. Brak konieczności stabilizowania kolumny chromatograficznej umożliwia dalsze zmniejszenie zużycia rozpuszczalników a także analizę większej ilości próbek w krótszym czasie (Rysunek36).

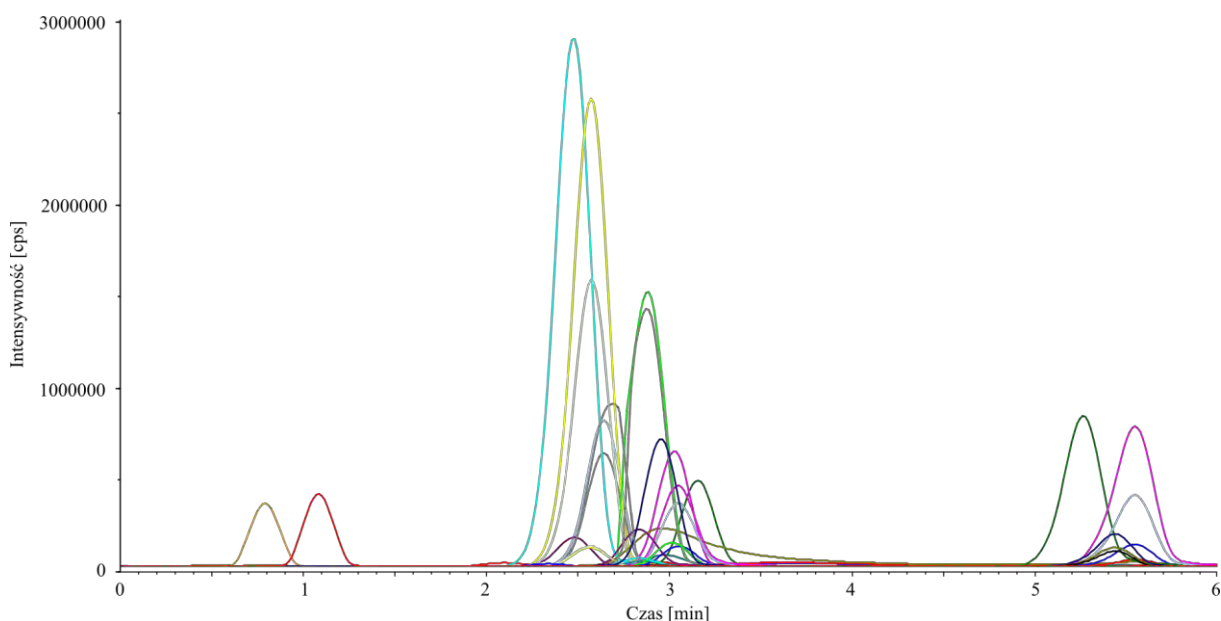


Rysunek 36. Porównanie czasu trwania analiz chromatograficznych uzyskanych przez zastosowanie kolumn chromatograficznych o różnych wymiarach

7.1. Parametry pracy układu chromatograficznego do rozdzielania 3-nitrotyrozyny i aminokwasów w próbkach EBC

W celu oznaczenia aminokwasów i 3-nitrotyrozyny niezbędne było zakwaszenie fazy ruchomej kwasem mrówkowym, co pozwalało na uzyskanie analitów w formie

niejonizowanej, prowadząc do wydłużenia czasów retencji w kolumnie chromatograficznej oraz wzmocnienia jonizacji analitów w detektorze.



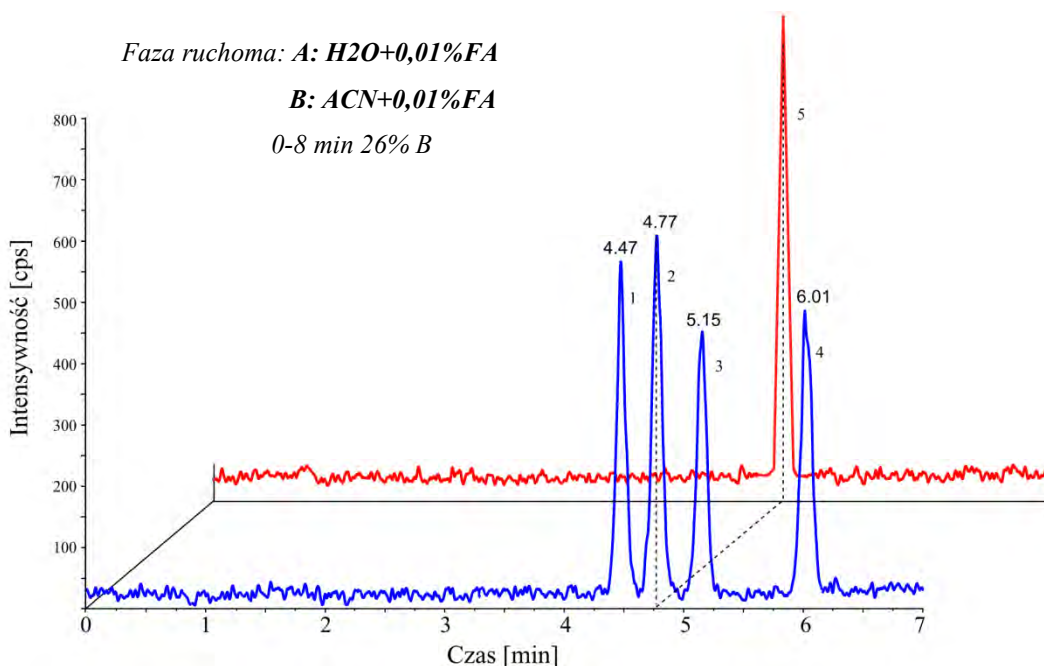
Rysunek 37. Chromatogram uzyskany w wyniku analizy próbki roztworu wzorcowego 3-nitrotyrozyny i mieszaniny 20 aminokwasów

Ze względu na różnice w polarności oznaczanych związków niezbędne było dostosowanie proporcji składników fazy ruchomej by nie eluowały one w czasie martwym kolumny chromatograficznej. Satisfakcjonujące wyniki uzyskano analizując próbki roztworów wzorcowych w warunkach elucji gradientowej o początkowym składzie fazy ruchomej 24:76 (woda:acetonitryl + dodatek 0,01% kwasu mrówkowego). Na Rysunku 37 przedstawiono chromatogram uzyskany w wyniku analizy próbki roztworu wzorcowego mieszaniny 3-nitrotyrozyny i aminokwasów.

7.2. Parametry pracy układu chromatograficznego do rozdzielania związków z grupy izoprostanów w próbkach EBC i próbkach osocza myszy

Obecność w strukturze izoprostanów łańcuchów węglowodorowych powoduje, iż związki te wykazują znaczną retencję w kolumnie chromatograficznej. Całkowite rozdzielanie izoprostanów, w możliwie krótkim, czasie osiągnięto przez zastosowanie elucji gradientowej dla próbek osocza i elucji izokratycznej w przypadku próbek EBC.

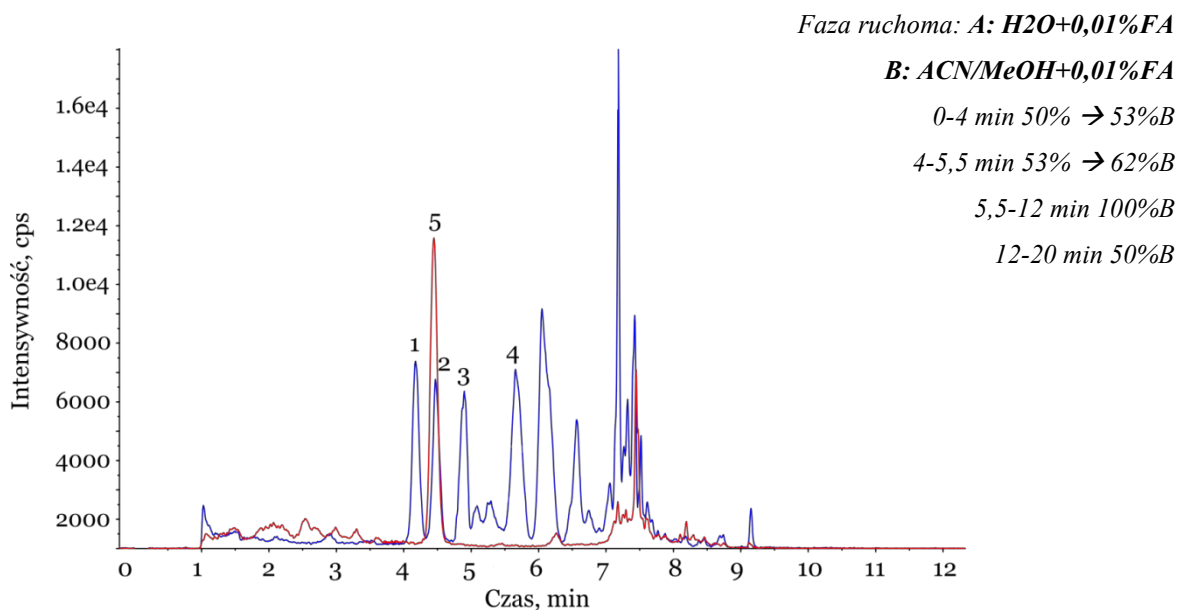
Chromatogram uzyskany w wyniku analizy próbki EBC z dodatkiem roztworu wzorcowego czterech izoprostanów zostały przedstawione na Rysunku 38.



Rysunek 38 .Chromatogram uzyskany w wyniku analizy próbki EBC z dodatkiem roztworu wzorcowego zawierającego anality z grupy izoprostanów z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS (1. 8-iso-15(R)-PGF₂α, 2. 8-iso-PGF₂α, 3. 11β-PGF₂α, 4. 15(R)-PGF₂α, 5. 8-iso-PGF₂α-d₄)

Ze względu na bardzo skomplikowany skład matrycy próbek osocza myszy konieczne było wydłużenie czasu analizy w celu usunięcia wszystkich substancji przeszkadzających, które silnie oddziałują z fazą stacjonarną kolumny chromatograficznej.

Chromatogram uzyskany w wyniku analizy próbki osocza myszy z dodatkiem roztworu wzorcowego czterech izoprostanów zostały przedstawione na Rysunku 39.



Rysunek 39 .Chromatogram uzyskany w wyniku analizy próbki osocza myszy z dodatkiem roztworu izoprostanów z wykorzystaniem LC-MS/MS (1.8-iso-15(R)-PGF₂α ,2. 8-iso-PGF₂α ,3. 11β-PGF₂α ,4. 15(R)-PGF₂α ,5. 8-iso-PGF₂α-d₄)

8. Wewnątrzlaboratoryjna walidacja opracowanych metodyk analitycznych

W celu potwierdzenia, że opracowane metodyki są przydatne do oznaczania izoprostanów, 3-nitrotyrozyny i aminokwasów w próbkach kondensatów wydychanego powietrza i w osoczu przeprowadzono ich wewnątrzlaboratoryjną walidację.

W przypadku procedury oznaczania 3-nitrotyrozyny i aminokwasów w próbkach EBC wyznaczono wartości liczbowe następujących parametrów metrologicznych:

- zakres liniowości,
- granica wykrywalności i oznaczalności,
- powtarzalność,
- precyzję pośrednią.

Badaniu poddano próbki EBC z dodatkiem roztworów wzorcowych mieszaniny 3-nitrotyrozyny i aminokwasów, w których stężenie analitów mieściło się w zakresie 10 – 5000 pg/ml. Otrzymane krzywe kalibracyjne były liniowe w badanym zakresie stężeń a wyznaczone wartości współczynników regresji były większe od 0,990, co w sposób szczegółowy omówiono w podrozdziałach 4.1 i 4.2. Również wartości liczbowe podstawowych parametrów metrologicznych, czyli LOD i LOQ 3-nitrotyrozyny i aminokwasów przedstawiono w niniejszym podrozdziałach.

W celu wyznaczenia powtarzalności i precyzji pośredniej przeprowadzono analizy próbek EBC z dodatkiem 3-nitrotyrozyny i aminokwasów na poziomie 500 pg/ml (Tabela 25).

Tabela 25. Dane obrazujące powtarzalność oraz precyzję pośrednią opracowanej metodyki analitycznej obliczone na podstawie wyników analizy próbek roztworów wzorcowych mieszaniny 3-nitrotyrozyny i aminokwasów

Analit	(Powtarzalność - CV [%]) (n=3)			Precyzja pośrednia (n=3)
	Dzień 1	Dzień 2	Dzień 3	
3-nitrotyrozyna	98,3(3,4)	99,7(8,1)	92,0(6,8)	96,7(4,1)
Alanina	96,4(8,3)	96,1(2,5)	97,1(2,5)	96,5(0,5)
Arginina	97,4(2,1)	94,3(3,6)	99,3(9,4)	97,0(2,5)
Asparagina	97,3(3,8)	100,5(1,6)	95,6(3,2)	97,8(2,5)
Cysteina	96,8(4,2)	93,3(9,0)	94,1(7,1)	94,7(1,8)
Feniloalanina	98,3(3,3)	95,0(6,1)	96,3(6,5)	96,5(1,7)
Glicyna	99,2(9,1)	91,6(8,6)	98,2(3,0)	96,3(4,1)
Glutamina	98,8(7,2)	94,1(4,2)	91,9(2,2)	94,9(3,5)
Histydyna	99,4(5,1)	97,8(3,3)	97,0(1,7)	98,1(1,2)

Tabela 25. c.d.

Hydroksy-4-prolina	98,7(8,3)	98,6(7,1)	95,6(9,0)	97,6(1,8)
Kwas asparaginowy	96,3(3,1)	96,5(5,3)	93,3(7,3)	95,4(1,8)
Kwas glutaminowy	95,0(5,9)	93,0(7,0)	97,9(2,8)	95,3(2,5)
Leucyna	97,4(6,7)	97,3(9,4)	98,1(3,1)	97,6(0,4)
Lizyna	97,6(3,9)	99,4(5,4)	96,9(11,2)	98,0(1,3)
Metionina	98,2(4,2)	101,3(3,1)	96,4(8,3)	98,6(2,5)
Prolina	97,7(6,1)	96,6(6,2)	96,2(2,1)	96,8(0,8)
Seryna	96,7(8,2)	97,7(5,0)	94,5(4,6)	96,2(1,6)
Treonina	97,3(9,4)	98,2(3,8)	93,8(6,8)	96,4(2,3)
Tryptofan	95,4(3,0)	97,1(7,2)	98,0(7,3)	96,8(1,3)
Tyrozyna	98,0(4,6)	99,3(4,3)	98,1(3,6)	98,5(0,7)
Walina	99,3(3,2)	96,9(1,5)	95,3(7,6)	97,2(2,0)

Powtarzalność metody analitycznej mieściła się w zakresie 1,5%-11,2, natomiast precyzja pośrednia w zakresie 0,5-4,1%.

W przypadku procedur oznaczania izoprostanów w próbkach EBC i osocza myszy zostały wyznaczone następujące parametry:

- zakres liniowości,
- granica wykrywalności i oznaczalności,
- odzysk (prawdziwość),
- powtarzalność,
- precyzja pośrednia.

Badaniu poddano próbki EBC z dodatkiem roztworów wzorcowych izoprostanów, w których stężenie mieściło się w zakresie od 1 do 250 pg/ml oraz próbki osocza myszy z dodatkiem roztworów wzorcowych, w których stężenie mieściło się w zakresie od 10 do 5000 pg/ml. Otrzymane krzywe kalibracyjne dla izoprostanów były liniowe w badanym zakresie stężeń, wyznaczone wartości liczbowe współczynników regresji liniowej były większe od 0,998 (Tabela 26).

Wyniki pomiarów (dla całego zakresu stężeń) obarczone są względnym odchyleniem standardowym, którego wartość nie przekracza RSD=2,8% (n=3) dla próbek EBC i RSD=3,5% (n=3) dla próbek osocza myszy.

Tabela 26. Zestawienie parametrów krzywych kalibracyjnych, wartości liczbowych granicy wykrywalności oraz oznaczalności uzyskanych na podstawie wyników analizy próbek EBC i osocza myszy z dodatkiem roztworów wzorcowych izoprostanów z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS

Analit	Równanie krzywej	R^2	LOD	LOQ
Próbki EBC				
8-iso-15(R)-PGF _{2α}	$y=0.0043x+0.109$	0.998	2	7
8-iso-PGF _{2α}	$y=0.00493x+0.0836$	0.999	1	4
11β-PGF _{2α}	$y=0.00337x+0.0364$	0.999	5	17
15(R)-PGF _{2α}	$y=0.00415x+0.000862$	0.999	3	10
Próbki osocza myszy				
8-iso-15(R)-PGF _{2α}	$y=0.000084x+0.0019$	0.999	12	40
8-iso-PGF _{2α}	$y=0.000094x+0.015$	0.999	10	33
11β-PGF _{2α}	$y=0.000075x+0.00053$	0.999	15	50
15(R)-PGF _{2α}	$y=0.000070x+0.0013$	0.999	13	33

W kolejnym etapie badań wyznaczono pozostałe parametry metrologiczne opracowanych procedury analitycznej tj. prawdziwość (ang. *trueness*), powtarzalność (ang. *repeatability*) oraz precyzję pośrednią (ang. *reproducibility*) metody analitycznej.

Do próbek EBC i osocza myszy dodano odpowiednią objętość roztworu wzorcowego zawierającego izoprostan tak, aby ich zawartość wynosiła odpowiednio 25, 100 i 250 pg/ml. Wyniki analiz próbek ekstraktów rozpuszczalnikowych uzyskanych z próbek EBC i osocza myszy zestawiono w Tabeli 27.

Tabela 27. Odzysk substancji z grupy izoprostanów dla opracowanej metody analitycznej obliczone na podstawie wyników analizy próbek kondensatów wydychanego powietrza

Analit	Odzysk (CV) [%] na trzech poziomach stężeń (n=3)		
	25 pg/ml	100 pg/ml	250 pg/ml
Próbki EBC			
8-iso-15(R)-PGF _{2α}	97,0 (4,7)	99,6 (3,5)	98,8 (2,1)
8-iso-PGF _{2α}	98,5 (2,5)	98,9 (3,6)	97,7 (1,9)
11β-PGF _{2α}	101,4 (6,6)	98,9 (2,2)	98,4 (2,5)
15(R)-PGF _{2α}	96,7 (6,3)	99,6 (2,8)	97,9 (1,9)
Próbki osocza myszy			
8-iso-15(R)-PGF _{2α}	98,8 (5,4)	99,5 (3,4)	99,8 (1,2)
8-iso-PGF _{2α}	100,6 (5,1)	99,5 (3,2)	100,7 (1,9)
11β-PGF _{2α}	99,4 (7,8)	97,9 (2,3)	99,5 (2,7)
15(R)-PGF _{2α}	99,2 (8,6)	100,9 (2,5)	99,4 (1,8)

Powtarzalność i precyzję pośrednią procedur analitycznych obliczono na podstawie wyników analiz próbek kondensatów wydychanego powietrza i osocza myszy z dodatkiem roztworów wzorcowych na poziomie 200 pg/ml. Powtarzalność procedury analitycznej wyrażono za pomocą wartości liczbowej współczynnika zmienności obliczonego na podstawie wyników analiz przygotowanych próbek EBC i osocza, wykonanych trzy razy w ciągu dnia. Precyzję pośrednią procedury analitycznej wyrażono za pomocą współczynnika zmienności obliczonego na podstawie wyników analiz ekstraktów odpowiednio przygotowanych próbek wykonanych przez trzy kolejne dni.

Wyniki uzyskane w trakcie analiz próbek ekstraktów rozpuszczalnikowych kondensatów wydychanego powietrza i osocza myszy zestawiono w Tabeli 28.

Tabela 28. Dane obrazujące powtarzalność oraz precyzję pośrednią opracowanych metodyk analitycznych obliczone na podstawie wyników analizy próbek kondensatów wydychanego powietrza i osocza myszy

Analit	Odzysk (CV) [%]			Precyzja pośrednia (n=3)
	Powtarzalność (n=3)			
	Dzień 1	Dzień 2	Dzień 3	
<i>Próbki EBC</i>				
8-iso-15(R)-PGF _{2α}	98,3(9,4)	101,7(8,3)	92,0(7,8)	97,3(4,9)
8-iso-PGF _{2α}	101,3(9,0)	104,8(8,0)	95,9(9,0)	100,6(4,5)
11β-PGF _{2α}	100,6(7,2)	104,1(7,5)	93,5(6,4)	99,4(5,4)
15(R)-PGF _{2α}	100,9(7,2)	103,8(6,7)	92,7(7,5)	99,1(5,8)
<i>Próbki osocza myszy</i>				
8-iso-15(R)-PGF _{2α}	98.9(3.8)	98.2(2.9)	100.6(2.0)	99.2(1.2)
8-iso-PGF _{2α}	99.9(4.3)	99.6(3.0)	100.1(3.2)	99.9(0.2)
11β-PGF _{2α}	97.2(7.1)	97.9(1.9)	100.2(3.7)	98.5(1.6)
15(R)-PGF _{2α}	109.0(1.5)	108.0(3.9)	113.3(6.1)	110.1(2.6)

Powtarzalność metody analitycznej do oznaczania związków z grupy izoprostanów w próbkach EBC mieściła się w zakresie 6,4-9,4%, natomiast w próbkach osocza 1,5-7,1%.

Precyzja pośrednia metody analitycznej do oznaczania związków z grupy izoprostanów w próbkach EBC mieściła się w zakresie 4,5-5,8%, natomiast w próbkach osocza 0,2-2,6%.

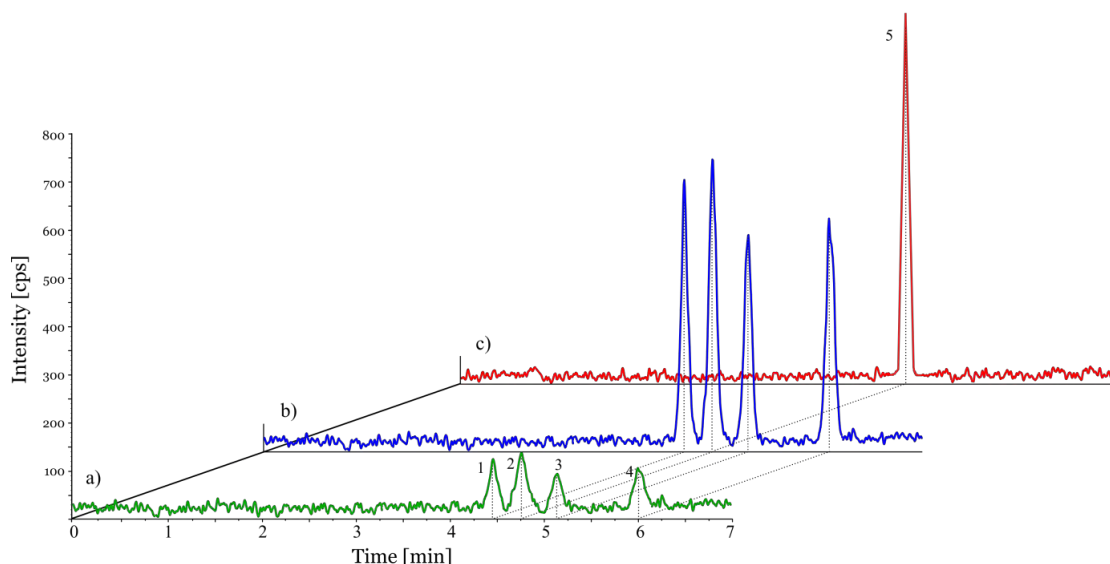
9. Analiza próbek kondensatów wydychanego powietrza i osocza pod kątem oznaczenia zawartości izoprostanów, 3-nitrotyrozyny i aminokwasów z wykorzystaniem opracowanych procedur analitycznych

Opracowane procedury oznaczania izoprostanów, 3-nitrotyrozyny i aminokwasów wykorzystano do badania zawartości wybranych analitów w próbkach EBC oraz osoczu.

9.1. Analiza próbek kondensatów wydychanego powietrza

W latach 2010-2012 od 50 studentów Wydziału Chemicznego Politechniki Gdańskiej pobrano próbki EBC, a wyniki badań przesiewowych zestawiono w Tabeli 30. Izoprostany wykryto w sześciu próbkach EBC pochodzących od osób, które są palaczami tytoniu, jednak tylko u dwóch osób widoczne były cztery oznaczane izoprostany (Rysunek 40), podczas gdy w pozostałych wykrywano tylko obecność 8-iso-15(R)-PGF_{2α}. Wykrycie czterech izoprostanów może sugerować, iż wzmożona synteza tych związków połączona jest z paleniem tytoniu.

3-nitrotyrozinę wykryto w jednej próbce kondensatu wydychanego powietrza pobranego od osoby palącej tytoń (11 pg/ml), natomiast w kondensatach pochodzących od członków grupy kontrolnej (osoby niepalące) stężenie 3-NT było poniżej granicy wykrywalności.



Rysunek 40. Chromatogram uzyskany podczas analizy HPLC-MS/MS a) próbki kondensatu wydychanego powietrza pobranego od palącego studenta (stężenie izoprostanów około 30 pg/ml), b) próbki kondensatu wydychanego powietrza skażonej izoprostanami na poziomie 250pg/ml oraz c) wzorca wewnętrznego

Tabela 29. Oznaczone stężenia związków z grupy izoprostanów w próbkach EBC uzyskane w trakcie badań z wykorzystaniem opracowanej metodyki analitycznej

Próbka	Analit	Opis dawcy	Stężenie [pg/ml]
1	8-iso-15(R)-PGF _{2α}	M	26
	8-iso-PGF _{2α}		35
	11β-PGF _{2α}		27
	15(R)-PGF _{2α}		21
2	8-iso-15(R)-PGF _{2α}	K	13
	8-iso-PGF _{2α}		17
	11β-PGF _{2α}		15
	15(R)-PGF _{2α}		14
3	8-iso-15(R)-PGF _{2α}	K	8,5
4	8-iso-15(R)-PGF _{2α}	K	16
5	8-iso-15(R)-PGF _{2α}	M	179
6	11β-PGF _{2α}	K	13
7-50	8-iso-15(R)-PGF _{2α}	21-M	Poniżej LOD
	8-iso-PGF _{2α}	23-K	
	11β-PGF _{2α}		
	15(R)-PGF _{2α}		

K- kobieta
M- mężczyzna

W kolejnym etapie badań porównano stężenie izoprostanów w próbkach EBC. Próbki te były pobierane od żołnierzy przechodzących terapię w komorach hiperbarycznych Instytutu Medycyny Hiperbarycznej w Gdyni: byli poddawani leczeniu 100% tlenem pod zwiększonym ciśnieniem. Próbki EBC pobierane były przed i po sesji leczniczej w komorze hiperbarycznej trwającej 30 minut. Otrzymane wyniki zebrano w Tabeli 30.

Tabela 30. Wyniki oznaczania zawartości izoprostanu 8-iso-PGF_{2α} w próbkach EBC uzyskane z wykorzystaniem opracowanej metodyki analitycznej

Stężenie izoprostanów w próbkach EBC [pg/ml]						
	Nr	Przed komorą hiperbaryczną	Nr	Po komorze hiperbarycznej	Krotność	Średni wzrost
8-iso-PGF _{2α}	1	0,9	1	4,3	4,6	
	2	2,5	2	4,1	1,7	
	3	4,7	3	2,5	0,5	
	4	<LOD	4	11,3	-	
	5	1,6	5	11,2	7,0	2,9
	6	4,8	6	Brak próbki	-	
	7	5,0	7	6,2	1,3	
	8	3,0	8	4,2	1,4	
	9	1,9	9	7,1	3,7	

Tabela 30. c.d.

10	3,6	10	5,2	1,4	
11	10,4	11	6,2	0,6	
12	4,5	12	5,2	1,2	
13	5,6	13	3,6	0,6	0,94
14	11,0	14	11,0	1,0	
15	7,2	15	3,7	0,5	
16	4,2	16	6,1	1,5	
17	11,0	17	7,5	0,7	
18	6,8	18	<LOD	-	
19	6,9	19	<LOD	-	
20	5,4	20	<LOD	-	
21	3,2	21	3,2	1,0	1,6
22	<LOD	22	<LOD	-	
23	1,0	23	5,7	3,1	
24	4,3	24	7,4	1,7	
25	9,9	25	6,6	0,7	
				Średnia	1,8

W próbkach kondensatów wydychanego powietrza zauważyć można wzrost poziomu stężenia izoprostanu 8-iso-PGF_{2α} po sesji w komorze hiperbarycznej. Średni wzrost stężenia 8-iso-PGF_{2α} obliczony na podstawie analizy 50 próbek EBC wyniósł 1,81.

Otrzymane z Instytutu Medycyny Hiperbarycznej w Gdyni próbki kondensatów wydychanego powietrza zostały zanalizowane również pod kątem zawartości aminokwasów z wykorzystaniem opracowanej procedury. W Tabeli 31 przedstawiono wyniki analiz próbek EBC na przykładzie aminokwasów takich jak: fenyloalanina, tyrozyna i asparagina. W Załączniku 1 zebrano dane na temat poziomu stężeń pozostałych aminokwasów.

Tabela 31. Zmiany stężeń wybranych aminokwasów w próbkach EBC oznaczonych z wykorzystaniem techniki LC-MS/MS

Nr	FEN			TYR [ng/ml]			ASP		
	a	b	c	a	b	c	a	b	c
1	0,771	0,972	1,3	1,030	1,230	1,2	1,650	1,650	1,0
2	0,000	0,650	-	<LOD	0,914	-	<LOD	<LOD	-
3	2,165	1,985	0,9	2,430	2,545	1,0	1,965	1,965	1,0
4	<LOD	2,425	-	<LOD	2,475	-	<LOD	<LOD	-
5	brak	2,400	-	brak	2,650	-	brak	brak	-
6	0,450	brak	-	0,678	brak	-	1,435	1,435	1,0
7	0,590	1,155	2,0	0,820	1,395	1,7	1,865	1,865	1,0
8	0,258	0,621	2,4	0,446	0,677	1,5	1,420	1,420	1,0
9	0,706	0,855	1,2	0,914	0,968	1,1	1,680	1,680	1,0

Tabela 31. c.d.

10	0,274	3,995	14,6	<LOD	5,240	-	<LOD	<LOD	-
11	0,883	0,497	0,6	1,200	0,800	0,7	3,235	3,235	1,0
12	1,425	0,198	0,1	1,825	<LOD	-	<LOD	<LOD	-
13	3,470	0,444	0,1	4,755	0,561	0,1	2,885	2,885	1,0
14	0,612	7,820	12,8	0,845	11,000	13,0	1,500	1,500	1,0
15	0,334	0,478	1,4	0,508	0,691	1,4	1,200	1,200	1,0
16	8,570	0,245	0,03	11,700	0,226	0,0	4,505	4,505	1,0
17	0,971	0,687	0,7	1,225	0,968	0,8	1,065	1,065	1,0
18	1,740	155,50	89,4	2,860	415,500	145,3	2,560	47,600	18,6
19	0,706	0,151	0,2	1,135	0,136	0,1	1,520	<LOD	-
20	1,131	0,722	0,6	2,020	1,015	0,5	1,480	1,395	0,9
21	0,297	0,817	2,8	0,534	1,290	2,4	1,330	1,810	1,4
22	0,526	2,480	4,7	0,894	4,530	5,1	0,498	2,155	4,3
23	0,392	0,472	1,2	0,719	0,742	1,0	<LOD	1,016	-
24	0,399	12,800	32,1	0,538	20,900	38,8	0,436	13,750	31,5
25	0,377	0,830	2,2	0,511	1,200	2,3	<LOD	1,510	-
	Średnia		4,1	Średnia		4,0	Średnia		3,1

a – stężenie aminokwasu w próbce EBC pobranej przed sesją w komorze hiperbarycznej

b – stężenie aminokwasu w próbce EBC pobranej po sesji w komorze hiperbarycznej

c – zmiana stężenia aminokwasu

kolorem czerwonym zaznaczono wyniki analiz próbek pobranych od osób palących tytoń

kolorem zielonym zaznaczono wyniki analizy próbki zanieczyszczonej śliną

Na podstawie uzyskanych wyników można wysnuć wniosek, iż przebywanie w komorze hiperbarycznej, gdzie podawany jest tlen pod zwiększonym ciśnieniem, powoduje ponad 3-krotny wzrost stężenia aminokwasów w próbkach kondensatów wydychanego powietrza. Na uwagę zasługuje też fakt, że zwiększone stężenie aminokwasów w próbce nr 18 spowodowane jest zanieczyszczeniem jej śliną w trakcie etapu pobierania. Stężenia aminokwasów w próbkach pobranych od osób palących tytoń pobranych przed sesją w komorze hiperbarycznej jak i po niej nie wykazują dużego zróżnicowania.

9.2. Analiza próbek osocza

Opracowaną procedurę oznaczania izoprostanów w próbkach osocza wykorzystano do badań próbek rzeczywistych. Wyniki zebrano w Tabelach 32 i 33.

Tabela 32. Wyniki oznaczania zawartości izoprostanów w próbkach osocza uzyskane z wykorzystaniem opracowanej metodyki analitycznej

Stężenie izoprostanów w próbkach osocza [pg/ml]						
	Nr	Przed komorą hiperbaryczną	Nr	Po komorze hiperbarycznej	Krotność	Średnia
8-iso-15(R)- PGF _{2α}	1	23,6	1	52,3	2,2	0,95
	2	34,6	2	19,3	0,6	
	3	15,8	3	12,2	0,8	
	4	37,4	4	25,6	0,7	
	5	42,0	5	16,1	0,4	
	6	37,1	6	Brak próbki	-	

Tabela 32. c.d.

7	19,6	7	11,0	0,6	
8	41,2	8	40,1	1,0	
9	56,1	9	73,3	1,3	
10	88,6	10	40,1	0,5	
11	45,0	11	27,6	0,6	
12	96,1	12	10,7	0,1	
13	36,0	13	38,8	1,1	0,7
14	18,5	14	27,4	1,5	
15	<LOD	15	39,7	-	
16	46,0	16	36,2	0,8	
17	50,1	17	35,0	0,7	
18	13,8	18	10,3	0,7	
19	42,7	19	53,5	1,3	
20	42,5	20	38,6	0,9	
21	74,3	21	65,7	0,9	1,2
22	39,5	22	77,0	1,9	
23	44,2	23	27,9	0,6	
24	51,1	24	84,3	1,6	
25	45,0	25	37,0	0,8	
				Średnia	0,95
1	46,6	1	36,9	0,8	
2	98,0	2	45,9	0,5	
3	12,4	3	44,9	3,6	
4	89,5	4	<LOD	-	
5	<LOD	5	14,7	-	1,2
6	24,3	6	Brak próbki	-	
7	41,1	7	37,4	0,9	
8	42,4	8	13,3	0,3	
9	33,4	9	25,7	0,8	
10	443,8	10	338,0	0,8	
11	385,0	11	320,4	0,8	
12	369,3	12	214,6	0,6	
13	247,9	13	255,7	1,0	0,9
14	292,9	14	275,3	0,9	
15	306,7	15	232,2	0,8	
16	338,0	16	316,5	0,9	
17	367,4	17	336,0	0,9	
18	165,6	18	171,5	1,0	
19	212,6	19	171,5	0,8	
20	167,6	20	300,8	1,8	
21	138,2	21	330,2	2,4	1,6
22	118,6	22	369,3	3,1	
23	140,2	23	61,8	0,4	
24	197,0	24	202,8	1,0	
25	195,0	25	218,5	1,1	
				Średnia	1,2
1	10,9	10	<LOD	-	
2	<LOD	11	<LOD	-	
3	<LOD	12	24,0	-	
4	21,1	13	<LOD	-	-
5	<LOD	14	<LOD	-	
6	1,9	15	Brak próbki	-	
7	<LOD	16	<LOD	-	

Tabela 32. c.d.

8	<LOD	17	<LOD	-	
9	10,1	18	<LOD	-	
10	<LOD	10	<LOD	-	
11	<LOD	11	<LOD	-	
12	<LOD	12	<LOD	-	
13	<LOD	13	<LOD	-	
14	<LOD	14	<LOD	-	-
15	<LOD	15	<LOD	-	
16	19,9	16	<LOD	-	
17	<LOD	17	<LOD	-	
18	19,1	18	<LOD	-	
19	<LOD	19	<LOD	-	
20	<LOD	20	<LOD	-	
21	<LOD	21	<LOD	-	-
22	<LOD	22	<LOD	-	
23	<LOD	23	<LOD	-	
24	<LOD	24	96,8	-	
25	<LOD	25	<LOD	-	
				Średnia	-
1	28,3	10	<LOD	-	
2	<LOD	11	107,0	-	
3	31,8	12	<LOD	-	
4	3,8	13	14,2	3,8	
5	<LOD	14	32,6	-	2,2
6	8,7	15	Brak próbki	-	
7	40,9	16	20,3	0,5	
8	<LOD	17	192,0	-	
9	<LOD	18	73,2	-	
10	115,4	10	76,1	0,7	
11	184,4	11	63,7	0,3	
12	114,7	12	40,0	0,3	
13	80,3	13	48,8	0,6	0,5
14	130,3	14	62,7	0,5	
15	129,1	15	52,9	0,4	
16	92,5	16	41,2	0,4	
17	57,3	17	39,5	0,7	
18	5,4	18	75,1	14,0	
19	34,9	19	5,6	0,2	
20	67,1	20	36,8	0,5	
21	63,7	21	90,0	1,4	2,8
22	83,2	22	140,3	1,7	
23	54,9	23	51,2	0,9	
24	88,1	24	97,8	1,1	
25	59,3	25	51,7	0,9	
				Średnia	1,8

Następnie zweryfikowano przydatność opracowanej metodyki oznaczania związków z grupy izoprostanów w próbkach osocza myszy. Analizie poddano 75 próbek osocza (trzy serie po 25 próbek), których charakterystyka została przedstawiona w rozdziale „6. Próbki do badań”. Obserwowano zmiany w stężeniu izoprostanów w próbkach pobranych od myszy, które wystawione były na działanie modelowego induktora stresu oksydacyjnego wodoronadtlenku tert-butyliku (TBHP) i leku przeciwnowotworowego doksorubicyny (DOX), potencjalnego stymulatora cyklu redoks. Uzyskane dane przedstawiono w Tabeli 33.

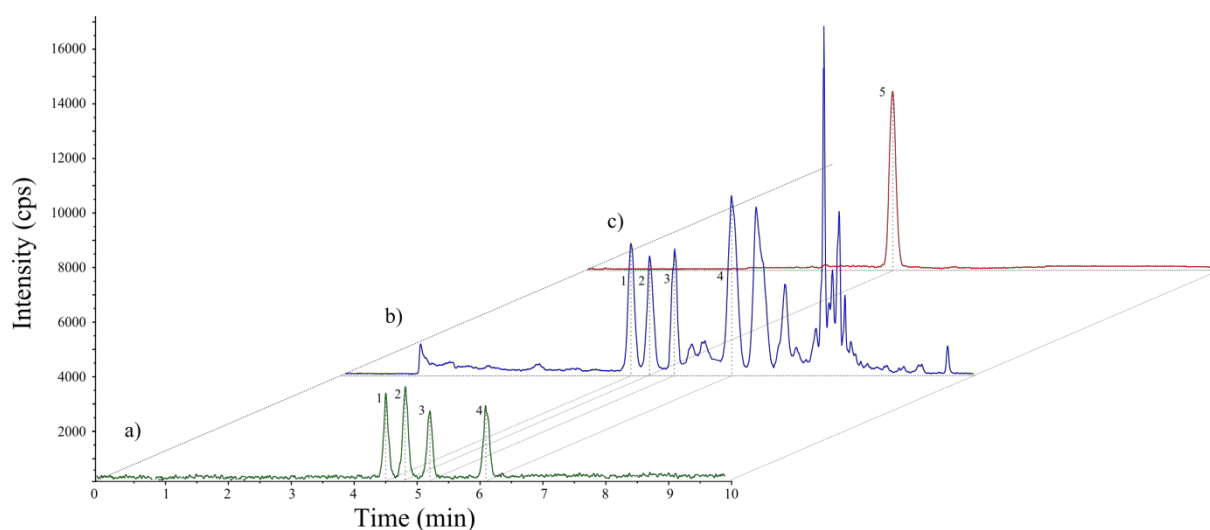
Tabela 33. Wyniki oznaczania zawartości izoprostanów w próbkach osocza myszy uzyskane z wykorzystaniem opracowanej metodyki analitycznej

Nr serii	Nr próbki	8-iso-15(R)-PGF _{2α}	8-iso-PGF _{2α}	11β-PGF _{2α}	15(R)-PGF _{2α}
1	2	519.4	252.4	98.8	866.8
	3	3921.3	2382.5	238.7	5691.3
	4	2663.1	1633.9	94.1	4288.7
	5	3196.2	1696.9	97.2	5024.8
	6	3833.4	2119.1	74.1	7250.7
	7	1044.7	602.9	48.4	1944.6
	8	1938.7	1132.4	48.6	3139.5
	9	3771.0	2365.0	95.8	7727.9
	10	5504.3	3269.0	290.7	8382.8
	11	6391.2	4192.4	192.7	13900.9
	12	1153.0	589.7	31.8	2076.7
	13	2655.9	1426.5	77.9	4033.9
	14	6322.1	3883.9	224.4	10625.3
	15	4570.3	2503.7	197.1	6592.0
	16	3197.6	1674.9	162.1	5487.9
	17	5837.9	2774.1	379.4	9768.1
	18	2243.5	1195.3	115.6	3541.5
	19	2940.2	1618.4	233.2	4826.4
	20	2181.2	1166.7	129.9	3556.6
	21	2233.5	1081.4	152.9	3525.3
	22	1043.1	519.1	57.5	1718.0
	23	6115.3	3301.0	210.6	9895.8
	24	1917.9	1019.2	162.2	2963.3
	25	6570.7	3528.1	251.6	10821.2
	2	1	1400.9	651.3	256.9
2		2650.2	1582.4	553.9	5251.5
3		608.4	213.3	36.3	980.8
4		1622.1	619.2	<LOD	3046.8
5		3878.7	2130.8	184.0	6315.3
6		2266.9	650.1	<LOD	4956.1
7		1166.3	577.1	20.9	1987.6

Tabela 33 c.d.

	8	979.4	499.5	27.1	1772.9
	9	539.7	261.5	<LOD	1032.1
	10	385.5	186.8	<LOD	737.2
	11	2923.1	1533.3	46.9	5262.9
	12	3657.8	2136.8	169.9	7226.8
	13	1311.8	654.1	35.3	1853.0
	14	3405.9	1835.9	137.3	5135.8
	15	76864.7	45203.6	3132.6	125171.1
	16	145.5	38.1	<LOD	377.7
	17	3425.9	2039.5	121.8	6699.6
	18	493.9	1688.3	139.3	<LOD
	19	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	20	282.4	109.2	<LOD	492.0
	21	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	22	1004.9	547.1	40.7	1805.1
	23	11968.9	7146.3	370.0	22613.2
	24	3040.9	1636.3	104.9	5062.9
	25	402.9	256.7	142.1	866.0
	2	402.9	256.7	142.1	866.0
	3	362.8	228.3	49.2	801.2
	4	924.8	516.7	54.0	1690.0
	5	1102.4	663.1	33.6	2596.0
	6	854.8	495.3	79.2	2040.2
	7	211.4	129.1	18.9	566.2
	8	244.9	128.1	61.6	513.0
	10	134.9	81.6	22.2	380.0
	11	154.7	94.2	27.8	308.6
3	12	1300.5	801.5	296.6	3076.7
	13	369.4	198.0	35.7	770.5
	14	1439.2	767.7	118.5	2631.5
	15	396.9	200.9	84.3	804.6
	16	489.4	255.0	<LOD	1038.4
	17	325.0	147.9	55.1	636.7
	18	475.9	232.0	76.0	1121.4
	19	821.6	444.7	143.2	2250.2
	20	846.4	443.9	18.9	2081.5
	21	212.1	98.3	<LOD	457.6
	22	274.7	89.5	<LOD	528.8
	23	1052.2	532.3	38.0	2232.9
	24	449.4	192.6	<LOD	972.2
	25	710.3	283.3	25.9	1419.3
	26	257.7	207.8	22.4	408.0

Poniżej na Rysunku 41b, który powstał przez analizę próbki osocza myszy z dodatkiem mieszaniny roztworów wzorcowych izoprostanów widoczne są dodatkowe piki, które pochodzą od naturalnie występujących w próbkach osocza pozostałych izomerów izoprostanów typu IV. Obecność tych substancji (posiadających identyczne przejścia jonów w trybie MRM) nie powoduje zakłóceń w analizie próbek osocza, ponieważ związki te są odpowiednio rozdzielone ($R_s > 1,5$) od analitów będących przedmiotem zainteresowania.

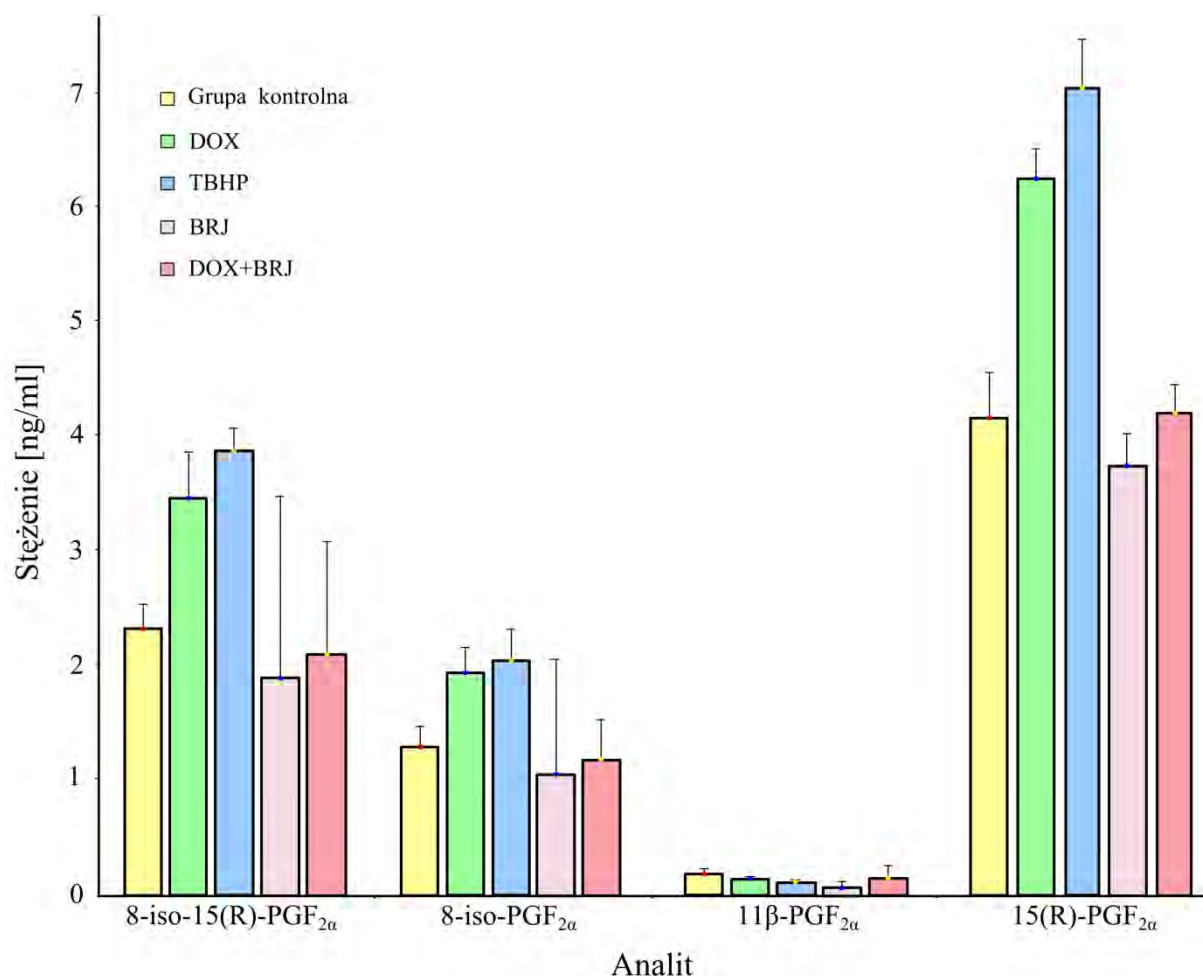


Rysunek 41. Chromatogram uzyskany w wyniku analizy próbki osocza myszy z dodatkiem roztworu izoprostanów z wykorzystaniem LC-MS/MS (1. 8-iso-15(R)-PGF_{2α}, 2. 8-iso-PGF_{2α}, 3. 11β-PGF_{2α}, 4. 15(R)-PGF_{2α}, 5. 8-iso-PGF_{2α}-d₄)

Wykorzystywany w niniejszych badaniach TBHP, jako wodoronadtlenek powoduje bezpośrednie utlenianie wielonienasyconych kwasów tłuszczowych i dlatego jest często stosowany do wzbudzania utleniania lipidów *in vivo* [70]. Doksorubicyna, powszechnie stosowany lek przeciwnowotworowy, powoduje powstawanie dużej liczby reaktywnych form tlenu w wyniku katalizowanych enzymatycznie reakcji z wolnym tlenem [71].

Analizy próbek osocza ujawniły, iż wystawienie myszy na działanie stresu oksydacyjnego wywołwanego przez DOX i TBHP powoduje zwiększenie stężenia związków 8-iso-15(R)-PGF_{2α} (o odpowiednio 48 i 66%) i 15(R)-PGF_{2α} (o odpowiednio 50 i 69%) w porównaniu do poziomu stężeń tych analitów w próbkach pobranych od grupy kontrolnej. Dla izoprostanu 8-iso-PGF_{2α} zaobserwowano wzrost stężenia w grupach, którym podawano DOX i TBHP o odpowiednio 46 i 62%. Wyjątkiem był związek 11β-PGF_{2α}, dla którego zaobserwowano spadek stężenia izoprostanów w grupach DOX i TBHP, jednak nie jest to spadek stężenia statystycznie istotny. Można również wysnuć wniosek, iż podawanie zwierzętom soku

z buraka czerwonego w znacznym stopniu przyczyniło się do obniżenia stężenia izoprostanów zarówno w grupie, której nie podawano związków indukujących stres oksydacyjny jak i w grupie, której podawana była dokсорubicyna łącznie z sokiem.



Rysunek 42. Wyniki otrzymane w trakcie analiz próbek osocza myszy z wykorzystaniem opracowanej metodyki opartej na zastosowaniu techniki LC-MS/MS na etapie rozdzielania, identyfikacji i ilościowego oznaczenia analitów z grupy izoprostanów (średnia + RSD)

Zaskakujący wydaje się również fakt, iż stężenie dla najczęściej oznaczanego związku z grupy izoprostanów 8-iso-PGF_{2α}, wiarygodnego biomarkera stresu oksydacyjnego *in vivo*, nie jest najwyższe w grupie tych związków, a także nie odnotowano większych różnic pomiędzy stężeniami w grupie DOX i TBHP niż w przypadku związków 8-iso-15(R)-PGF_{2α} i 15(R)-PGF_{2α} (Rysunek 42).

10. Wyniki i ich omówienie

W ramach badań prowadzonych w trakcie studium doktoranckiego opracowano metodyki analityczne, które są wykorzystywane do oznaczania:

- czterech związków z grupy izoprostanów w próbkach kondensatów wydychanego powietrza,
- 3-nitrotyrozyny i 20 aminokwasów w próbkach kondensatów wydychanego powietrza
- izoprostanów w osoczu myszy.

Etap przygotowania próbek EBC do analizy opiera się na wzbogacaniu analitów z wykorzystaniem techniki liofilizacji, natomiast w przypadku metodyki oznaczania związków z grupy izoprostanów w osoczu wykorzystano technikę ekstrakcji do fazy stałej. Na etapie identyfikacji i oznaczeń ilościowych w obu przypadkach wykorzystano technikę LC-MS/MS.

Przeprowadzono wewnątrzlaboratoryjną walidację opracowanych procedur analitycznych. Uzyskane wyniki pozwalają sformułować następujące wnioski:

- ❖ Opracowane metodyki charakteryzują się dużą czułością i selektywnością dzięki zastosowaniu detektora tandemowego spektrometru mas w połączeniu z wysokosprawną chromatografią ciekową.
- ❖ Dla procedury oznaczania izoprostanów w próbkach EBC otrzymano następujące wartości parametrów metrologicznych:
 - uzyskane odzyski dla badanych związków mieściły się w zakresie od 96,7 do 101,4 %, natomiast wartość współczynnika zmienności nie przekroczyła 6,6 % niezależnie stężenia izoprostanów w próbkach kondensatów wydychanego powietrza,
 - powtarzalność metody analitycznej mieściła się w zakresach 6,4-9,4%, precyzja pośrednia metody analitycznej mieściła się w zakresach 4,5-5,8 %.
- ❖ Dla procedury oznaczania izoprostanów w próbkach osocza myszy:
 - uzyskano odzyski dla badanych związków w zakresie od 97,9 do 100,9 %, natomiast wartość współczynnika zmienności nie przekroczyła 8,6 % niezależnie stężenia izoprostanów w próbkach osocza,
 - powtarzalność metody analitycznej mieściła się w zakresach 1,5-7,1 %, precyzja pośrednia metody analitycznej mieściła się w zakresach 0,2-2,6 %.

❖ Dla procedury oznaczania aminokwasów w próbkach EBC:

- Powtarzalność metody analitycznej mieściła się w zakresie 1,5%-11,2, natomiast precyzja pośrednia w zakresie 0,5-4,1%.

Otrzymane wyniki analiz próbek EBC wskazują, iż mogą być one wykorzystywane w ocenie występowania stresu oksydacyjnego wywoływanego przez czynniki środowiskowe, takie jak palenie tytoniu lub w trakcie terapii tlenowej pod zwiększonym ciśnieniem. Główną wadą stosowania próbek EBC jest ich ograniczona objętość. Pojedyncza próbka o objętości około 1 ml pozwala na pobranie niewielkiej ilości do bezpośredniego oznaczenia w niej aminokwasów, natomiast pozostała część jest w całości poddawana liofilizacji by osiągnąć minimum pięciokrotne wzbogacenie próbki.

Poziomy zawartości izoprostanów wykrytych w badanych próbkach EBC pobranych od studentów Politechniki Gdańskiej mieściły się w zakresie od 8,5-179 pg/ml, natomiast w próbkach tych obecność 3-nitrotyrozyny wykryto tylko w jednym przypadku (na poziomie 11 pg/ml). W próbkach EBC pobranych od żołnierzy przechodzących test tolerancji tlenowej zaobserwowano około 80% wzrost stężenia izoprostanu 8-iso-PGF_{2α}, co potwierdza bezpośrednie toksyczne oddziaływanie tlenu i szybkie wydzielanie związków z grupy izoprostanów do płynu wyściełającego układ oddechowy.

Opracowana metodyka oznaczania aminokwasów w próbkach EBC może w przyszłości stać się użytecznym narzędziem analitycznym pozwalającym na ocenę zależności zmian stężenia tych związków podczas występowania stresu oksydacyjnego. Niezbędne jest wykonanie dalszych analiz pozwalających zrozumieć powiązanie między zmianami w zawartości aminokwasów w układzie oddechowym a zwiększonym występowaniem reaktywnych form tlenu.

Procedura oznaczania izoprostanów wykorzystana w analizie próbek osocza umożliwiła stwierdzenie, iż ich zwiększone stężenie wywoływane jest przez podawanie myszom wodoronadtlenku tert-butylu a także doksorubicyny, natomiast spadek obserwuje się przy podawaniu zwierzętom soku z czerwonego buraka, który zawiera składniki przeciwutleniające. W próbkach osocza pobranych od żołnierzy stwierdzono 20% wzrost związku 8-iso-PGF_{2α} i 80% dla związku 15(R)-PGF_{2α}.

STRESZCZENIE

Stres oksydacyjny oznacza stan, w którym komórki narażone są na działanie tlenu cząsteczkowego o wysokim stężeniu lub chemicznych pochodnych tlenu zwanych „reaktywnymi formami tlenu” (ROS). Wysoka reaktywność wolnych rodników powoduje problemy w ich oznaczeniu. Opracowano wiele metod oznaczania produktów reakcji rodnikowych np. utlenione zasady DNA, białka, aldehydy lub izoprostany. W organizmie człowieka podwyższone stężenie związków z grupy izoprostanów i 3-nitrotyrozyny połączone jest z występowaniem takich chorób jak: choroby mięśnia sercowego (niewydolność serca, zapalenie mięśnia sercowego, miażdżyca), choroby układu oddechowego jak astma, uszkodzenia płuc wywołane paleniem tytoniu oraz choroby neurodegeneracyjne (Alzheimera, Parkinsona, otępienie z ciałami Lewy'ego, stwardnienie rozsiane - SM).

W ramach przeprowadzonych badań zostały opracowane metodyki oznaczania związków z grupy izoprostanów, 3-nitrotyrozyny i 20 aminokwasów w różnego rodzaju próbkach biologicznych. Metodyka ta opiera się na zastosowaniu techniki ekstrakcji do fazy stałej do wzbogacania próbek osocza i izolacji izoprostanów, a także na wykorzystaniu liofilizacji dla próbek kondensatów wydychanego powietrza. Analiza ekstraktów rozpuszczalnikowych została wykonana przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas. Przeprowadzono wewnątrzlaboratoryjną walidację opracowanych procedur analitycznych.

W trakcie studium doktoranckiego oznaczono zawartość czterech związków z grupy izoprostanów w 75 próbkach osocza myszy, co umożliwiło potwierdzenie występowania stresu oksydacyjnego u zwierząt wystawionych na działanie wodoronadtlenku tert-butyłu lub którym podawana była doksorubicyna. Uzyskano również pozytywne wyniki dotyczące przeciwutleniającego działania soku z buraka u myszy, którym był podawany.

Sprawdzono przydatność opracowanej procedury oznaczania izoprostanów, 3-nitrotyrozyny i aminokwasów w próbkach kondensatów wydychanego powietrza. Przeprowadzono analizy pięćdziesięciu próbek kondensatów wydychanego powietrza pobranych od studentów Politechniki Gdańskiej. Zbadano również wpływ podwyższonego stężenia tlenu podawanego w komorach hiperbarycznych na generowanie stresu oksydacyjnego bezpośrednio w płucach u pacjentów Instytutu Medycyny Hiperbarycznej w Gdyni.

Opracowane procedury analityczne mogą być wykorzystywane przez laboratoria analityczne do badań przesiewowych występowania stresu oksydacyjnego wywołanego chorobami układu oddechowego i krwionośnego.

ABSTRACT

Oxidative stress (OS) is a state of imbalance between continuously generating reactive oxygen species (ROS) during normal cell metabolism and the mechanism for detoxifying oxygen radicals by a network of antioxidative enzymes. Several methods have been developed for determination of the radical reactions products such as oxidized DNA bases, proteins, aldehydes or isoprostanes. In the body, elevated concentration of isoprostanes and 3-nitrotyrosine is connected with the occurrence of diseases such as cardiac disease (heart failure, myocarditis, atherosclerosis), respiratory diseases like asthma, lung damage caused by smoking and neurodegenerative diseases (Alzheimer's, Parkinson's, dementia with Lewy bodies, multiple sclerosis - MS).

An analytical procedure was developed for determination of four isoprostanes and 3-nitrotyrosine in various biological samples. This methodology is based on the use of solid phase extraction for serum samples and on lyophilization for exhaled breath condensate samples. Analysis of extracts was performed using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. To confirm that analytical method is suitable for its intended use, several validation parameters, such as linearity, limits of detection and quantification, trueness and repeatability were evaluated.

The applicability of the developed procedure has been verified by monitoring the isoprostanes concentration changes in plasma derived from mice exposed to tert-butyl hydroperoxide (TBHP), a model inducer of oxidative stress, or to antitumor drug doxorubicin (DOX) known for potent stimulation of redox cycling.

The procedure was also examined for the usefulness for determination of isoprostanes and 3-nitrotyrosine in fifty EBC samples collected from students of Gdansk University of Technology.

The developed analytical procedures may be used in analytical laboratories for screening the presence of oxidative stress induced by diseases of the respiratory and circulatory system.

LITERATURA

- [1] Knapik-Kordecka M., Piwowar A., Warwas M., *Wiadomości Lekarskie* **LX** (2007) 7–8.
- [2] Bartosz G. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2003.
- [3] Kulbacka J., Saczko J., Chwiłkowska A., *Pol. Merk. Lek.* **XXVII** (2009) 44-47.
- [4] Bailey M.S., Landar A., Darley-Usmar V., *Free Radical Biol. Med.* **38** (2005) 175-188.
- [5] Sheu S.S., Nauduri D., Anders M.W., *Biochim. Biophys. Acta* **1762** (2006) 256-265.
- [6] Halliwell B., *Nat. Med.* **6** (2000) 1105- 1106.
- [7] Jawniak D., Jawniak R., Małek M., *Rep. Pract. Oncol. Radiother.* **9** (2004) 157-160.
- [8] Łągowska-Lenard M., Bielewicz J., Raszewski G., *Pol. Merk. Lek.* **25** (2008) 147, 205-208.
- [9] Rutkowski R., Pancewicz S.A., Rutkowski K., Rutkowska J., *Pol. Merk. Lek.* **XXIII** (2007) 131-136.
- [10] Davi G., Alessandrini P., Mezzetti A., Minotti G., Bucciarelli T., Constantini F., Cipollone F., Ciabattoni G., Patrono C., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**(11) (1997) 3230-3235.
- [11] Gniwotta C., Morrow J.W., Roberts L.J., Kuhn H., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17**(11) (1997) 3236-3241.
- [12] Meagher E.A., Barry O.P., Burke A., Lucey M.R., Lawson J.A., Rokach J.U., FitzGerald G.A., *J. Clin. Invest.* **104**(6) (1998) 805-813.
- [13] Wood L.G., FitzGerald D.A., Gibson P.G., Cooper D.M., Garg M.L., *Lipids* **35** (9) (2000) 967-974.
- [14] Pratico D., Basili S., Vieri M., Cordova C., Violi F., FitzGerald G.A., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158** (1998) 1709-1714.
- [15] Montuschi P., Ciabattoni G., Paredi P., Pantelidis P., du Bois R.M., Kharitonov S.A., Barnes P.J., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **158** (1998) 1524-1527.

- [16] Pratico D., Lee M-Y, Trojanowski J.Q., Rokach J., FitzGerald G.A., *FASEB J.* **12** (1998) 1777-1783.
- [17] Geco A., Minghetti L., Levi G., *Neurochem. Res.* **25**(9-10) (2000) 1357-1364.
- [18] Bohnstedt K.C., Karlberg B., Wahlund L., Eriksdotter Jönhagen M., Basun H., Schmidt S., *J. Chromatogr. B* **796** (2003) 11–19.
- [19] Obwegeser R., Oguogho A., Ulm H., Berghammer P., Sinzinger H., *Prosta. Oth. Lipid M.* **57**(4) (1999) 269-279.
- [20] Harman M. S., Liang L., Tsitouras P., Gucciardo F., Heward C., Reaven P.D., Wei Ping, Ahmed A., Cutler R.G., *Free Radical Biol. Med.* **35**(10) (2003) 1301–1309.
- [21] Roberts L.J., Morrow J.D., *Biophys. A.* **1345**(2) (1997) 121-135.
- [22] Davi G., Ciabattini G., Consoli A., Mezetti A., Falco A., Santarone S., Pennese E., Vitacolonna E., Bucciarelli T., Patrono G. *Circulation* **99**(22) (1999) 224-229.
- [23] Tokarz A., Jelińska M., Ozga A.; *Biul. Wydz. Farm. AMW*, **2** (2004).
- [24] Lawson J.A., Rokach J., FitzGerald G.A., *J. Biol. Chem.* **274**(35) (1999) 24441-24444.
- [25] Rokach J., Kim S., Bellone S., Lawson J. A., Praticò D., Powell W. S., FitzGerald G. A., *Chem. Phys. Lipids* **128** (2004) 35–56.
- [26] Urbaniak A., Zięba M., Zwolińska A., Szkudlarek U., Łuczyńska M., Noweta K., Kwiatkowska S., *Pneum. Alerg. Pol.* **79**(2) (2011) 90–98.
- [27] Janicka M., Kot-Wasik A., Kot J., Namieśnik J., *Int. J. Mol. Sci.* **11**(11) (2010) 4631-4659.
- [28] Wójcicka G., Bełtowski J., Jamroz A., *Postepy Hig. Med. Dosw.* **58** (2004) 183-193.
- [29] Martynowicz H., Skoczyńska A., Silber M., Andrzejak R., *Arterial Hypertension* **8**(6) (2004) 431–438.
- [30] De Vecchi A.F., Novembrino C., Lonati S., *Nephrol. Dial. Transplant.* **22** (2007) 1709-1713.
- [31] Kuusniemi A.M., Lapatto R., Holmberg C., *Kidney Int.* **68** (2005) 121-132.
- [32] Pędzik A., Paradowski M., Rysz J., *Pol. Merk. Lek.* **XXVIII** (2010) 56-60.
- [33] Chen Y., McMillan-Ward E., Kong J., *Cell Death Differ.* **15** (2008) 171-183.

- [34] Foksinski M., Gackowski D., Rozalski R., *Eur. J. Nutr.* **46** (2007) 174-181.
- [35] Lawson J.A., Rokach J., FitzGerald G.A., *J.Biol.Chem.* **274**(35) (1999) 24441-24444.
- [36] Takahashi K., Nammour T.M., Fukunaga M., Ebert J., Morrow J.D., Roberts L.J. II, Hoover R.L., Badr K.F., *J.Clin. Invest.* **90** (1992) 136-141.
- [37] Fukunaga M., Makita N., Roberts LJII, Morrow J.D., Takahashi K., Badr K.F., *Am. J. Physiol.* **264** (1983) C1619-1624.
- [38] Morrow J.D., Hill K.E., Burk R.F., Nammour T.M., Badr K.F., Roberts L.J. II, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** (1990) 9383–9387.
- [39] Morrow J.D., Roberts L.J. II, Badr K.F., *J. Clin. Invest.* **90** (1992) 136–141.
- [40] Kromer B.M., Tippins J.R. *Br. J. Pharmacol.* **119** (1996)1276–1280.
- [41] Hou X., Gobeil F. Jr., Peri K., Speranza G., Marrache A.M., Lachapelle P., Roberts L.J. II, Varma D.R., Chemtob S., *Stroke* **31** (2000) 516–525.
- [42] Lahaie I., Hardy P., Hou X., Hassessian H., Asselin P., Lachapelle P., Almazan G., Varma D.R., Morrow J.D., Roberts L.J. II, *Am. J. Physiol.* **274** (1998) R1406–R1416.
- [43] Beauchamp M.H., Martinez-Bermudez, A.K., Gobeil F. Jr., Marrache A.M., Hou X., Speranza G., Abran D., Quiniou C., Lachapelle P., Roberts L.J. II, *J. Appl. Physiol.* **90** (2001) 2279–2299.
- [44] Okazawa, A., Kawikova, I., Cui, Z. H., Skoogh, B. E., Lotvall, J., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **155** (1997) 436–441.
- [45] Patrono C., FitzGerald G.A., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **17** (1997) 2309–2315.
- [46] Davi G., Ciabattini G., Consoli A., Mezzetti A., Falco A., Santarone S., Pennese E., Vitacolonna E., Bucciarelli T., Costantini F., *Circulation* **99** (1999) 224–229.
- [47] Kawikova I., Barnes P.J., Takahashi T., Tadjkarimi S., Yacoub M.H., Belvisi M.G., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **153** (1996) 590–596
- [48] Morrow J.D., Roberts L.J. II, *Prog. Lipid Res.* **36** (1997) 1–21.
- [49] Morrow J.D., Moore K.P., Awad J.A., Ravenscraft M.D., Marini G., Badr K.F., Williams R., Roberts L.J. II, *J. Lipid Mediat.* **6** (1993) 417–420.
- [50] Holt S., Reeder B., Wilson M., Harvey S., Morrow J.D., Roberts L.J. II, Moore K., *Lancet* **353** (1999) 1241.

- [51] Moore K.P., Holt S.G., Patel R.P., Svistunenکو D.A., Zackert W., Goodier D., Reeder B.J., Clozel M., Anand R., Cooper C.E., *J. Biol. Chem.* **273** (1998) 31731–31737.
- [52] Opis patentowy, 192973, PL, Zgłosz. P. 351289 z 30.06.2003. Opubl. 29.12.2006. Urządzenie do zbierania kondensatu pary wodnej wydychanego powietrza. Uniwersytet Medyczny w Łodzi, Łódź, PL. Twórcy: Dariusz Nowak, Marzena Kobus, Marek Mokwiński.
- [53] Lema J.B., González M., Vigil L., Casan P., *Arch. Bronconeumol.* **41** (10) (2005) 584-586.
- [54] Fairchild C., Stampfer J., *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **48** (1987) 948-949.
- [55] Fritter D., Knobler C., *Physical Review A* **43** (1991) 2858-2869.
- [56] Papineni R., Rosenthal F., *J. Aerosol Med.* **10** (1997) 105.
- [57] Chung-Yung J., Lee S.H.H., Jenner A.M., Halliwell B., *Free Radical Bio. Med.* **44** (2008) 1314–1322.
- [58] Ohashi N., Yoshikawa M., *J. Chromatogr. B* **746** (2000) 17–24.
- [59] Saenger A.K., Laha T.J., Edenfield M.J., Sadrzadeh S.M.H., *Clin. Biochem.* **40** (2007) 1297–1304.
- [60] Taylor A.W., Bruno R.S., Frei B., Traber M.G., *Anal. Biochem.* **350** (2006) 41–51.
- [61] Chung-Yung J. Lee S.H.H., Jenner A.M., Halliwell B., *Free Radical Biol. Med.* **44** (2008) 1314–1322.
- [62] Greco A., Minghetti L., Puopolo M., Pietrobon B., Franzoi M., Chiandetti L., Suppiej A., *Clin. Biochem.* **40** (2007) 1420–1422.
- [63] Longini M., Perrone S., Kenanidis A., Vezzosi P., Marzocchi B., Petraglia F., Centini G., Buonocore G., *Free Radical Biol. Med.* **38** (2005) 1537– 1541.
- [64] Morrow J.D., Roberts L.J., *Methods Enzymol.* **300** (1999) 3-12.
- [65] Schweer H., Watzer B., Seyberth W., Nu R.M., *J. Mass Spectrom.* **32** (1997) 1362 1370.
- [66] Wubert J., Reder E., Kaser A., Weber P.C., Lorenz R.L., *Anal. Chem.* **69** (1997) 2143-2146.
- [67] Klawitter J., Haschke M., Shokati T., Klawitter J., Christians U., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **25** (2011) 463–468.

- [68] Biomarkers Definitions Working Group, *Clin. Pharmacol. Ther.* **69** (2001) 89–95.
- [69] Nicolaou N.C., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **174** (2006) 254–259.
- [70] Kennedy C.H., Church D.F., Winston G.W., Pryor W.A., *Free Radical Biol. Med.* **12** (1992) 381-387.
- [71] Paur, E., Youngman, R.J., Lengfelder, E., Elstner, E.F., *Z Naturforsch.* **39** (1984) 261-267.

DOROBEK NAUKOWY

Współautor publikacji w czasopiśmie z listy filadelfijskiej:

1. **Janicka M.**, Kot-Wasik A., Namieśnik J. „Analytical procedures for determination of cocaine and its metabolites in biological samples” *Trends Anal. Chem.*, **29** (2010) 209 (**IF 6,602**).
2. **Janicka M.**, Kot-Wasik A., Kot J., Namieśnik J. „Isoprostanes-biomarkers of lipid peroxidation: their utility in evaluating oxidative stress and analysis” *Int. J. Mol. Sci.*, **11** (2010) 4631(**IF 2.598**).
3. **Janicka M.**, Kot-Wasik A., Kot J., Namieśnik J. „Sensitive determination of isoprostanes in exhaled breath condensate samples with use of liquid chromatography – tandem mass spectrometry” *J. Chromatogr B*, **893– 894** (2012) 144 (**IF 2,888**).
4. **Janicka M.**, Kot-Wasik A., Paradziej-Łukowicz J., Sularz-Peszyńska G., Bartoszek A., Namieśnik J. „LC-MS/MS determination of isoprostanes in plasma samples collected from mice exposed to doxorubicin or tert-butyl hydroperoxide” *Int. J. Mol. Sci.* (w recenzji)

Inne czasopisma:

1. **Janicka M.**, Kot-Wasik A., Kot J., Namieśnik J., „Analiza kondensatów oddechowych-wyzwanie dla analityków” *Analityka* **1** (2011) 16.
2. Kot-Wasik A., **Janicka M.**, Zyglar A., Wasik A., Namieśnik J., „QuEChERS – szybkość i łatwość w przygotowaniu próbek” *Analityka* **1** (2012) 34.
3. Zyglar A., Wasik A., **Janicka M.**, Kot-Wasik A., Namieśnik J. „Ekstrakcja do fazy stałej niejedno ma imię” *Analityka* **3** (2012) 12-19.

Druki zwarte:

1. **Janicka M.**, Bajger-Nowak G., Kot-Wasik A. „Rozwiązywanie problemów w chromatografii cieczowej” skrypt dla studentów wydawany ze środków Unii Europejskiej

w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego (UDA-OPKL 04.01.02.-00-033/09-00) (w druku).

Komunikaty i postery

1. **Janicka M.** „*Oznaczanie izoprostanów, markerów stresu tlenowego w materiale biologicznym z wykorzystaniem techniki HPLC-MS/MS*” Materiały Sesji Sprawozdawczej Studium Doktoranckiego za rok 2008/2009, Gdańsk 22-23.09.2009 str. 34 (komunikat).

2. **Janicka M.**, Kot-Wasik A., Namieśnik J. „*Analiza kondensatów oddechowych - wyzwanie dla analityków*” Materiały VIII Polskiej Konferencji Chemii Analitycznej, Kraków 4-9.07.2010 str. 430 (komunikat).

3. **Janicka M.**, Kot-Wasik A., Namieśnik J. „*Metoda oznaczania cyklofosfamidu w próbkach wód powierzchniowych*” Materiały VIII Polskiej Konferencji Chemii Analitycznej: Analityka dla Społeczeństwa XXI wieku, Kraków 4-9.07.2010 str. 149 (poster).

4. **Janicka M.**, Kot-Wasik A., Namieśnik J. “*Sample preparation of exhaled breath condensate for isoprostan determination*” Materiały konferencyjne ExTech 2010 - International Symposium on Advances in Extraction Technologies, Poznań 20-22.09.2010 str. 100 (poster).

5. **Janicka M.** „*Oznaczanie izoprostanów, markerów stresu tlenowego w materiale biologicznym z wykorzystaniem techniki HPLC-MS/MS*” Materiały Sesji Sprawozdawczej Studium Doktoranckiego za rok 2009/2010, Gdańsk 27-28.09.2010 str. 42 (wystąpienie ustne).

6. **Janicka M.**, Zyglar A., Jakimska A., Kot-Wasik A., Namieśnik J. „*Izoprostanowy markery stresu tlenowego - analiza próbek kondensatów oddechowych*” Materiały IX Konferencji Chromatograficznej „Chromatografia? To przecież codzienność!” - Poznań 26-29.06.2011 str. 71. (komunikat).

7. **Janicka M.**, Zyglar A., Jakimska A., Kot-Wasik A., Namieśnik J. „*Ocena stabilności izoprostanów, markerów stresu tlenowego w próbkach kondensatów oddechowych*” Materiały IX Konferencji Chromatograficznej „Chromatografia? To przecież codzienność!” Poznań 26-29.06.2011 str. 227 (poster).

8. **Janicka M.**, Zyglar A., Jakimska A., Kot-Wasik A., Namieśnik J. „*Oznaczanie 3-nitrotyrozyny w próbkach kondensatów oddechowych*” Materiały IX Konferencji Chromatograficznej „Chromatografia? To przecież codzienność!” Poznań 26-29.06.2011 str. 228 (poster).

9. Zyglar A., Wasik A., **Janicka M.**, Jakimska A., Kot-Wasik A., Namieśnik J. „*Procedura jednoczesnego oznaczania substancji intensywnie słodzących*”

z wykorzystaniem techniki HPLC-MS” - IX Konferencja Chromatograficzna „Chromatografia? To przecież codzienność!” Poznań 26-29.06.2011 str. 104 (poster).

10. Zygler A., Wasik A., **Janicka M.**, Jakimska A., Kot-Wasik A., Namieśnik J. „*Badanie stabilności dziewięciu substancji słodzących w produktach żywnościowych*” - IX Konferencja Chromatograficzna „Chromatografia? To przecież codzienność!” Poznań 26-29.06.2011 str. 103 (poster).

11. **Janicka M.**, Zygler A., Jakimska A., Kubica P., Kot-Wasik A., Namieśnik J. „*Study of degradation products of tetracyclines using HPLC-MS/MS*” 17th International Symposium on Separation Sciences: book of abstracts, Cluj Napoca, Romania, 5-9.09.2011, str. 104 (poster).

12. **Janicka M.**, Zygler A., Jakimska A., Kubica P., Kot-Wasik A., Namieśnik J. „*Determination of cyclophosphamide in surface water*” 17th International Symposium on Separation Sciences: book of abstracts, Cluj Napoca, Romania, 5-9.09.2011, str. 105 (poster).

13. **Janicka M.**, Zygler A., Jakimska A., Kubica P., Kot-Wasik A., Namieśnik J. „*Increased confidence of biomarkers identification in EBC samples using LC-MS/MS*” Joint Conference of the Polish Mass Spectrometry Society and German Mass Spectrometry Society, Poznań, 4-7.03.2012, str. 266 (poster).

14. Zygler A., Jakimska A., Kubica P., **Janicka M.**, Wasik A., Kot-Wasik A., Namieśnik J. „*Stability study of sweeteners in beverages and identification of potential degradation products using hyphenated techniques*” Joint Conference of the Polish Mass Spectrometry Society and German Mass Spectrometry Society, Poznań, 4-7.03.2012, str. 213 (poster).

15. Kubica P., **Janicka M.**, Zygler A., Jakimska A., Kot-Wasik A., Namieśnik J. „*Carbohydrate analysis in urine by liquid chromatography and tandem mass spectrometry as non-invasive method for establish permeability of digestive tract*” Joint Conference of the Polish Mass Spectrometry Society and German Mass Spectrometry Society, Poznań, 4-7.03.2012, str. 289 (poster).

16. Jakimska A., Kubica P., **Janicka M.**, Zygler A., Kot-Wasik A., Namieśnik J. „*Mass spectrometers as a powerful tool for stability studies and identification of degradation products of tetracyclines*” Joint Conference of the Polish Mass Spectrometry Society and German Mass Spectrometry Society, Poznań, 4-7.03.2012, str. 186 (poster).

Nagrody i wyróżnienia

1. Stypendium w ramach projektu „Mistrz” (edycja 2009) FNP w roku akademickim 2009-2010.

2. Uzyskano grant promotorski „Umowa nr 2016/B/P01/2010/39 do wniosku nr N N404 201639 pt. Izoprostany - markery stresu tlenowego. Opracowanie nowej metodyki oznaczania izoprostanów w próbkach materiału biologicznego.
3. Stypendium w ramach projektu „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii” (POKL.04.01.01-00-368/09”).
4. Stypendium wyjazdowe w ramach projektu „Rozwój interdyscyplinarnych studiów doktoranckich na Politechnice Gdańskiej w zakresie nowoczesnych technologii” (POKL.04.01.01-00-368/09) w roku 2010-2011. Realizacja projektu “NON-TARGETED FT-ICR-MS METABOLOME VARIATIONS IN EXHALED BREATH CONDENSATE AS A FUNCTION OF OXIDATIVE STRESS.” w HelmholtzZentrum München.
5. Zwiększenie stypendium doktoranckiego za osiągnięcia badawcze z dotacji podmiotowej na dofinansowanie zadań projakościowych w roku akademickim 2010/2011.

Załącznik 1. Wyniki oznaczania zawartości aminokwasów w próbkach EBC uzyskane z wykorzystaniem opracowanej metodyki analitycznej

Nr	ALA	MET	FEN	TRYP	LEU	KGLU	GLU	HIS	HYD	TRE	TYR	PRO	WAL	ARG	LIZ	KASP	ASP	SER		
Stężenie [ng/ml]																				
Przed komora hiperbaryczną	1	1,310	<LOD	0,771	0,238	4,050	<LOD	<LOD	<LOD	1,150	1,140	1,030	0,662	0,351	13,800	<LOD	<LOD	1,650	<LOD	
	2	<LOD	<LOD	0,000	0,000	0,000	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
	3	5,615	0,331	2,165	1,075	14,700	<LOD	0,470	<LOD	3,950	4,190	2,430	2,280	2,380	2,205	0,595	0,853	1,965	16,600	
	4	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	
	5	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak
	6	0,187	<LOD	0,450	0,246	1,585	<LOD	<LOD	<LOD	0,557	0,654	0,678	0,171	0,652	0,097	<LOD	<LOD	1,435	<LOD	
	7	0,853	<LOD	0,590	0,300	2,605	<LOD	0,204	<LOD	0,816	0,976	0,820	0,110	0,725	0,064	<LOD	<LOD	1,865	<LOD	
	8	<LOD	<LOD	0,258	0,125	0,460	<LOD	<LOD	<LOD	0,292	0,322	0,446	<LOD	0,416	0,000	<LOD	<LOD	1,420	<LOD	
	9	0,629	<LOD	0,706	0,407	3,085	<LOD	<LOD	<LOD	0,931	0,838	0,914	1,021	0,718	0,759	<LOD	<LOD	1,680	<LOD	
Po komorze hiperbarycznej	1	1,080	<LOD	0,972	0,576	5,010	<LOD	<LOD	<LOD	1,560	1,365	1,230	0,361	1,031	0,712	<LOD	<LOD	1,725	0,369	
	2	1,127	0,028	0,650	0,530	3,390	<LOD	<LOD	<LOD	1,031	1,245	0,914	0,313	1,024	0,177	<LOD	<LOD	1,505	1,430	
	3	5,730	0,250	1,985	0,962	13,300	<LOD	0,192	<LOD	3,525	3,920	2,545	1,885	2,205	2,245	<LOD	0,446	1,575	16,650	
	4	7,010	0,377	2,425	0,855	18,100	<LOD	0,586	<LOD	4,715	5,430	2,475	2,070	2,910	2,510	1,500	0,273	1,910	22,650	
	5	5,450	0,304	2,400	1,210	15,900	<LOD	0,407	<LOD	4,205	4,390	2,650	1,835	2,355	2,865	1,175	<LOD	2,310	16,200	
	6	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak
	7	1,765	<LOD	1,155	0,736	5,930	<LOD	0,045	<LOD	1,710	2,005	1,395	1,845	1,190	3,890	<LOD	<LOD	1,900	1,495	
	8	0,745	<LOD	0,621	0,376	2,995	<LOD	<LOD	<LOD	0,942	1,075	0,677	0,534	0,727	<LOD	<LOD	<LOD	2,140	<LOD	
	9	1,525	0,101	0,855	0,514	4,610	<LOD	<LOD	<LOD	1,360	1,525	0,968	0,926	0,890	0,686	0,000	0,000	1,710	1,571	
Przed komora hiperbaryczną	10	<LOD	0,003	0,274	0,174	<LOD	<LOD	<LOD	6,320	0,555	0,362	<LOD	<LOD	0,421	0,700	4,025	3,750	<LOD	<LOD	
	11	2,195	0,132	0,883	0,511	<LOD	1,410	0,279	3,590	1,825	1,745	1,200	9,525	1,215	4,330	0,028	5,555	3,235	3,330	
	12	4,595	0,261	1,425	0,739	<LOD	0,191	<LOD	3,865	3,180	3,185	1,825	1,315	2,155	0,339	1,150	8,920	<LOD	13,150	
	13	11,300	0,549	3,470	1,540	<LOD	2,070	0,251	7,775	7,875	8,330	4,755	3,810	5,175	1,440	3,295	24,100	2,885	40,000	
	14	0,877	0,096	0,612	0,364	<LOD	0,071	<LOD	<LOD	1,094	1,008	0,845	0,839	0,631	<LOD	<LOD	0,462	1,500	<LOD	
	15	<LOD	0,058	0,334	0,176	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,596	0,474	0,508	0,022	0,402	<LOD	<LOD	<LOD	1,200	<LOD	
	16	17,350	1,420	8,570	4,345	<LOD	9,160	1,780	19,300	16,100	15,300	11,700	8,590	9,410	11,950	8,015	42,350	4,505	73,450	
	17	1,635	0,117	0,971	0,676	<LOD	<LOD	<LOD	1,730	1,825	1,675	1,225	0,383	1,125	0,286	<LOD	2,585	1,065	3,285	

Załącznik 1. c.d.

Po komorze hiperbarycznej	10	8,175	0,729	3,995	2,355	<LOD	4,000	0,884	8,730	7,515	7,345	5,240	3,555	4,585	6,120	2,410	15,300	2,970	28,950
	11	0,922	0,116	0,497	0,256	0,076	<LOD	<LOD	<LOD	1,100	1,350	0,800	1,070	0,764	0,054	<LOD	1,180	1,110	<LOD
	12	<LOD	0,013	0,198	0,105	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,306	0,000	<LOD	<LOD	0,208	6,865	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	13	0,787	0,082	0,444	0,230	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	1,032	1,068	0,561	0,107	0,746	<LOD	<LOD	<LOD	1,020	0,529
	14	20,200	1,310	7,820	3,805	0,002	5,495	1,110	15,400	16,050	16,700	11,000	7,470	10,275	3,545	7,135	46,600	4,745	85,450
	15	0,135	0,041	0,478	0,255	0,141	<LOD	<LOD	<LOD	0,911	0,818	0,691	0,200	0,526	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	16	<LOD	<LOD	0,245	0,139	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,459	0,344	0,226	<LOD	0,309	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD
	17	1,410	0,132	0,687	0,393	<LOD	<LOD	<LOD	0,640	1,480	1,425	0,968	0,453	1,038	<LOD	<LOD	1,295	1,135	1,286
Przed komora hiperbaryczną	18	0,373	0,075	1,740	0,702	<LOD	1,420	0,316	<LOD	3,545	4,960	2,860	2,190	2,510	1,270	<LOD	13,200	2,560	25,150
	19	0,379	0,092	0,706	0,360	<LOD	0,000	<LOD	<LOD	1,465	2,120	1,135	0,543	1,034	0,146	<LOD	3,505	1,520	5,540
	20	0,492	0,228	1,131	0,509	<LOD	2,410	0,080	<LOD	2,536	2,950	2,020	2,730	1,732	0,640	0,503	17,800	1,480	31,300
	21	0,889	<LOD	0,297	0,144	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,516	0,592	0,534	0,102	0,366	0,523	<LOD	0,326	1,330	<LOD
	22	<LOD	<LOD	0,526	0,306	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,889	1,320	0,894	0,144	0,685	0,267	<LOD	3,250	0,498	1,205
	23	6,440	<LOD	0,392	0,186	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,743	0,730	0,719	0,200	0,508	0,418	<LOD	1,045	<LOD	<LOD
	24	1,800	<LOD	0,399	0,195	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,786	0,497	0,538	0,019	0,528	0,118	<LOD	1,577	0,436	0,861
	25	5,940	<LOD	0,377	0,186	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,771	0,446	0,511	0,216	0,509	1,420	<LOD	0,666	<LOD	<LOD
Po komorze hiperbarycznej	18*	169,50	1,935	155,50	15,700	263,50	583,50	286,500	270,000	1,930	82,400	415,500	319,000	1,610	544,000	211,500	359,500	47,600	291,000
	19	<LOD	<LOD	0,151	0,062	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,330	0,101	0,136	0,000	0,237	<LOD	4,570	<LOD	<LOD	<LOD
	20	1,685	<LOD	0,722	0,291	<LOD	0,056	<LOD	<LOD	1,385	1,180	1,015	0,313	0,929	0,093	<LOD	4,925	1,395	0,675
	21	2,385	0,088	0,817	0,417	<LOD	0,134	0,097	<LOD	1,690	2,265	1,290	0,898	1,240	0,272	<LOD	7,675	1,810	6,955
	22	8,300	0,151	2,480	1,195	<LOD	3,080	0,643	<LOD	5,205	7,560	4,530	3,120	3,810	2,185	<LOD	20,850	2,155	34,150
	23	0,634	<LOD	0,472	0,202	<LOD	<LOD	0,059	<LOD	0,880	1,043	0,742	0,196	0,573	<LOD	<LOD	2,280	1,016	<LOD
	24	54,600	1,660	12,800	5,765	<LOD	20,600	4,900	<LOD	30,800	31,050	20,900	23,900	22,200	13,550	22,350	128,500	13,750	248,500
25	2,850	<LOD	0,830	0,497	<LOD	0,308	0,165	<LOD	1,855	2,530	1,200	1,090	1,235	<LOD	<LOD	6,065	1,510	5,825	

*próbka EBC zanieczyszczona śliną