

# Abstrakt

Vývoj a validace metod pro stanovení endogenních sloučenin zůstává i přes velký pokrok v analytických technikách stále náročným úkolem, vzhledem k přirozené přítomnosti analytu ve zkoumané biologické matrici. Na rozdíl od xenobiotik, která se běžně v biologickém materiálu nevyskytují, představují endogenní látky zásadní problém vedoucí k nemožnosti získat analytu prostý vzorek tzv. blank, kterého se využívá při vývoji a validaci nové metody pro přípravu referenčních vzorků. Je popsáno několik obecně uznávaných a používaných postupů pro řešení tohoto problému, jako je použití náhradních matric, matric očištěných od analytu, nebo zástupných analytů, nicméně použité pracovní postupy však ne vždy splňují požadavky na vývoj spolehlivé analytické metody dle validačních směrnic a předpisů.

Cílem této studie bylo navrhnout nový přístup v přípravě validačních referenčních vzorků při zachování povahy biologické matrice a vyřešení problému s přirozenou přítomností analyzovaných sloučenin v těchto vzorcích a validovanou metodu aplikovat v rámci metabolomických studií zaměřených na výzkum vybraných jaterních onemocnění v rámci klinického i základního výzkumu na *in vivo* modelech. Použitý postup je odvozen od metody standardního přídávku. Na rozdíl od klasické metody je však přídavek upraven dle zjištěné bazální koncentrace sledovaných látek ve směsné biologické matrici tak, aby byla v referenčních vzorcích získána předem definovaná koncentrace odpovídající požadavkům regulačních orgánů. V případě této práce se vycházelo z validačních doporučení pro bioanalytické metody, vydaného Evropskou lékovou agenturou (European Medicines Agency – EMA). Hlavní výhodou a inovací validačního konceptu, určeného pro endogenní látky popsaného v naší práci, je implementace autentické, nemodifikované biologické matrice a autentického analytického standardu při přípravě referenčních vzorků. Tento nový přístup byl použit v rámci validace LC-MS/MS metody určené ke kvantifikaci 15 žlučových kyselin přítomných v lidské plazmě. Metoda byla úspěšně validována podle směrnice EMA s dolní mezí kvantifikace 5 nM a linearitou v rozmezí 5–2000 nM. Validovaná metoda byla následně použita v metabolomické studii na kohortě 28 těhotných žen k detekci intrahepatální cholestázy, hlavního jaterního onemocnění pozorovaného u těhotných. Výzkum probíhal také v rámci studií orientovaných na kvalitativní a kvantitativní změny koncentrací žlučových kyselin na *in vivo* modelech s estrogeny indukovanou cholestázou.