

UNIVERZITA KARLOVA
Lékařská fakulta v Hradci Králové

DISERTAČNÍ PRÁCE

Doktorský studijní program
Lékařská chemie a biochemie

Hodnocení metabolismu a exkrece endogenních látek a xenobiotik

Evaluation of metabolism and excretion of endogenous substances and xenobiotics

RNDr. Martin Uher

Školitel: doc. Ing. Miloš Hroch, Ph.D.

Hradec Králové, 2023

Prohlášení autora

Prohlášení:

Prohlašuji tímto, že jsem doktorskou disertační práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje. Zároveň dávám souhlas k tomu, aby tato práce byla uložena v Lékařské knihovně Lékařské fakulty v Hradci Králové a zde užívána ke studijním účelům za předpokladu, že každý, kdo tuto práci použije pro svou publikační nebo přednáškovou činnost, se zavazuje, že bude tento zdroj informací řádně citovat.

Souhlasím se zpřístupněním elektronické verze mé práce v informačním systému Univerzity Karlovy, Praha.

Hradec Králové, 2023

Martin Uher

„Rozdělení věd: Nedá-li se věc pochopit selským rozumem, jde o matematiku. Když to nedává žádný smysl, pak se jedná buď o ekonomii, nebo o psychologii. Jestliže to zapáchá, je to chemie. Nefunguje-li to, je to fyzika.“

Murphyho zákon

Na tomto místě bych rád poděkoval vedoucímu disertační práce, doc. Ing. Milošovi Hrochovi, Ph.D., za odborné vedení, všestrannou pomoc, množství cenných a inspirativních rad, podnětů, doporučení a připomínek a zároveň za velkou trpělivost, ochotu a čas, který mi věnoval při konzultacích poskytnutých během sepsování této práce.

Rád bych poděkoval také své rodině a všem, kteří mě během studia podporovali.

Obsah

1. Úvod	11
1.1. Žlučové kyseliny	11
1.1.1. Syntéza žlučových kyselin.....	12
1.1.2. Metabolismus a regulace syntézy žlučových kyselin	14
1.1.3. Patofyziologie související se žlučovými kyselinami	15
1.2. Stanovení xenobiotik	16
1.3. Stanovení endogenních sloučenin – problematika slepého vzorku.....	17
1.4. Metody stanovení žlučových kyselin	20
1.4.1. Separační techniky v analýze žlučových kyselin.....	20
1.4.2. Detekční koncovky v analýze žlučových kyselin.....	21
1.4.3. Enzymatické metody v analýze žlučových kyselin.....	22
2. Cíle práce.....	23
3. Metodická část	24
3.1. Úvod.....	24
3.2. Materiál a reagentie.....	25
3.3. Instrumentace	26
3.3.1. Chromatografie	26
3.3.2. Hmotnostní spektrometrie.....	26
3.4. Standardy a roztoky.....	28
3.5. Zástupné matrice.....	29
3.5.1. Příprava stripované plazmy.....	29
3.5.2. Příprava umělé plazmy.....	30
3.6. Příprava vzorků.....	31
3.7. Validace metody.....	31
3.7.1. Selektivita	32
3.7.2. Matriční efekty	32
3.7.3. Výtěžnost metody	33
3.7.4. Kalibrační model.....	33
3.7.5. Dolní mez kvantifikace	34
3.7.6. Přesnost a správnost.....	34
3.7.7. Integrita ředění.....	35
3.7.8. Stabilita.....	35

4.	Výsledky a diskuze.....	36
4.1.	Nový přístup k validaci LC-MS metod pro stanovení endogenních sloučenin – aplikace při stanovení žlučových kyselin.....	36
4.2.	Porovnání zástupných matric.....	37
4.2.1.	Stripovaná plazma.....	37
4.2.2.	Umělá plazma.....	40
4.2.3.	Roztok methanolu.....	41
4.3.	Validace metody.....	44
4.3.1.	Selektivita.....	44
4.3.2.	Matriční efekty.....	44
4.3.3.	Výtěžnost metody.....	45
4.3.4.	Kalibrační model.....	45
4.3.5.	Dolní mez kvantifikace.....	55
4.3.6.	Přesnost a správnost.....	55
4.3.7.	Stabilita.....	58
4.3.8.	Integrita ředění.....	59
4.4.	Aplikace metody.....	62
4.4.1.	Stanovení koncentrací žlučových kyselin u gravidních pacientek.....	62
4.4.2.	In vivo studie na potkanech s deficiencí MRP2.....	65
4.4.3.	In vivo studie na myších po podání metforminu.....	68
5.	Závěr.....	72
6.	Citace.....	73

Seznam použitých zkratk

ASBT	apical sodium-dependent bile acid transporter
BSA	bovinní sérový albumin
BSEP	bile salt export pump
CA	kyselina cholová
CCF	proložení kalibrační křivky
CCP	předvídatelnost kalibrační křivky
CDCA	kyselina chenodeoxycholová
CE	kolizní energie
CV	variační koeficient
CYP	cytochrom P
DASI	derivatizace analytu stabilním izotopem
DCA	kyselina deoxycholová
EMA	European medicines agency
FDA	Food and drug administration
FXR	Farnesoid X receptor
GC	plynová chromatografie
GCA	kyselina glykocholová
GCDCA	kyselina glykochenodeoxycholová
GDCA	kyselina glykodeoxycholová
GDM	gestační diabetes mellitus
GHT	gestační hypotyreóza
GLCA	kyselina glykolitocholová
GUDCA	kyselina glykoursodeoxycholová
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
HRMS	hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením
HSA	lidský sérový albumin
ICP	intrahepatální cholestáza u těhotných

IS	vnitřní standard
LCA	kyselina lithocholová
LC	kapalinová chromatografie
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
LLE	extrakce kapalina-kapalina
LLOQ	spodní mez kvantifikace
MRM	multiple reaction monitoring
MRP2	multidrug resistance protein-2
MRP3	multidrug resistance protein-3
MS	hmotnostní spektrometrie
NMR	nukleární magnetická rezonance
PP	precipitace proteinů
QC	kontrola kvality
RE	relativní chyba
RT	retenční čas
SD	směrodatná odchylka
SILA	analogy se stabilně značenými izotopy
SPE	extrakce na pevné fázi
TCA	kyselina taurocholová
TCDCA	kyselina taurochenodeoxycholová
TDCA	kyselina taurodeoxycholová
TLC	tenkovrstvá chromatografie
TLCA	kyselina taurolithocholová
TUDCA	kyselina tauroursodeoxycholová
UDCA	kyselina ursodeoxycholová
UPLC	ultra-účinná kapalinová chromatografie

Souhrn

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) [1]. 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.

Summary

Despite the significant progress in analytical techniques, the development and validation of methods for determining endogenous compounds is still a challenging task due to the natural presence of the analyte in the investigated biological matrix. In contrast to xenobiotics, which do not normally occur in biological material, endogenous substances represent a fundamental problem leading to the impossibility of obtaining an analyte-free sample, the so-called blank, which is used in the development and validation of a new method for the preparation of reference samples. Several generally accepted procedures to solve this problem are described, such as the use of surrogate matrices, analyte-purified matrices, or surrogate analytes; however, the used procedures do not always meet the requirements for developing a reliable analytical method according to the given guidelines and regulations.

This study aimed to propose an alternative approach in the preparation of validation reference samples while preserving the original biological matrix and solving the problem with the natural presence of analyzed compounds in these samples and, subsequently, apply the validated method as part of metabolomic studies focused on the research of selected liver diseases. The presented procedure is based on the standard addition method. However, in contrast to the classic method, the addition is adjusted according to the basal concentration of the monitored substances in the mixed biological matrix, so that a predefined concentration is obtained in the reference samples. In this work, we followed the validation recommendations for bioanalytical methods issued by the European Medicines Agency (EMA) [1]. The main advantage and innovation of our validation concept is the implementation of an authentic, unmodified biological matrix and an authentic analytical standard in preparing reference samples. This novel approach was used to validate an LC-MS/MS method designed to quantify 15 bile acids in human plasma. The method was successfully validated with a lower limit of quantification of 5 nM and linearity in the range of 5–2000 nM and used in a metabolomic study on a cohort of 28 pregnant women to detect intrahepatic cholestasis. The research was also focused on bile acids metabolomics in animal models of estrogen-induced cholestasis.

1. Úvod

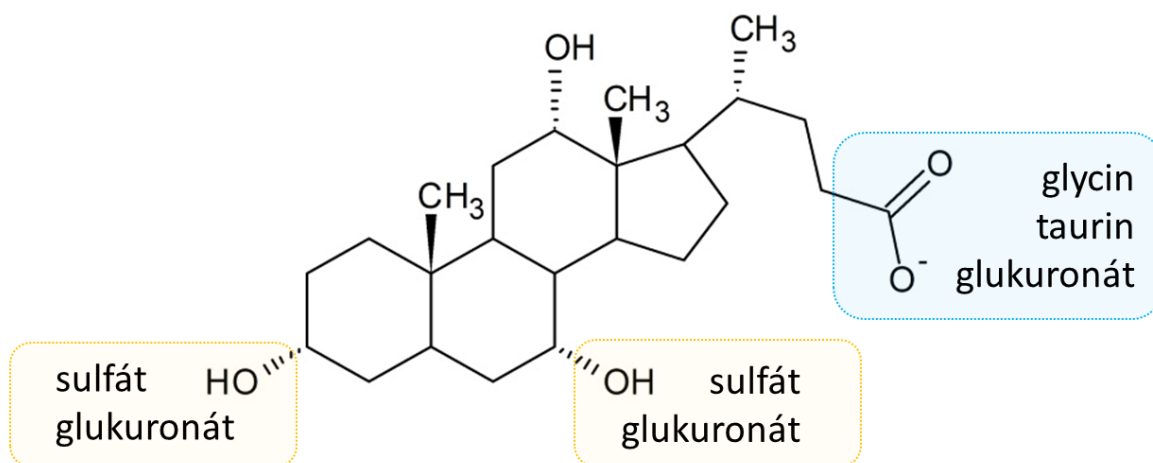
Za endogenní látky považujeme ty látky, které jsou přirozeně přítomné v organismu. Je to velmi různorodá skupina a řadíme sem například hormony, aminokyseliny, enzymy, peptidy, proteiny, intermediáty, koncové produkty metabolických drah a mnoho dalších. Konkrétní látky ze skupiny endogenních sloučenin mohou být produkovány ubikvitně, různými tkáněmi, nebo mohou být striktně orgánově specifické.

Vzhledem k tomu, že mnohé patologické změny a onemocnění mohou zásadním způsobem ovlivnit produkci těchto látek, mohou být některé z nich s výhodou využity jako markery chorob a jejich stanovení může být přínosné pro klinickou diagnostiku. Využít je však lze nejen k diagnostice určitého onemocnění, ale i ke sledování jeho progresu, nebo efektivity nasazené léčby [2-4].

V dnešní době je již zcela běžné využití mnoha endogenních látek jako diagnostických markerů a díky vědecko-výzkumným aktivitám se standardní panel biochemických vyšetření stále rozrůstá o nové. Tento trend v mnoha případech přináší benefity v rychlejší a přesnější diagnostice [5].

1.1. Žlučové kyseliny

Významnou skupinou endogenních látek jsou i žlučové kyseliny, na které je zaměřena předkládaná disertační práce. Struktura žlučových kyselin obsahuje celkem 24 uhlíků a je odvozena od cyklopentan-perhydrofenanthrenového skeletu, na který jsou navázány hydroxylové skupiny a alifatický řetězec zakončený karboxylovou funkční skupinou. Žlučové kyseliny jsou i navzdory svému amfipatickému charakteru ve vodě spíše hůře rozpustné. Pro zlepšení rozpustnosti ve vodném prostředí organismu dochází ke konjugaci s aminokyselinami taurinem nebo glycinem, v menší míře pak ke konjugaci se sulfátem nebo kyselinou glukuronovou, což probíhá v játrech (Obrázek 1). Z fyziologického hlediska hrají žlučové kyseliny v těle zásadní roli jako emulgátory při trávení a vstřebávání lipidů a jsou klíčové v metabolismu cholesterolu, který je prekurzorem jejich syntézy a slouží jako jeden z mechanismů eliminace endogenního cholesterolu. V poslední dekádě se ukázalo, že žlučové kyseliny mají velký význam i jako signální molekuly ovlivňující energetický metabolismus organismu [6].



Obrázek 1. Kyselina cholová jako modelový příklad obecné struktury žlučových kyselin s vyznačenými místy možných konjugací.

1.1.1. Syntéza žlučových kyselin

Jak bylo uvedeno v předchozí kapitole, prekurzorem syntézy žlučových kyselin je cholesterol a za jeden den se jej přetvoří okolo 0,5 gramu [7]. Syntéza žlučových kyselin je komplexní děj, na kterém se podílí 17 enzymů, které jsou exprimovány především v játrech. V konečné fázi metabolické dráhy se formují tzv. primární žlučové kyseliny [8]. Mezi nejdůležitější primární žlučové kyseliny u lidí patří kyselina cholová (CA) a chenodeoxycholová (CDCA) [9]. Z primárních žlučových kyselin jsou pak procesem dehydroxylace v poloze 7, prostřednictvím střevního mikrobiomu, tvořeny sekundární žlučové kyseliny [10]. Střevní mikrobiom se mimo dehydroxylaci podílí i na částečné dekonjugaci, takže ve výsledku najdeme ve střevním obsahu směs primárních a sekundárních žlučových kyselin, z nichž část je dekonjugovaná [11]. Mimo výše uvedeného dělení můžeme žlučové kyseliny dále rozdělit na základě pozice navázaných hydroxylových skupin na C3, C6, C7 a C12 [12], nebo dle jejich počtu na mono-, di-, nebo trihydroxylované [8].

Za zmínku stojí i fakt, že žlučové kyseliny mohou být druhově specifické. Například u lidí patří mezi dominantní kyselina cholová a chenodeoxycholová, u myší a potkanů kyselina α - a β -muricholová, u medvědů kyselina ursodeoxycholová (UDCA) a např. u prasat kyselina hyodeoxycholová [8].

Zaměříme-li se na samotnou syntézu žlučových kyselin, rozlišujeme dvě základní syntetické cesty. Klasická cesta, někdy uváděná jako neutrální a alternativní cesta. Společným produktem obou těchto cest jsou primární žlučové kyseliny [13]. Pokud celý proces shrneme, pak nejdůležitějšími kroky celé biochemické dráhy jsou zkrácení postranního řetězce cholesterolu, redukce dvojné vazby v poloze 5 a hydroxylace. U každé z výše zmíněných cest dochází k hydroxylaci na jiném konkrétním uhlíku.

Pro klasickou cestu je typická hydroxylace na 7. uhlíku prostřednictvím 7α -hydroxylázy (CYP7A1) za vzniku 7α -hydroxycholesterolu. Tento krok je klíčový regulační bod tvorby žlučových kyselin [7, 14].

Alternativní cesty syntézy žlučových kyselin jsou z pravidla zahájeny hydroxylací na postranním řetězci v poloze 24, 25 nebo 27 za vzniku oxysterolů [7]. Další kroky poté směřují k modifikaci steroidní části molekuly a zkrácení postranního řetězce. Společným krokem alternativních cest je hydroxylace těchto oxysterolů na 7. uhlíku prostřednictvím oxysterol 7α -hydroxylázy (CYP39A1) [7]. Konečným produktem metabolické dráhy je kyselina chenodeoxycholová [9]. U lidí se alternativní cestou fyziologicky tvoří zhruba 6–7 mg 24-hydroxycholesterolu za den a jen pouze polovina je dále transformována na žlučové kyseliny [15]. Oproti celkovému množství 500 mg žlučových kyselin nově syntetizovaných za den, je to jen nepatrné množství [7, 12].

1.1.2. Metabolismus a regulace syntézy žlučových kyselin

Jak bylo zmíněno již v úvodní kapitole, hlavní funkcí žlučových kyselin je emulgace lipidové složky tráveniny, čímž dochází ke zvětšení povrchu mezifázového rozhraní a usnadnění přístupu lipolytických enzymů ke složkám tráveniny. Ze směsi tuků z potravy, jejich hydrolytických produktů a fosfolipidů a žlučových kyselin jako součástí žluči, vznikají emulgací tzv. směsné micely [16]. Jak směsné micely postupně procházejí tenkým střevem, předávají svůj obsah při styku s kartáčovým lemem enterocytům. Nakonec se v distálním ileu vstřebává až 95 % žlučových kyselin, které se vrací portální žílou zpět do jater [11]. Nevstřebané žlučové kyseliny, mezi něž patří nejčastěji kyselina lithocholová (LCA) odchází z těla se stolicí [11, 17]. Při transportu v plazmě jsou žlučové kyseliny navázány na albumin a lipoproteiny, zejména HDL [18].

Jak již bylo zmíněno v sekci 1.1.1, při průchodu střevem vznikají působením střevní mikrobioty z primárních žlučových kyselin sekundární žlučové kyseliny: kyselina deoxycholová (DCA), lithocholová, ursodeoxycholová, hyodeoxycholová a hyocholová [19-21]. Konjugací primárních (syntetizovaných v játrech) a sekundárních (dopravených do jater portálním oběhem) žlučových kyselin vznikají v játrech rozpustnější formy těchto kyselin. Primárně se v rámci konjugace uplatňují aminokyseliny glycin a taurin. Vzniklé konjugáty mohou však podstupovat další biotransformaci v podobě glukuronidace, sulfatace, hydroxylace, či oxidace [20]. Je důležité si uvědomit, že zastoupení jednotlivých žlučových kyselin je druhově specifické, a i v rámci jednoho živočišného druhu je zde velká interindividuální variabilita. Na celkový objem žlučových kyselin a jejich individuální koncentrace má vliv mnoho faktorů, je důležité brát v potaz životní styl i případné patologické děje probíhající v organismu [14]. Nicméně i v případě některých fyziologických dějů (např. těhotenství), může docházet k patologickým změnám v hladinách žlučových kyselin v souvislosti s hormonálními změnami [22].

Udržení homeostázy žlučových kyselin je striktně regulované [23, 24]. Rychlost syntézy žlučových kyselin je regulována především na úrovni 7 α -hydroxylázy (CYP7A1). Exprese genu kódujícího tento enzym je ovlivněna aktivací Farnesoid X receptoru (FXR) [25, 26]. V játrech pak po navázání žlučových kyselin na FXR receptor dochází k aktivaci transkripčních faktorů zahrnutých v metabolismu žlučových kyselin a lipidů [7, 26]. Pro úplnost je třeba uvést, že FXR je kromě jater exprimován také v tenkém střevě, ledvinách a nadledvinách [27].

Lze si položit otázku, proč je hladina žlučových kyselin tak striktně regulována. Tento fakt souvisí s jednou důležitou vlastností, která zde prozatím nebyla zmíněna, a to je cytotoxicita žlučových kyselin. Ta může vést k poškození membrány mukózních buněk a rozvoji souvisejících patologií [19, 28]. Cytotoxicita žlučových kyselin je dána jejich detergentními vlastnostmi a stoupá se stoupající hydrofobicitou molekuly. Z tohoto hlediska patří tedy mezi nejtoxičtější kyselina lithocholová [23, 29, 30]. Organismus proto musí disponovat mechanismy, které kontrolují produkci a hladiny těchto látek tak, aby se zabránilo možnému poškození tkání, se kterými přicházejí do styku [6, 19, 20].

1.1.3. Patofyziologie související se žlučovými kyselinami

Vzhledem ke své cytotoxicitě mohou žlučové kyseliny hrát zásadní roli v kancerogenezi u orgánů jako jsou játra, žlučník, nebo gastrointestinální trakt, se kterými přicházejí do styku ve vysokých koncentracích [19, 23, 24].

Homeostáza žlučových kyselin může být ovlivněna řadou faktorů spojených zejména s nemocemi jater, žlučníku, střev nebo také s užíváním některých léčiv. Příkladem jaterního onemocnění ovlivňujícího mimo jiné i hladiny žlučových kyselin je intrahepatální cholestáza [22]. Cholestáza je onemocnění související s poruchami tvorby a vylučování žluči, pro které jsou charakteristické i změny hladin žlučových kyselin [21]. Cholestázu můžeme rozdělit na akutní a chronickou, intra nebo extrahepatální, vrozenou nebo získanou [10, 22]. Cholestázy můžeme rozdělit také na zánětlivé a nezánětlivé, cholestázy v souvislosti s poškozením žlučvodů nebo cholestázy způsobené mechanicky [22, 31]. Mezi nezánětlivé intrahepatální cholestázy se řadí například i méně známá cholestáza spojená s těhotenstvím (Intrahepatal Cholestasis of Pregnancy – ICP) [32, 33], jejíž diagnostika byla i součástí této práce.

ICP má v České republice incidenci okolo 0,85 % a vyznačuje se hormonálně podmíněnou poruchou jater nejčastěji během 3. trimestru [34]. V rámci klinických projevů můžeme pozorovat pruritus, abnormální plazmatické koncentrace žlučových kyselin a jaterních aminotransferáz [22, 35]. V tomto ohledu je důležité mít na paměti, že i mírné, klinicky nezřejmé projevy u matky, mohou mít fatální následky pro plod [35].

Jako jeden z použitelných markerů v diagnostice ICP se zdají být právě žlučové kyseliny, u kterých dochází během rozvoje onemocnění k vzestupu celkové koncentrace v plazmě až nad 10 μM [35]. V současnosti je tento jev spojován s výkyvy koncentrací placentárních hormonů během těhotenství, jmenovitě např. choriového gonadotropinu, choriového tyreotropinu, estrogenů a progesteronu [35, 36].

1.2. Stanovení xenobiotik

Analytické techniky, zejména pak separační metody ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) hrají v analýze xenobiotik svou významnou roli, ať už se jedná o léčiva, nebo toxické látky [37-41]. Tato technologie se stále více využívá jako náhrada málo specifických enzymatických testů, vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV/VIS nebo fluorescenční detekcí. Technika zároveň poskytuje komplementární informace k dalším spektrálním metodám jako je NMR, infračervená spektrometrie, nebo ramanovská spektrometrie. Velkou výhodou LC-MS/MS pro stanovení xenobiotik ve srovnání s klasickou HPLC-UV/VIS je zejména vysoká selektivita a v mnoha případech i výrazně vyšší citlivost. Z hmotnostních detektorů, které jsou v dnešní době nejčastěji využívány v kvantitativní analýze, dominuje zejména detektor typu trojitý kvadrupól [42-46], nebo detektory s vysokým rozlišením (HRMS) [47-49]. Pokud tyto dva detektory porovnáme, výhodou prvního z nich je vyšší citlivost, nicméně na rozdíl od HRMS je vhodný pouze pro cílenou analýzu látek, nejčastěji v režimu „Multiple Reaction Monitoring“ (MRM). Oproti tomu HRMS umožňuje měřit monoizotopické hmoty látek s přesností až na 5 desetinných míst, čímž i přes svoji nižší citlivost nalézá své uplatnění v kvantitativní analýze díky výraznému zlepšení selektivity. Tyto detektory lze navíc nasadit v případech necílené analýzy látek a jsou tedy vhodné v oblasti metabolických analýz [50-52]. Vývoj LC-MS/MS metody pro stanovení xenobiotik v biologickém materiálu je mnohastupňový proces zahrnující jak vývoj separační metody pro optimální rozdělení stanovovaných analytů a jejich oddělení od matričních interferentů, tak i optimalizaci nastavení hmotnostního spektrometru pro získání dostatečné citlivosti metody. Na tomto místě nelze opomenout ani nutnost vývoje vhodné metody přípravy vzorku, protože málokdy je možné biologický vzorek nastříkovat bez úpravy přímo do LC-MS systému.

K dispozici je mnoho metod, které při úpravě vzorku poskytují různý stupeň přečištění, nicméně většina všech moderních metod je odvozena od tří původních základních metod, kterými jsou precipitace proteinů (PP), nebo separace analytu mezi dvě nemísitelné fáze. Do tohoto režimu spadá extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE), nebo extrakce na pevnou fázi (SPE).

Závěrečnou fází vývoje každé nové analytické metody je její validace. Validace je proces, kterým získáváme informace o kvalitě nově vyvinuté analytické metody ustanovením definovaných kritérií, jejich měření a následným porovnáním. Existuje velké množství validačních předpisů, nicméně v oblasti bioanalýzy patří mezi dlouhodobě etablované zejména předpisy Evropské lékové agentury (European Medicines Agency – EMA) [1], nebo amerického Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (Food and Drug Administration – FDA) [53].

Během svého studia jsem se zabýval vývojem několika metod pro stanovení xenobiotik, nicméně těžiště mé práce v několika posledních letech leželo v oblasti analýzy žlučových kyselin. Následující kapitoly práce budou tedy věnované především této problematice.

1.3. Stanovení endogenních sloučenin – problematika slepého vzorku

Screening a kvantifikace mnoha endogenních látek, kam řadíme i žlučové kyseliny, patří jak ve výzkumu, tak v běžné klinické praxi, k panelu standardních vyšetření [54-57]. Avšak vývoj a validace bioanalytických metod pro stanovení endogenních látek s sebou přináší určité obtíže.

Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole, v oblasti xenobiotik, jsou k dispozici osvědčené postupy pro vývoj a validaci metody [1, 53], nicméně v případě endogenních látek narážíme na jednu zásadní překážku, kterou je nemožnost získat autentickou biologickou matici bez přítomnosti stanovovaného analytu, tzv. slepý vzorek, neboli blank [5]. V případě endogenních sloučenin obsahuje biologický vzorek obvykle analyt o neznámé koncentraci, což vede k problémům s hodnocením selektivity metody nebo s přípravou referenčních vzorků, jako jsou kalibrátory a vzorky kontroly kvality (QC vzorky). Tento problém lze řešit několika přístupy. Jednou z dobře zavedených metod je metoda standardního přídávku analytu.

Tento postup je preferován, je-li k dispozici dostatečný objem vzorku a je třeba účinné kompenzace matričních efektů. Stává se však nepraktickým v případě větších sérií vzorků a při delších časech jedné analýzy, kdy dochází k neúměrnému nárůstu doby celkové analýzy série vzorků. Navíc tato metoda není schopna kompenzovat přechodné matriční efekty [58].

Další běžně používaný přístup pro přípravu referenčních vzorků je založen na použití autentického analytu přidaného do zástupné matrice [5]. Obecné postupy používané pro přípravu zástupné matrice zahrnují:

1) Použití čistého rozpouštědla [8, 59-62]. Výhodou tohoto postupu je jeho jednoduchost a dlouhodobá reprodukovatelnost. Na druhou stranu zcela ignoruje vlastnosti a složení autentického biologického materiálu.

2) Přípravu syntetické matrice, nazývané také simulovaná nebo umělá biologická matrice [5, 63]. Na rozdíl od použití čistého rozpouštědla přináší tento postup výhodu spočívající v částečném napodobení originálního biologického materiálu. Na druhou stranu je často problematické zcela napodobit složení autentické matrice. V případě komplexních vzorků, jako je sérum, plazma, plná krev nebo tkáň, je většinou nemožné do syntetické matrice zahrnout všechny složky autentického biologického materiálu.

3) Přípravu matrice purifikované od stanovovaného analytu [5]. V tomto případě se autentický biologický materiál očišťuje od analytu purifikační metodou, která by měla být schopna selektivně analyt z matrice odstranit. Deplece analytu může být dosaženo chemickým rozkladem, enzymatickým zpracováním nebo stripováním vhodným sorbentem. Nevýhodou postupu je potenciálně možná eliminace dalších látek přítomných v biologické matrici. Oblíbeným postupem v oblasti deplece analytu je stripování aktivním uhlím [30, 64, 65], nicméně tento postup skýtá několik zásadních úskalí. Stripování se často provádí při laboratorní teplotě v několika po sobě jdoucích krocích během několika hodin [64], během kterých může dojít ke změnám v matrici, jež nejsou pozorovány v průběhu standardní přípravy vzorku. Mohou být také eliminovány případné složky matrice odpovědné za matriční efekty. Ve výsledku mohou tyto faktory vést k situaci, že stripovaná matrice není kvalitativním ani kvantitativním složením ekvivalentní autentické matrici.

Dalším negativním faktorem může být samotné aktivní uhlí. V případě, že stripovaná biologická matrice bude obsahovat rezidua aktivního uhlí, může při přípravě referenčních vzorků docházet k adsorbci přidávaného analytu, což ve výsledku povede k nižší než nominální koncentraci analytu v připravovaném referenčním vzorku [5, 30]. Problém může představovat také variabilita mezi šaržemi při přípravě matrice ochuzené o analyt, a to ať už se provádí v laboratoři, či pochází z komerčního zdroje [5]. Další z možných nevýhod stripování je i relativně nízká výtěžnost purifikované matrice, jak bylo mimo jiné prokázáno v naší laboratoři (viz Sekce 4.2.1.). Metoda není proto příliš vhodná pro těžko dostupné biologické matrice, kde je k dispozici pouze její limitované množství. Ve všech uvedených případech je pro zajištění spolehlivé kvantifikace důležité ověřit paralelitu kalibrací připravených v náhradní a autentické matrici.

4) Zcela odlišným přístupem je použití autentické nemodifikované matrice a zástupného analytu. V tomto případě se používají analogy značené stabilními izotopy (Stable Isotope Labeled Analogs – SILA) [66] spolu s MS nebo MS/MS detekcí. V současné době je tento přístup pravděpodobně nejefektivnějším způsobem, jak vyřešit problém inherentní přítomnosti endogenních sloučenin v biologickém materiálu. Výhodou této metody je možnost použití autentické matrice pro přípravu referenčních vzorků bez nutnosti jejich dalších úprav. Na druhou stranu, SILA nemusí být vždy dostupné pro všechny analyty. Deuterované analogy mohou také vykazovat výrazný izotopický efekt [67]. Pro každou stanovovanou sloučeninu jsou navíc zapotřebí dva izotopicky značené standardy, z nichž jeden slouží jako zástupný analyt a druhý jako odpovídající vnitřní standard. V případě multianalytových metod se z tohoto hlediska stává využití SILA ekonomicky nevýhodné.

Velice podobným přístupem jako je využití SILA je využití derivatizace analytu stabilním izotopem (DASI) [68, 69]. Metoda je založena na současné derivatizaci autentického standardu neznačeným a stabilním izotopem značeným chemickým činidlem. Tímto způsobem jsou vytvořeny deriváty, které nejsou přítomny v autentické biologické matrici. Neznačený derivát se používá jako zástupný analyt, zatímco značený slouží jako odpovídající vnitřní standard. Ve srovnání s použitím SILA je velkou výhodou této metody široká dostupnost značených derivatizačních činidel pro běžné funkční skupiny (hydroxyl, amin, karboxyl nebo karbonyl) a vyvíjená metoda tak není závislá na dostupnosti SILA. Na druhou stranu, ne všechny analyty musí obsahovat funkční skupiny vhodné k derivatizaci.

Samotný proces derivatizace je často časově náročný a v některých případech je prováděn za extrémních podmínek (vysoké teploty, pH), které mohou vést k rozkladu analytu či vzniku artefaktů. Více informací k tomuto tématu lze nalézt v práci Khamise et al. [68].

1.4. Metody stanovení žlučových kyselin

Objasnění metabolismu žlučových kyselin, ať za fyziologického nebo patologického stavu vyžaduje nasazení spolehlivých analytických technik. Díky pokrokům v instrumentaci je v dnešní době již možné stanovovat žlučové kyseliny v mnoha biologických matricích, jako je plazma, sérum, žluč, moč, tkáňové homogenáty nebo stolice [70-72]. Vzhledem k vyšší vypovídací hodnotě se upřednostňuje stanovení souboru jednotlivých žlučových kyselin, před stanovením pouze jejich sumy [61, 70, 71, 73]. K tomuto účelu se v dnešní době zdaleka nejčastěji využívá metoda kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) [30, 70, 73, 74].

1.4.1. Separační techniky v analýze žlučových kyselin

Mezi metody, se kterými se často setkáváme v oblasti analýzy žlučových kyselin, patří separační techniky spojené s vhodnou detekční koncovkou. Když se podíváme do historie, tak již v 50. letech 20. století byla k rozdělení jednotlivých nekonjugovaných žlučových kyselin poprvé aplikována metoda papírové chromatografie [75]. Dalším významným mezníkem bylo využití tenkovrstvé chromatografie, díky níž bylo možné separovat žlučové kyseliny podle tříd na nekonjugované, glycin-konjugované a taurin-konjugované, avšak separace jednotlivých žlučových kyselin nebyla stále možná. Analýza s využitím TLC nenalezla širšího uplatnění, zejména kvůli potížím při detekci žlučových kyselin po separaci [76, 77]. Své místo v separaci žlučových kyselin si našla i plynová chromatografie (GC). První zmínky o jejím využití v analýze žlučových kyselin lze dohledat v pracích z 60. a 70. let 20. století. [78-80]. V 70. a 80. letech 20. století se začíná uplatňovat při stanovení žlučových kyselin metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) [81-83]. V dnešní době se k jejich separaci s výhodou využívá široké dostupnosti kolon s reverzní fází, přičemž při separaci žlučových kyselin se prakticky výhradně využívá kolon s oktadecylovou stacionární fází [30, 32, 60, 64, 65, 84, 85].

Zde je třeba zmínit, že přes všechny pokroky v instrumentálních metodách a zejména v oblasti hmotnostní spektrometrie, patří samotné separační techniky v analýze žlučových kyselin ke zcela nepostradatelným. Tento problém souvisí s množstvím polohových a α/β izomerů, které mají stejný molekulový vzorec, a tedy i identickou monoizotopickou hmotu. V tomto případě jejich spolehlivá kvantifikace závisí čistě na dostatečném chromatografickém rozdělení, protože je nelze rozlišit pouze na základě hmotnostních spekter. V případě běžných lidských žlučových kyselin se jedná zejména o triplety kyselin ursodeoxycholové (UDCA) – chenodeoxycholové (CDCA) – deoxycholové (DCA), glykoursodeoxycholové (GUDCA) – glykochenodeoxycholové (GCDCA) – glykodeoxycholové (GDCA) a tauroursodeoxycholové (TUDCA) – taurochenodeoxycholové (TCDCA) – taurodeoxycholové (TDCA). Další problém související s předchozím bodem souvisí s tím, že některé z uvedených izomerů mají tendenci tvořit při separaci kritické páry, náročné na separaci. To se týká především párů CDCA – DCA, GCDCA – GDCA a TCDCA – TDCA.

Výše uvedené problémy jsou dány rozmanitostí žlučových kyselin a s tím související širokou škálou některých fyzikálně-chemických vlastností, kde z hlediska separace jsou asi nejdůležitější rozdíly v polaritě dosahující mnoha řádů. Hodnoty logP se mohou pohybovat od 0,13 pro kyselinu taurocholovou až po 4,7 pro kyselinu lithocholovou. Rozdělovací koeficient oktanol-voda tedy pokrývá rozsah pěti řádů.

1.4.2. Detekční koncovky v analýze žlučových kyselin

Pokud jde o detekci žlučových kyselin při využití kapalinové chromatografie jako separační metody, pak v počátcích zájmu o tuto skupinu látek se nejčastěji využívalo UV/VIS detekce [86, 87]. Tato metoda však nebyla příliš citlivá a problematická byla i její selektivita. Z hlediska citlivosti ani selektivity nebyla tedy příliš vhodná pro analýzu sérových hladin žlučových kyselin [73, 88, 89]. Nekonjugované žlučové kyseliny však nebylo možné touto metodou efektivně detekovat vzhledem k absenci amidové vazby. Jako vhodná alternativa se nabízela detekce pomocí rozptylu světla [90] nebo UV/VIS detekce po derivatizaci žlučových kyselin fenylacylovou skupinou, která sloužila jako chromofor [90, 91]. Nicméně při použití výše uvedených postupů jsme poměrně limitováni selektivitou metod. V dnešní době však řešení problému se špatnou selektivitou uvedených detekčních technik přináší hmotnostní spektrometrie.

V současné době je nejčastější detekční koncovkou při stanovení žlučových kyselin hmotnostní spektrometrie (MS) s využitím negativní ionizace v elektrospreji při použití detektoru typu trojitý kvadrupól, nebo spektrometru s vysokým rozlišením [30, 32, 72, 85]. Při využití trojitého kvadrupólu jsou pak analyty sledovány s využitím MRM (multiple reaction monitoring) módu [61, 92].

Výběr dceřiných iontů v případě použití MRM se odvíjí od třídy sledovaných žlučových kyselin (nekonjugované, glycin-konjugované, taurin-konjugované). Žlučové kyseliny konjugované s glycinem poskytují pouze jeden specifický a dostatečně intenzivní dceřiný ion na hmotě m/z 74 [32, 64]. Taurin-konjugované žlučové kyseliny poskytují tři specifické a dostatečně intenzivní ionty na m/z 80, 107 a 124 [32, 64]. U nekonjugovaných žlučových kyselin dochází v případě pokusu o fragmentaci molekuly k tvorbě velkého množství málo intenzivních a většinou nespecifických fragmentů, které nelze použít k citlivé a spolehlivé kvantifikaci [93]. Z tohoto důvodu se přistupuje k využití tzv. pseudo-MRM módu, o kterém je detailněji pojednáno v kapitole 3.3.2.

1.4.3. Enzymatické metody v analýze žlučových kyselin

Pro úplnost je třeba zmínit ještě specifickou kategorii metod pro stanovení žlučových kyselin, kterými jsou enzymatické testy a techniky na principu vazebné kompetice. Hlavním pokrokem v tomto odvětví byl vývoj metody pro stanovení 3α -hydroxyžlučových kyselin využívající oxidace hydroxylové skupiny v poloze 3 pomocí 3α -hydroxysteroiddehydrogenázy spřaženou s NAD-oxidoreduktázovou reakcí [94]. Metoda je vhodná zejména pro sledování celkových koncentrací žlučových kyselin. Pravděpodobně největším limitem využití těchto metod je spojeno hlavně s jejich nízkou specifitou, kde o této problematice pojednává například práce Griffithse a Sjövala [73].

2. Cíle práce

Tato práce si klade za cíl demonstrovat inovativní přístup k validaci LC-MS metod určených k analýze endogenních sloučenin, který kombinuje použití náhradní a autentické matrice pro přípravu referenčních vzorků společně s použitím autentického analytu. Stěžejní přínos tohoto přístupu je použití nepozměněné autentické biologické matrice pro přípravu QC vzorků během validační studie. Předkládaný postup se pokouší řešit inherentní výskyt stanovovaného analytu v biologické matrici, který bývá zpravidla hlavní komplikací při analýze endogenních látek. Vzhledem k tomu, že velká část výzkumu pracovní skupiny, jejímž jsem členem, se zabývá jaterními onemocněními a metabolomikou žlučových kyselin, byly tyto látky logicky využity jako modelové sloučeniny pro demonstraci popsaného přístupu k validaci.

Vzhledem k tomu, že žlučové kyseliny jsou důležitými markery některých jaterních onemocnění, bylo jedním z dalších cílů aplikovat validovanou metodu v metabolomické studii zaměřené na intrahepatální cholestázu těhotných (ICP). Posledním cílem byla aplikace metody při výzkumu zastoupení a koncentrace žlučových kyselin u *in vivo* modelů s indukovanou cholestázou s cílem poskytnout data, která společně s výstupy z molekulárně-biologických metod mohou pomoci objasnit mechanismus dané patologie.

3. Metodická část

3.1. Úvod

V metodické části bude vysvětlen princip nově vyvinutého postupu pro validaci při stanovení endogenních látek na příkladu žlučových kyselin a metoda bude srovnána s dalšími postupy, které se v dané oblasti využívají. Předkládaný postup zahrnuje tři základní body.

V první fázi se ověřuje paralelita kalibrací připravených v autentické nemodifikované matrici a vybraných zástupných matricích vhodných pro přípravu referenčních vzorků. Pokud směrnice kalibrace pro testovanou náhradní matrici spadá do předem stanoveného rozsahu, odvozeného od směrnice kalibrace v autentické matrici, pak se tato náhradní matrice bere jako vhodná pro přípravu kalibračních vzorků během validační studie. V případě popisovaného validačního protokolu je jako limit odchylky směrnice zvolena hodnota $\pm 15\%$. Při výběru z více vhodných zástupných matric je důraz kladen na volbu zástupné matrice s co nejjednodušší přípravou a dlouhodobou reprodukovatelností přípravy.

Po tomto kroku následuje analýza bazálních koncentrací analytu ve směsné autentické matrici určené pro přípravu QC vzorků, která se provádí proti kalibraci připravené ve zvolené náhradní matrici. Na základě zjištěných bazálních koncentrací se ke směsné autentické matrici přidává vypočtené množství zásobního roztoku analytu v takovém objemu, aby bylo docíleno jeho předem definované koncentrace. Výsledná koncentrace je tedy dána příspěvkem bazální koncentrace analytu v autentické matrici a koncentrace v přidávaném zásobním roztoku. Tímto způsobem je možné připravit část validačních QC vzorků v nativním, nijak nemodifikovaném biologickém materiálu a přiblížit se tak požadavkům obecně uznávaných validačních směrnic.

Podobně jako u jiných metod určených pro analýzu endogenních látek má i tento postup své limity. To platí zejména v případě, kdy je bazální koncentrace v autentické matrici vyšší než koncentrace nejnižší koncentrační úrovně QC vzorků dané validačním předpisem. V tomto případě se volí kompromisní koncentrace, která je vyšší než doporučená hodnota. Stejný problém je třeba řešit i v případě stanovení spodního limitu kvantifikace (LLOQ). Aby bylo možné pokrýt i tyto nízké koncentrační hladiny, připravuje se druhá sada QC vzorků, tentokrát však v zástupné matrici, která byla použita pro přípravu kalibrátorů.

Validace se tedy provádí se dvěma nezávislými sadami QC vzorků, jednou připravenou v autentické nemodifikované matrici a druhou v zástupné matrici. Tento postup však má dvě prerekvizity, musí být dosaženo paralelity směrnic kalibračních závislostí v autentické a zástupné matrici a vyvinutá LC-MS metoda musí být prosta matričních efektů, které by ovlivnily odezvu analytů.

3.2. Materiál a reagentie

Methanol, acetonitril a kyselina mravenčí (čistota pro LC-MS) byly zakoupeny od AvantorScience (Praha, Česká republika). Kyselina octová a octan amonný (čistota pro LC-MS) byly zakoupeny od společnosti Merck (Praha, Česká republika). Aktivní uhlí bylo zakoupeno od Lach-ner (Neratovice, Česká republika). Kyselina cholová (CA), kyselina ursodeoxycholová (UDCA), kyselina lithocholová (LCA), kyselina chenodeoxycholová (CDCA), kyselina deoxycholová (DCA), glykochenodeoxycholát sodný (GCDCA), glykodeoxycholát sodný (GDCA), glykocholát sodný (GCA), tauroursodeoxycholát sodný (TUDCA), taurodeoxycholát sodný (TDCA) a hydrát taurocholátu sodného (TCA) byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Praha, Česká republika). Glykoursodeoxycholát sodný (GUDCA) a taurochenodeoxycholát sodný (TCDCA) byly zakoupeny od Steraloids (Newport, R.I., USA). Glykolitocholát sodný (GLCA) a taurolitocholát sodný (TLCA) byly získány od TRC Canada (Toronto, ON, Kanada). Kyselina cholová-D5 (CA-D5), kyselina ursodeoxycholová-D5 (UDCA-D4), kyselina chenodeoxycholová-D4 (CDCA-D4), kyselina deoxycholová-D4 (DCA-D4), kyselina glykocholová-D4 (GCA-D4), kyselina glykochenodeoxycholová-D4 (GCDCA-D4), kyselina glykodeoxycholová-D4 (GDCA-D4), kyselina tauroursodeoxycholová-D4 (TUDCA-D4), kyselina glykoursodeoxycholová-D4 (GUDCA-D4), kyselina glykolitocholová-D4 (GLCA-D4), kyselina taurocholová-D4 (TCA-D4), kyselina taurochenodeoxycholová-D4 (TCDCA-D4), kyselina taurodeoxycholová-D4 (TDCA-D4) a kyselina taurolitocholová-D4 (TLCA-D4) byly zakoupeny od IsoScience (Ambler, PA, USA). Vzorky hovězího sérového albuminu byly zakoupeny od PAA (kat. č.: K21-02, šarže: G16113-155), Sevac (lot.: 103260988), Sigma-Aldrich (kat. číslo: A9418-10G, šarže: 057K1201), Sigma-Aldrich (kat. č.: A3912-100G, šarže: 31K1264) a Sigma-Aldrich (kat. číslo: A3912-100G, šarže: SLCJ1981). Lidskou plazmu použitou k vývoji a validaci metody laskavě věnovalo Transfúzní centrum Fakultní nemocnice Hradec Králové. Během celé studie byla použita Milli-Q voda.

3.3. Instrumentace

3.3.1. Chromatografie

Separace byla provedena na chromatografu ACQUITY UPLC I-Class System (Waters, Milford, MA, USA) s použitím kolony Triart C18 (50 mm × 2,1 mm, 1,9 μm) (YMC, Japonsko) s předřazeným in-line filtrem CrudCatcher (Phenomenex, Torrance, CA, USA) a probíhala při teplotě 45 °C. Rychlost průtoku mobilní fáze byla 0,35 ml/min. Mobilní fáze se skládala z Rozpouštědla A (0,5 mM octanu amonného, 0,001% (v/v) kyseliny octové ve vodě) a Rozpouštědla B (0,5 mM octanu amonného, 0,001% (v/v) kyseliny octové v 3:1 (v/v) methanol:acetonitril). Pro separaci byl využit následující gradientový program: Počáteční složení 40 % Rozpouštědla B bylo udržováno po dobu 0,2 minuty, následované lineárním zvýšením na 79 % (0,2 - 9,0 minut). Po tomto kroku následovalo izokratické promytí 95% Rozpouštědlem B (9,0 - 10,5 min) a ekvibrace 40 % Rozpouštědlem B (10,5 - 12 min).

Chromatografická metoda pro kvalitativní vyhodnocení přítomnosti fosfatidylcholinů a sfingomyelinů v autentické a stripované plazmě využívala identickou kolonu, stejný průtok mobilní fáze a teplotu kolonového termostatu jako při separaci žlučových kyselin. Mobilní fáze byla složena z Rozpouštědla C (voda) a Rozpouštědla D (acetonitril). Gradientový program byl následující: v čase 0–15 min byl lineární nárůst z 50 do 100 % Rozpouštědla D, následovaný re-ekvilibrací 50% Rozpouštědlem D po dobu 2 min.

3.3.2. Hmotnostní spektrometrie

Jako detekční koncovka pro separační metodu byl využit hmotnostní spektrometr Xevo TQ-XS (Waters, Milford, MA, USA). K ionizaci analytů byl využit elektrosprej provozovaný v negativním módu. Nastavení spektrometru bylo následující: napětí na kapiláře (capillary voltage) 2,5 kV, napětí na kónu (cone voltage) 50 V, desolvatační teplota (desolvation temperature) 600 °C, průtok desolvatačního plynu (desolvation gas flow) 1000 L/h a průtok plynu kónem (cone gas flow) 150 L/h. Pro monitoring konjugovaných žlučových kyselin bylo využito měření specifických MRM přechodů po fragmentaci molekuly, přičemž pro nekonjugované žlučové kyseliny bylo nutné využít tzv. pseudo-MRM. V tomto módu byl první a třetí kvadrupól hmotnostního spektrometru nastaven na stejnou hmotu odpovídající rodičovskému iontu a druhý kvadrupól tak, aby rodičovský ion prošel bez fragmentace.

Vychází se ze skutečnosti, že u nekonjugovaných žlučových kyselin dochází k extenzivní fragmentaci stabilního steranového skeletu na mnoho málo intenzivních a většinou nespecifických fragmentů nevhodných ke kvantifikaci [95]. Použité MRM přechody společně s kolizními energiemi jsou uvedeny v Tabulce 1.

Skupinově specifická detekce fosfatidylcholinů a sfingomyelinů v autentické a stripované lidské plazmě byla provedena při následujícím nastavení hmotnostního spektrometru: napětí na kapiláře (capillary voltage) 3,0 kV, napětí na kónu (cone voltage) 50 V, desolvační teplota (desolvation temperature) 450 °C, průtok desolvačního plynu (desolvation gas flow) 1000 L/h a průtok plynu kónem (cone gas flow) 150 L/h. K detekci fosfatidylcholinů a sfingomyelinů bylo využito skenování prekurzorových iontů na m/z 184 v pozitivním módu za použití elektrosprejové ionizace.

Tabulka 1. Retenční časy (RT), přechody (MRM), kolizní energie (CE), vnitřní standardy (IS) pro 15 žlučových kyselin zahrnutých v kvantifikační metodě.

Žlučová kyselina	Zkratka	RT min	MRM	CE eV	IS	MRM	CE eV
Ursodeoxycholová kyselina	UDCA	5.78	391 → 391	10	UDCA-D4	391 → 391	10
Cholová kyselina	CA	6.30	407 → 407	10	CA-D5	407 → 407	10
Chenodeoxycholová kyselina	CDCA	7.76	391 → 391	10	CDCA-D4	391 → 391	10
Deoxycholová kyselina	DCA	7.93	391 → 391	10	DCA-D4	391 → 391	10
Litocholová kyselina	LCA	9.26	375 → 375	10	DCA-D4	391 → 391	10
Glykoursodeoxycholová kys.	GUDCA	3.62	448 → 74	30	GUDCA-D4	448 → 74	30
Glykocholová kyselina	GCA	4.36	464 → 74	30	GCA-D4	464 → 74	30
Glykochenodeoxycholová kys.	GCDCA	5.66	448 → 74	30	GCDCA-D4	448 → 74	30
Glykodeoxycholová kyselina	GDCA	5.95	448 → 74	30	GDCA-D4	448 → 74	30
Glykolitocholová kyselina	GLCA	7.12	432 → 74	30	GLCA-D4	432 → 74	30
Tauroursodeoxycholová kys.	TUDCA	3.58	498 → 80	60	TUDCA-D4	498 → 80	60
Taurocholová kyselina	TCA	4.30	514 → 80	60	TCA-D4	514 → 80	60
Taurochenodeoxycholová kys.	TCDC	5.57	498 → 80	60	TCDC-D4	498 → 80	60
Taurodeoxycholová kyselina	TDCA	5.58	498 → 80	60	TDCA-D4	498 → 80	60
Taurolitocholová kyselina	TLCA	7.00	482 → 80	60	TLCA-D4	482 → 80	60

3.4. Standardy a roztoky

Zásobní roztoky 15 žlučových kyselin, každý o koncentraci 10 mM, byly jednotlivě připraveny rozpuštěním autentických standardů v methanolu. Pomocný roztok obsahující všechny žlučové kyseliny o koncentraci 200 μM byl připraven ze zásobních roztoků zředěním v čistém methanolu (100 %, v/v). Zásobní roztoky 14 deuterovaných vnitřních standardů (IS) o koncentraci 5 mM byly připraveny rozpuštěním jednotlivých autentických standardů v čistém methanolu. Z těchto zásobních roztoků IS byly připraveny dva pomocné roztoky, roztok A o koncentraci 50 μM (UDCA-D4, CA-D5, GLCA-D4, GUDCA-D4, TUDCA-D4, TLCA-D4 a CDCA-D4) a roztok B o koncentraci 200 μM (DCA-D4, GCA-D4, GCDCA-D4, GDCA-D4, TCA-D4, TCDCA-D4 a TDCA-D4). Oba pomocné roztoky byly připraveny v čistém methanolu. Roztoky A a B byly dále použity pro přípravu deproteinačního činidla dle následujícího postupu: K 95 mL acetonitrilu bylo přidáno 1 mL kyseliny mravenčí a následně 33,4 μL roztoku A a 33,3 μL roztoku B. Objem byl poté doplněn do 100 mL roztokem acetonitrilu s obsahem 1 % (v/v) kyseliny mravenčí.

Kalibrátory byly připraveny přidáním pomocného roztoku žlučových kyselin do testovaných matric tak, abychom získali sedm kalibračních bodů – 5, 10, 50, 100, 500, 1000 a 2000 nM. Matrice zahrnovaly autentickou plazmu, stripovanou plazmu, umělou plazmu a 50% (v/v) methanol.

Vzorky kontroly kvality byly připraveny následovně: QC-Set-A zahrnoval vzorky o koncentracích 5 nM (LLOQ), 15 nM (QCA1), 500 nM (QCA2) a 1500 nM (QCA3) připravené v 50 % (v/v) methanolu, který sloužil jako zástupná matrice. Paralelně byl připraven QC-Set-B v nemodifikované autentické matrici (směsné lidské plazmě) o koncentracích 50 nM (QCB1), 500 nM (QCB2) a 1500 nM (QCB3). Přípravě vzorků z QC-Set-B předcházelo stanovení koncentrací žlučových kyselin ve směsné autentické plazmě, následované výpočtem potřebného objemu pomocného roztoku žlučových kyselin, který byl potřeba pro získání přesné koncentrace individuálních žlučových kyselin v autentické plazmě. Výpočet byl proveden dle následující rovnice:

$$V_{AUX} = \frac{(c_{PLZ} - c_{FIN}) \times V_{PLZ}}{c_{FIN} - c_{AUX}} \quad \text{Rovnice 1}$$

kde c_{PLZ} je koncentrace konkrétní žlučové kyseliny v autentické plazmě, V_{PLZ} je objem autentické plazmy, c_{AUX} je koncentrace konkrétní žlučové kyseliny v pomocném zásobním roztoku, V_{AUX} je objem pomocného zásobního roztoku, který musí být přidán do autentické plazmy, abychom získali koncentraci c_{FIN} konkrétní žlučové kyseliny v QC vzorku (50, 500 nebo 1500 nM).

3.5. Zástupné matrice

Při výběru vhodné zástupné matrice pro přípravu kalibrátorů bylo potřeba dodržet dvě základní podmínky. První podmínkou byla nepřítomnost interferencí v retenčních časech sledovaných žlučových kyselin, druhou podmínkou byla směrnice kalibrační křivky připravené v zástupné matrici v rozmezí $\pm 15\%$ při srovnání s kalibrační křivkou připravenou v autentické, nemodifikované biologické matrici.

3.5.1. Příprava stripované plazmy

Stripovaná plazma byla připravena následovně: 15 mL směsné lidské plazmy bylo smícháno s 1,5 g aktivního uhlí v 50 mL polypropylenové zkumavce (Fisher Scientific, Pardubice, Česká republika) a třepáno po dobu 24 hodin (Heidolph Reax 2, Speed 3). Aktivní uhlí bylo z plazmy odstraněno pomocí tříkrokové centrifugace. První krok zahrnoval předcentrifugaci prováděnou při $5400 \times g$ a $20\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 10 minut (Hettich, Rotina 420R) v původní zkumavce se vzorkem. Ve druhém kroku byla odstředěná plazma z předchozího kroku rozdělena do 1,5 mL polypropylenových zkumavek a následně centrifugována při $13\ 000 \times g$ (10 min, $20\text{ }^\circ\text{C}$, Eppendorf 5424R). Poslední krok zahrnoval centrifugaci při $39\ 000 \times g$ v ultracentrifuze (20 min, $20\text{ }^\circ\text{C}$, Hermle Z36HK,). Výsledný objem získané plazmy byl 9 mL, což odpovídá výtěžnosti procesu 60 %.

3.5.2. Příprava umělé plazmy

Umělá plazma byla připravena podle upraveného protokolu Oyane et al. [96]. Ve skleněné kádince bylo zahřáto 600 mL vody Milli-Q na 37 °C. Jednotlivé složky umělé plazmy byly nejprve separátně rozpuštěny v malém množství vody a následně nality do kádinky v pořadí dle Tabulky 2. Nakonec bylo pH roztoku upraveno na hodnotu 7,32 (při 36,5 °C) hydroxidem sodným ($c = 1,0 \text{ mol/l}$) a celkový objem doplněn vodou Milli-Q na 1000 mL.

Tabulka 2. Složky umělé plazmy. Hmotnosti jsou uvedeny na 1 L roztoku.

Anorganické složky	Hmotnost	Čistota	Dodavatel
NaCl	5.403 g	Analytická čistota	PENTA (Chrudim, ČR)
NaHCO ₃	0.740 g	Analytická čistota	Lach-Ner (Neratovice, ČR)
Na ₂ CO ₃	2.046 g	Analytická čistota	Lach-Ner (Neratovice, ČR)
KCl	0.225 g	Analytická čistota	PENTA (Chrudim, ČR)
K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0.230 g	Analytická čistota	Merck (Praha, ČR)
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.311 g	Analytická čistota	Lach-Ner (Neratovice, ČR)
HEPES	11.93 g	Analytická čistota	Signa-Aldrich (Praha, ČR)
CaCl ₂	0.293 g	Analytická čistota	Lach-Ner (Neratovice, ČR)
Na ₂ SO ₄	0.072 g	Analytická čistota	Lach-Ner (Neratovice, ČR)
1M NaOH	0.80 mL	Analytická čistota	Merck (Praha, ČR)
Organické složky	Hmotnost	Čistota	Dodavatel
Bovinní sérový albumin	40.0 g	Analytická čistota	Viz sekce 2.1
Glukóza	1.0 g	Analytická čistota	Lach-Ner (Neratovice, ČR)
Močovina	0.366 g	Analytická čistota	PENTA (Chrudim, ČR)
Kyselina mléčná	0.085 g	Analytická čistota	Signa-Aldrich (Praha, ČR)
Glycerol	0.0111 g	Analytická čistota	Fluka (Praha, ČR)

Biochemická stanovení

Ve směsné autentické plazmě a stripované plazmě byl stanoven základní panel biochemických parametrů pomocí analyzátoru COBAS 8000 (ROCHE, Švýcarsko, Basilej) na Ústavu klinické biochemie a diagnostiky Fakultní nemocnice Hradec Králové.

Kvalitativní hodnocení přítomnosti fosfolipidů

Autentická plazma a stripovaná plazma byla také kvalitativně hodnocena pomocí LC-MS na přítomnost fosfolipidů z třídy fosfatidylcholinů a sfingomyelinů prostřednictvím skupinově specifického prekurzorového iontu ($m/z 184$), který byl pozorován v pozitivním módu ionizace. Jak biochemická stanovení, tak hodnocení přítomnosti fosfolipidů bylo prováděno z důvodu ověření vlivu stripování plazmy na její kvalitativní a kvantitativní složení.

3.6. Příprava vzorků

Prvním krokem přípravy vzorku byla precipitace proteinů společně s přidáním izotopicky značených vnitřních standardů. Ke 100 μL plazmy v Eppendorf zkumavce bylo přidáno 300 μL deproteinačního činidla připraveného z acetonitrilu, obsahujícího 0,1 % (v/v) kyseliny mravenčí a 14 deuterovaných žlučových kyselin použitých jako vnitřní standardy. Výsledná koncentrace vnitřních standardů po přidání ke vzorkům byla 16,7 nM (UDCA-D4, CA-D5, GLCA-D4, GUDCA-D4, TUDCA-D4, TLCA-D4, CDCA-D4) a 66,7 nM (DCA-D4, GCA-D4, GCDCA-D4, GDCA-D4, TCA-D4, TCDCA-D4, TDCA-D4). Následně byly vzorky vortexovány po dobu 60 sekund při 1500 RPM (IKA Vibrax) a ponechány po dobu 10 minut při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Vysrážené proteiny byly odstraněny centrifugací (13000 x g, 5 min, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$; Eppendorf 5424R). Získaný supernatant o objemu 350 μL byl přenesen do čisté Eppendorf zkumavky a odpařen do sucha za sníženého tlaku při teplotě $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Eppendorf Concentrator 5301). Po odpaření byly vzorky rekonstituovány ve 100 μL 50 % acetonitrilu, vortexovány, odstředěny (13 000 x g, 1 min, $20\text{ }^{\circ}\text{C}$) a poté přeneseny na 96-jamkovou filtrační destičku (AcroPrep™ Advance, wwPTFE) a přefiltrovány do polypropylenové 96-jamkové destičky (Waters, Milford, MA, USA). Takto připravené vzorky byly vloženy do autosampleru. Na kolonu bylo nastříknuto 2 μL vzorku.

3.7. Validace metody

V rámci validace metody byly hodnoceny následující parametry: selektivita, matriční efekty, výtěžnost, linearita, spodní mez kvantifikace, přesnost, správnost, integrita ředění a stabilita vzorku. Validací studie se řídila pokyny pro validaci bioanalytických metod vydanými Evropskou lékovou agenturou (EMA) [1]. Vzhledem k přirozené přítomnosti analyzovaných žlučových kyselin v autentické plazmě se však nebylo v některých případech možné striktně držet předepsaných koncentračních hladin pro QC vzorky na nejnižších úrovních (QC-Set-B). Z toho důvodu byl mimo QC-Set-B použit také druhý set vzorků (QC-Set-A), připravených v zástupné matrici (50 % v/v methanol). V tomto případě byly důsledně pokryty všechny koncentrační úrovně doporučené validačním předpisem (viz. kapitola 3.1.3). Pokud nebude dále uvedeno jinak, kalibrátory byly připravovány v 50 % (v/v) methanolu jako zástupné matrici.

3.7.1. Selektivita

Selektivita byla hodnocena pouze u zástupných matric z důvodu přítomnosti žlučových kyselin ve vzorcích neupravené plazmy a nemožností získat autentickou plazmu bez přítomnosti analytu. V autentických vzorcích plazmy tak byla selektivita ověřována pouze pro deuterované vnitřní standardy. Testování bylo provedeno porovnáním chromatogramů proměřovaných matric s chromatogramy čistých roztoků žlučových kyselin nebo jejich deuterovaných analogů.

3.7.2. Matriční efekty

Kvalitativní ověření přítomnosti matričních efektů bylo provedeno na 18 autentických vzorcích lidské plazmy, získaných z kohorty těhotných žen zahrnutých do studie. Hodnocení bylo provedeno metodou post-kolonové infúze [97], se zahrnutím 14 dostupných standardů deuterovaných žlučových kyselin (CA-D5, UDCA-D4, CDCA-D4, DCA-D4, GCA-D4, GCDCA-D4, GDCA-D4, TUDCA-D4, GUDCA-D4, GLCA-D4, TCA-D4, TCDCA-D4, TDCA-D4 a TLCA-D4). Vzorky plazmy těhotných žen byly zpracovány metodou popsanou v části 3.6., s tím rozdílem, že přidávané deproteinační činidlo bylo bez obsahu deuterovaných standardů. Takto připravené vzorky byly nastříknuty do LC-MS systému při současné post-kolonové infúzi (5 $\mu\text{L}/\text{min}$) čistého roztoku deuterovaných analogů s koncentrací 50 nM v 50% (v/v) methanolu. Během experimentu byly sledovány MRM přechody jednotlivých deuterovaných žlučových kyselin a hodnocena přítomnost matričních efektů. V případě LCA, kde nebyl dostupný analog značený deuteriem, byla jako náhrada použita DCA-D4.

Kvantitativní hodnocení matričních efektů bylo provedeno podle validační směrnice EMA s využitím stejných deuterovaných analogů jako u kvalitativního hodnocení. Ty byly připraveny v lidské plazmě s koncentrací 15 nM ($n = 10$) a 1500 nM ($n = 10$). Matriční efekty byly vypočteny následovně:

$$ME(\%) = \frac{A_{post}}{A_{clean}} * 100 \quad \text{Rovnice 2}$$

A_{post} je plocha píku značených standardů přidaných do plazmy po extrakci a A_{clean} je plocha píku značených standardů v čistém roztoku.

3.7.3. Výtěžnost metody

Výtěžnost při přípravě vzorků byla hodnocena se stejnými deuterovanými standardy, jaké byly použity při stanovení matričních efektů. Stanovení bylo provedeno u koncentrací 15, 500 a 1500 nM při pěti opakováních na každé koncentrační úrovni. Výtěžek byl vypočten podle rovnice 3:

$$R(\%) = \frac{A_{pre}}{A_{post}} * 100 \quad \text{Rovnice 3}$$

A_{pre} je plocha píku značených standardů přidaných do plazmy před extrakcí a A_{post} je plocha píku značených standardů v čistém roztoku přidaných do plazmy po extrakci.

3.7.4. Kalibrační model

Sedmibodová kalibrační křivka byla sestrojena s využitím regresní metody nejmenších čtverců aplikované na poměr ploch píku analytů k vnitřním standardům vneseným proti koncentracím v rozmezí 5–2000 nM. V rámci testování vhodného modelu byly ověřovány kalibrační křivky s lineárním a kvadratickým proložením a s vážením $1/x$ nebo $1/x^2$. Volba výsledného modelu byla provedena na základě metodiky popsané v práci Singtoroj et al. [98]. K vyhodnocení vhodnosti kalibračního modelu, váhy ani linearity nebylo použito samotného koeficientu determinace (R^2), protože tento parametr neposkytuje spolehlivou informaci o vhodnosti zvolených parametrů [98]. Ve výše uvedené metodě se provádějí dva základní testy. Test Proložení kalibrační křivky (*Calibration curve fit – CCF*) a test Předvídatelnost kalibrační křivky (*Calibration curve predictability – CCP*).

Při hodnocení *CCF* jsou z kalibračních dat získány hodnoty relativních reziduálních odchylek, prostřednictvím nichž se hodnotí vhodnost zvoleného kalibračního modelu. Absolutní hodnota relativních reziduálních odchylek (*RR %*) pro konkrétní kalibrační úroveň se počítá jako:

$$RR(\%) = \left| \left(\frac{c_b - c_n}{c_n} \right) * 100 \right| \quad \text{Rovnice 4}$$

kde c_n je jmenovitá koncentrace a c_b je koncentrace zpětně vypočtená z kalibrační křivky na dané kalibrační úrovni.

Na základě hodnoty RR % je poté pro danou koncentrační úroveň přiřazen koeficient (rank) v rozsahu 1 až 4 (maximální rozsah koeficientů je dán počtem všech testovaných kombinací modelů proložení a jejich vah). Koeficient byl přiřazen tak, že čím nižší byla získaná hodnota RR % pro konkrétní kalibrační model, použitou váhu a koncentrační úroveň, tím nižší koeficient byl přiřazen. Výsledný koeficient (celkový rank) pro daný kalibrační model a danou váhu byl získán jako součet koeficientů pro jednotlivé koncentrační úrovně daného modelu a váhy. Podobně byla hodnocena CCP. V tomto případě se koeficient přiřazoval dle hodnoty relativní chyby (RE %) získané pro čtyři nezávislé úrovně QC vzorků. Čím nižší byla hodnota RE %, tím nižší byl přiřazen koeficient. Výsledný kalibrační model jako kombinace regresní křivky a zvolené váhy byl zjištěn na základě součtu koeficientů pro CCF a CCP.

Jako optimální byla nakonec zvolena kombinace kalibračního modelu a váhy s nejnižším získaným celkovým koeficientem. Detaily k použité metodice lze nalézt v práci Singtoroj et al. [98].

3.7.5. Dolní mez kvantifikace

Dolní mez kvantifikace (LLOQ) byla hodnocena v rámci opakované analýzy QC vzorků (n=5) s využitím QC-Set-A na koncentrační úrovni 5 nM. Jako mez přijatelnosti byl stanoven variační koeficient <20 % (přesnost) a relativní chyba v rozsahu ± 20 % (správnost).

3.7.6. Přesnost a správnost

Přesnost a správnost metody byla hodnocena pomocí vzorků QC-Set-A na koncentračních hladinách 15 nM, 500 nM a 1500 nM a vzorků QC-Set-B na koncentračních hladinách 50 nM, 500 nM a 1500 nM. QC vzorky byly opakovaně analyzovány ve třech různých dnech a každá koncentrační hladina byla měřena v pěti opakováních. Správnost byla vyjádřena jako relativní chyba (RE %) analýzy v rámci dne a mezi dny. Přesnost v rámci jednoho dne a mezi dny byla vyjádřena jako variační koeficient (CV %) a byla vypočtena pomocí analýzy rozptylu (ANOVA) takto:

V rámci dne: $CV(\%) = \frac{\sqrt{MS_{wd}}}{\bar{X}} * 100$ *Rovnice 5*

Mezidenní: $CV(\%) = \frac{\sqrt{\frac{MS_{bd} + MS_{wd}}{n}}}{\bar{X}} * 100$ *Rovnice 6*

kde MS_{wd} a MS_{bd} jsou rozptyly v rámci stanovení v jednom dni a mezidenně, získané z ANOVA pomocí softwaru GraphPad PRISM (verze 6.07), \bar{X} je průměr všech koncentrací naměřených na konkrétní úrovni a n představuje počet replikovaných měření ($n=5$) během jednotlivých dnů. Kritéria byla považována za splněná, pokud byl variační koeficient <15 % (přesnost) a relativní chyba v rozsahu ± 15 % (správnost).

3.7.7. Integrita ředění

Integrita ředění byla testována se sadou QC vzorků ($n = 5$) připravených ve směsné lidské plazmě na koncentrační hladině 20 μM . Testované vzorky byly před analýzou ředěny 40 x Milli-Q vodou. Validační kritéria byla splněna v případě, kdy byl variační koeficient <15 % (přesnost) a relativní chyba v rozsahu ± 15 % (správnost).

3.7.8. Stabilita

Stabilita vzorku byla testována dle pokynů EMA při čtyřech různých podmínkách. K testování byly použity vzorky QC-Set-A o koncentracích 15 nM a 1500 nM a QC-Set-B o koncentracích 50 nM, 500 nM a 1500 nM. Každá z výše uvedených koncentračních hladin byla měřena v pěti opakováních. Krátkodobá stabilita byla testována s QC vzorky ponechanými 2 hodiny při 23 °C na laboratorním stole. Stabilita v autosampleru byla hodnocena pomocí QC vzorků ponechaných v autosampleru po dobu 12 hodin při 10 °C. Stabilita zmrazování/rozmrazování byla testována ve třech cyklech zmrazení (-80 °C) a rozmrazení (23 °C) po dobu tří po sobě následujících dnech. Výsledky testování stability byly považovány za přijatelné, pokud variační koeficient naměřených koncentrací byl <15 % (přesnost) a relativní chyba byla v rozsahu ± 15 % (správnost).

4. Výsledky a diskuze

4.1. Nový přístup k validaci LC-MS metod pro stanovení endogenních sloučenin – aplikace při stanovení žlučových kyselin

Validace je nezbytnou součástí vývoje každé nové analytické metody. V oblasti bioanalýzy se nejčastěji používají validační kritéria vycházející z doporučení Evropské lékové agentury (European medicines agency - EMA) [1], nebo amerického Úřadu pro kontrolu potravin a léčiv (Food and drug administration - FDA) [53]. Zatímco validace metod pro stanovení exogenních látek v biologickém materiálu patří v současnosti mezi metodicky zvládnuté úkony, v oblasti endogenních látek doposud není k dispozici validační protokol, který by byl ekvivalentní doporučením EMA nebo FDA. Je to dáno zejména tím, že v případě endogenních látek není k dispozici tzv. blanková matrice, která se používá k přípravě referenčních vzorků nebo pro ověření selektivity metody. To činí vývoj a validaci metody problematickou. V literatuře je popsáno několik přístupů, jak k této problematice přistoupit, nicméně většina z nich skýtá jistá úskalí. Metodika popisovaná v této disertační práci nabízí další z možností, jak k validaci těchto látek přistoupit a přiblížit se požadavkům obecně uznávaných validačních směrnic. Vyvinutá metodika byla testovaná na panelu 15 lidských žlučových kyselin stanovovaných pomocí LC-MS/MS.

Inovativnost postupu a jeho hlavní výhoda spočívá v použití autentické biologické matrice společně s autentickým analytem při přípravě vzorků kontroly kvality. To umožňuje provést většinu validačních testů dle pokynů validační směrnice EMA. V rámci studie jsme také demonstrovali výhody použití 50% (v/v) methanolu jako náhradní matrice pro přípravu kalibrátorů a na základě objektivních dat ukázali, že jeho použití je ekvivalentní použití stripované plazmy, běžně využívané při analýze žlučových kyselin. Metodika také řeší problém nízké výtěžnosti matrice při stripování aktivním uhlím (viz Oddíl 1.3.). Díky tomu, že prezentovaným postupem se lze stripování vyhnout, je metoda potenciálně vhodná i pro validační studie, kde pracujeme s těžko dostupnými maticemi. Je však třeba poznamenat, že i zde prezentovaný přístup má dva základní předpoklady, které mohou limitovat jeho využitelnost. Prvním je paralelnost směrnic kalibračních křivek pro zástupnou a autentickou matici, druhým pak absence matričních efektů v autentickém biologickém materiálu, které by ovlivňovaly odezvu analytů.

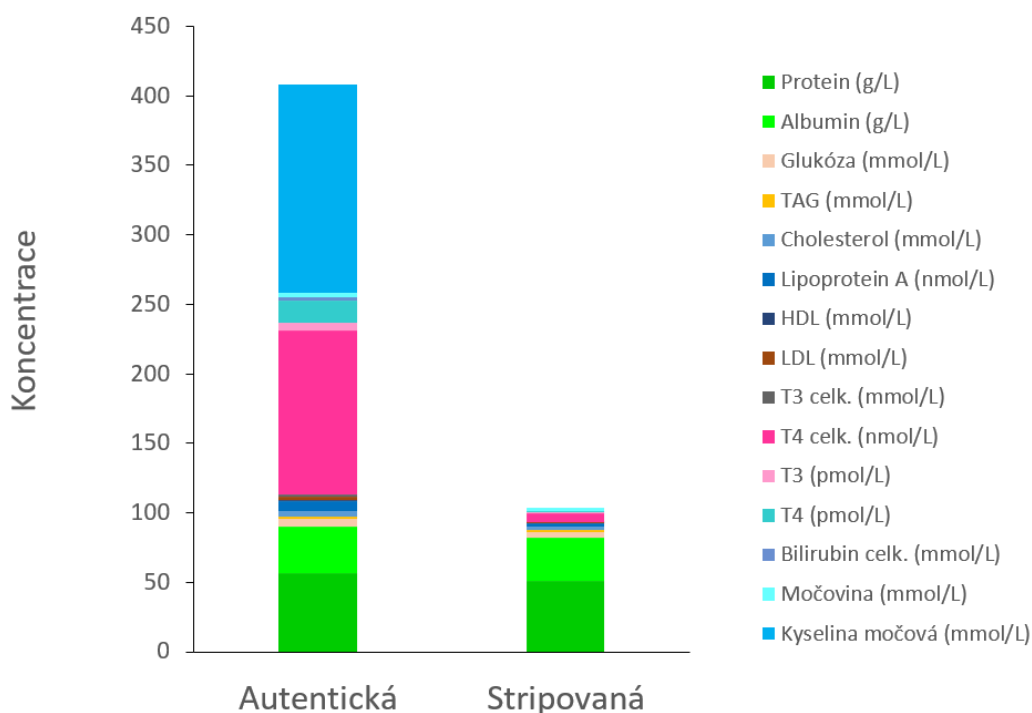
4.2. Porovnání zástupných matric

4.2.1. Stripovaná plazma

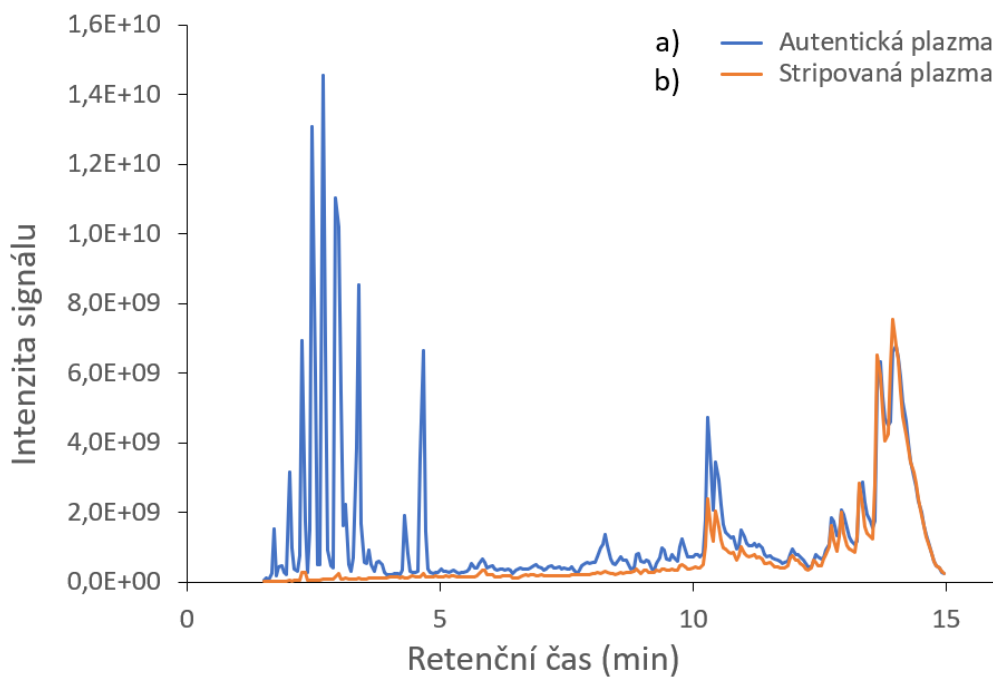
Pokud se podíváme do dostupné literatury, pak zjistíme, že stripovaná plazma je jednou z nejpoužívanějších zástupných matric při kvantifikaci žlučových kyselin [30, 64, 65]. Zde je však nutné podotknout, že použití stripované matrice nepatří mezi zcela ideální a jak bude ukázáno dále na příkladu našich experimentů, tak nepřináší benefity při srovnání s použitím čisté zástupné matrice. Stripování plazmy totiž ovlivňuje nejen koncentrace žlučových kyselin (žádoucí efekt), ale výrazným způsobem i další složky plazmy (nežádoucí efekt). Jak bylo prokázáno v našem experimentu, tak po stripování došlo k signifikantní změně koncentrací nejenom žlučových kyselin, které bylo třeba z matrice odstranit, ale i koncentrací mnoha dalších endogenních látek, jak ukázala biochemická analýza vybraných markerů (Obrázek 2). Některé analyty byly odstraněny zcela, například bilirubin a kyselina močová. Koncentrace T3, T4, HDL, LDL a lipoproteinu-a klesly pod 50 % původní koncentrace a koncentrace celkového cholesterolu, glukózy a TAG klesly na méně než 70 % původní hodnoty. Kompletní výsledky testu jsou uvedeny v Tabulce 3.

Skupinově specifická LC-MS/MS analýza fosfolipidů dále odhalila významné změny v zastoupení fosfatidylcholinů a sfingomyelinů (Obrázek 3). Vzhledem k tomu, že jsou tyto složky často odpovědné za matriční efekty, jejich odstranění může vést k falešně negativním výsledkům během hodnocení matričních efektů v případě použití takto upravené matrice.

V rámci hodnocení směrnice kalibračních křivek, kalibrátory připravené ve stripované plazmě vykazovaly odchylky od -11,0 % (GLCA) do 1,99 % (GCDCA) ve srovnání s kalibrátory připravenými v autentické plazmě (Tabulka 4). V chromatogramu nebyly přítomny žádné interference a při kalibraci nebyl pozorován žádný významný posun na ose Y, což poukazuje na efektivní odstranění všech testovaných žlučových kyselin z plazmy.



Obrázek 2. Koncentrace vybraných biochemických markerů v autentické lidské plazmě před a po stripování aktivním uhlím. Stripování bylo uskutečněno se 100 mg aktivního uhlí na 1 mL plazmy při 22 °C po dobu 24 hodin.



Obrázek 3. Kvalitativní srovnání chromatogramu fosfatidylcholinů a sfingomyelinů v autentické a stripované lidské plazmě. Chromatogramy byly vytvořeny pomocí skenování prekurzorových iontů při m/z 184 v ESI (+).

Tabulka 3. Koncentrace vybraných biochemických markerů v autentické lidské plazmě před a po stripování aktivním uhlím.

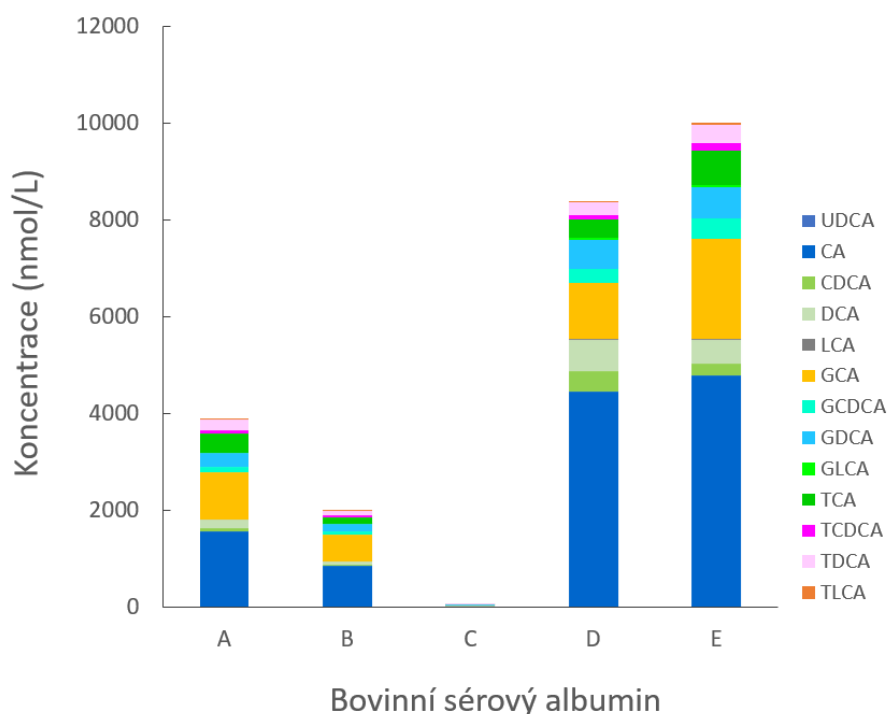
Marker	Autentická	Stripovaná
Protein (g/L)	56.3	51.1
Albumin (g/L)	34.1	30.8
Glukóza (mM)	4.93	4.20
TAG (mM)	1.68	1.23
Cholesterol (mM)	4.03	2.84
Lipoprotein A (nM)	7.20	2.10
HDL (mM)	0.90	0.23
LDL (mM)	2.08	0.37
T3 celkový (mM)	2.19	0.38
T4 celkový (nM)	118	6.61
T3 (pM)	5.01	0.94
T4 (pM)	16.3	0.50
Bilirubin celkový (μM)	2.30	0.00
Močovina (mM)	3.10	2.60
Kyselina močová (μM)	150	0.00

Zaměříme-li se na samotnou přípravu stripované plazmy, jednou z možných nevýhod je nutnost použití ultracentrifugace k odstranění reziduí aktivního uhlí, protože ne každá analyticky zaměřená laboratoř takovým vybavením disponuje. Pokusy o prostou filtraci vzorků přes 0,20 μm filtry vedly k okamžitému ucpání filtru, i když filtraci předcházelo odstředování běžnou centrifugou při 13 000 × g. Dalším problémem při přípravě stripované plazmy byla relativně nízká výtěžnost (60 %). Metoda tedy není příliš vhodná pro špatně dostupné matrice, kde je k dispozici limitované množství materiálu a očekává se vysoká výtěžnost při úpravě. Jak vyplývá z prezentovaných dat, tak stripovanou plazmu nelze z hlediska kvalitativního ani kvantitativního složení v žádném případě považovat za vhodný ekvivalent autentické plazmy. Značně diskutabilní je tedy i tvrzení, které se často opakuje v literatuře, že stripovaná plazma je lepší nebo vhodnější matrice než jakákoli jiná z testovaných náhradních matric, protože její složení je významně ovlivněno během její přípravy.

4.2.2. Umělá plazma

Uměle připravená plazma je další běžně používanou zástupnou maticí v oblasti analýzy endogenních sloučenin [5, 63]. V rámci hodnocení selektivity metody při použití této matrice se však projevily značné problémy s přítomností píků interferujících s mnoha stanovovanými žlučovými kyselinami. Přistoupilo se tedy k hledání původu interferencí. Zdroj kontaminace byl vysledován až k bovinnímu sérovému albuminu (BSA) použitým v koncentraci 40 g/L jako aditivum v umělé plazmě, který byl kontaminován vysokými koncentracemi CA, CDCA, DCA, LCA a jejich glyko- a taurokonjugáty.

Na základě tohoto pozorování bylo dále otestováno několik různých šarží BSA od různých výrobců na přítomnost žlučových kyselin. Výsledky ukazují kontaminaci většiny šarží BSA (Obrázek 4). V nejhorším případě (Obrázek 4-E) dosahovala celková suma koncentrací žlučových kyselin hodnoty 10013 nM. Z tohoto množství většinu tvořila kyselina cholová s koncentrací 4789 nM, což odpovídá 239 % horní limitu kalibrační křivky. Z pěti testovaných šarží BSA byla kontaminace na přijatelné úrovni pouze v jednom případě s celkovou koncentrací žlučových kyselin pod 55 nM (Obrázek 4-C).



Obrázek 4. Koncentrace žlučových kyselin nalezených v přípravcích z hovězího sérového albuminu. Zdroj albuminu: A) PAA, Kat. č.: K21-02, šarže: G16113-155, B) Sevac šarže: 103260988, C) Sigma-Aldrich, kat.č. č.: A9418-10G, Lot.: 057K12011, D) Sigma-Aldrich, Kat. č.: A3912-100G, šarže: 31K1264 a E) šarže: SLCJ1981.

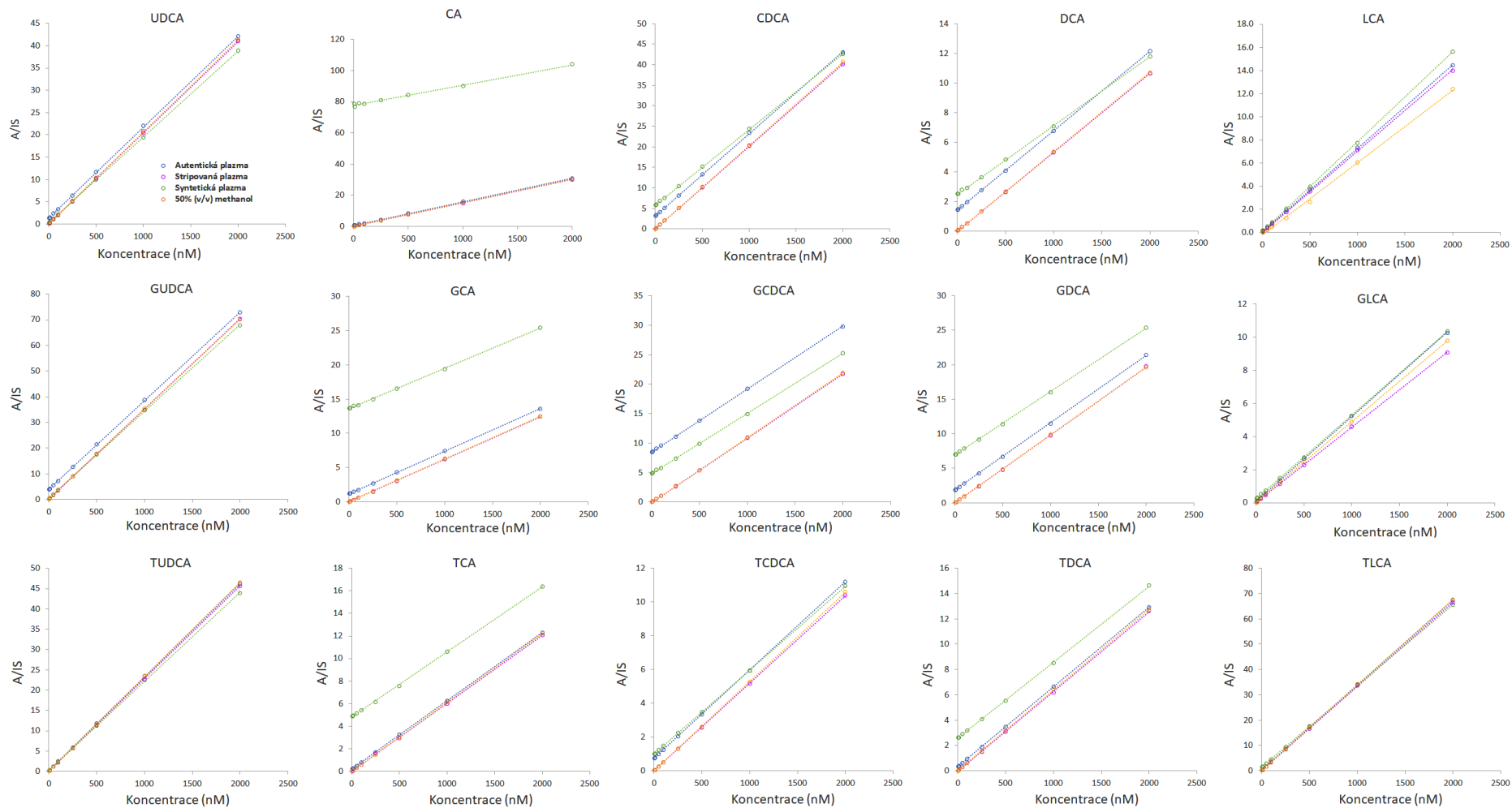
Ani tato metoda tedy nezaručuje bezproblémovou cestu k validaci a analýze. Vzhledem k možným velkým rozdílům v bazálních koncentracích žlučových kyselin v různých zdrojích BSA je třeba vzít výše uvedenou komplikaci v úvahu, pokud má být pro přípravu referenčních vzorků použita umělá plazma obsahující BSA. Obdobná situace může nastat i v případě využití lidského sérového albuminu (HSA), neboť vazba žlučových kyselin na krevní albumin jako transportní protein je běžný jev, který lze předpokládat i v případě HSA. Vyhodnocení směrnice kalibrační přímky pro umělou plazmu ukázalo odchylky od 14,7 % (CA) do 7,50 % (LCA) kalibrace připravené v autentické plazmě (Tabulka 4).

4.2.3. Roztok methanolu

Hodnocení roztoku methanolu (50 %, v/v) jako zástupné matrice ukázalo, že při srovnání s autentickou biologickou matricí leží směrnice kalibračních křivek pro všechny žlučové kyseliny v rozmezí -4,41 % (GLCA) až 2,87 % (GCDCA), s výjimkou LCA, kde byla odchylka vyšší a dosáhla -13,5 % (Tabulka 4). Všechny výsledné odchylky byly tedy v předem definovaném rozsahu ± 15 %. V případě této matrice byla splněna podmínka paralelity, nebyly zde pozorovány žádné interferující píky v retenčních časech stanovovaných žlučových kyselin, příprava matrice byla jednoduchá, nehrozí zde významné riziko zanesení kontaminace nebo matriční přítomnost analytů a z dlouhodobého hlediska je příprava vysoce reprodukovatelná. Z tohoto důvodu jsme 50% methanol ve vodě zvolili jako vhodnou zástupnou matrici pro přípravu kalibrátorů, jenž byly používány v průběhu validační studie a při rutinním měření vzorků.

Tabulka 4. Směrnice kalibračních křivek v rozsahu 5–2000 nM připravených v různých matricích a jejich odchylky od kalibrace připravené v autentické matrici. Pro hodnocení paralelity byl použit lineární kalibrační model využívající obecnou rovnici přímky $Y = aX + b$.

Žlučová kyselina	Směrnice kalibračních křivek				Odchylka (%)		
	Autentická plazma	Stripovaná plazma	Umělá plazma	50 % (v/v) methanol	Stripovaná plazma	Umělá plazma	50 % (v/v) methanol
UDCA	0.020419	0.020489	0.019337	0.020688	0.34	-5.30	1.31
CA	0.015167	0.015090	0.012944	0.015206	-0.50	-14.7	0.26
CDCA	0.020019	0.020091	0.018431	0.020356	0.36	-7.93	1.68
DCA	0.005374	0.005326	0.004650	0.005372	-0.89	-13.5	-0.04
LCA	0.007198	0.007013	0.007738	0.006228	-2.56	7.50	-13.5
GUDCA	0.034582	0.035170	0.033951	0.035079	1.70	-1.82	1.44
GCA	0.006211	0.006238	0.005887	0.006240	0.42	-5.21	0.46
GCDCA	0.010671	0.010883	0.010183	0.010976	1.99	-4.57	2.87
GDCA	0.009779	0.009879	0.009218	0.009841	1.03	-5.73	0.64
GLCA	0.005110	0.004549	0.005045	0.004885	-11.0	-1.28	-4.41
TUDCA	0.023092	0.022845	0.021999	0.023305	-1.07	-4.73	0.92
TCA	0.006053	0.006025	0.005777	0.006119	-0.46	-4.56	1.08
TCDCa	0.005241	0.005193	0.004979	0.005301	-0.92	-5.01	1.14
TDCA	0.006316	0.006311	0.006013	0.006371	-0.08	-4.81	0.86
TLCA	0.033648	0.033259	0.032154	0.033881	-1.16	-4.44	0.69



Obrázek 5. Porovnání kalibračních křivek 15 žlučových kyselin (nekonjugovaných, glycin-konjugovaných a taurin-konjugovaných) připravených v různých testovaných maticích (autentická plazma, stripovaná plazma, umělá plazma a 50% v/v methanol).

4.3. Validace metody

Validace zahrnovala testování selektivity, matričních efektů, výtěžnosti, kalibračního modelu, dolní meze kvantifikace, správnosti, přesnosti, integrity ředění a stability s využitím dvou nezávislých sad vzorků kontroly kvality připravených v autentické a zástupné matrici, která byla vybrána na základě předběžného testování. Na základě výsledků validace lze prohlásit, že metoda poskytla obdobné výsledky jak pro QC vzorky připravené v autentické matrici, tak pro QC vzorky připravené v zástupné matrici (50% v/v methanolu), přičemž v obou případech byla splněna kritéria pro validaci bioanalytických metod dle doporučení EMA. Výsledky jednotlivých validačních testů jsou ukázány dále.

4.3.1. Selektivita

Selektivita byla testována u všech matric hodnocených v předběžném testování, kromě autentické plazmy, vzhledem k přirozenému výskytu žlučových kyselin v této matrici. Zde bylo provedeno pouze testování selektivity pro izotopicky značené vnitřní standardy. V případě stripované plazmy a 50% (v/v) methanolu nebyly pozorovány žádné interference. Analýzou se též potvrdila kompletní deplece žlučových kyselin z původní matrice po stripování pomocí aktivního uhlí. V případě umělé plazmy byla zjištěna významná kontaminace žlučovými kyselinami, jejichž zdroj byl prokázán v BSA použitém pro přípravu umělé plazmy (Kapitola 4.2.2.). Autentická plazma nevykazovala žádné významné interference v retenčních časech použitých deuterovaných IS.

4.3.2. Matriční efekty

Matriční efekty byly během vývoje a validace metody hodnoceny na celkem 38 vzorcích plazmy, což je více jak 6x větší množství, než je doporučeno validační směrnici EMA. Takto velké množství použitých vzorků vychází ze skutečnosti, že jednou z důležitých prerekvizit aplikovatelnosti námi vyvinutého postupu je důkladné ověření, že metoda je prosta matričních efektů. V počáteční fázi vývoje metody byla přítomnost matričních efektů ve vzorcích plazmy těhotných žen (n = 18) kvalitativně hodnocena za pomoci post-kolonové infúze [97] s využitím izotopicky značených standardů žlučových kyselin jako zástupných analytů. Ve všech případech byl pro každou žlučovou kyselinu použit odpovídající deuterovaný analog kromě LCA, kde značený analog nebyl dostupný.

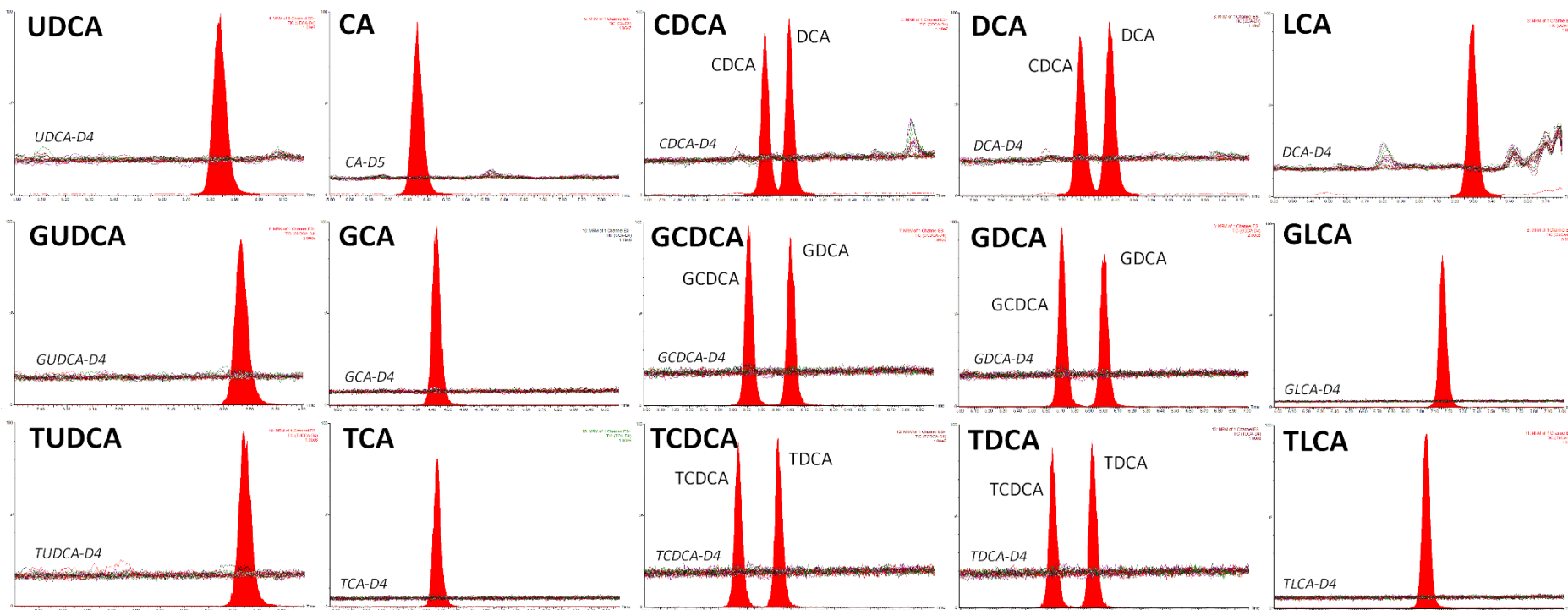
V tomto případě byl použit standard DCA-D4 kvůli strukturální podobnosti a blízkému retenčnímu času k LCA a matriční efekty byly hodnoceny pouze kvalitativně. Jak je vidět z výsledků uvedených na Obrázku 6, extrahované iontové proudy jednotlivých žlučových kyselin nevykazují žádné významné změny signálu v retenčních časech žlučových kyselin zahrnutých v analýze. V rámci validace metody pak bylo s využitím stejných izotopicky značených standardů provedeno kvantitativní hodnocení, které ukázalo, že matriční efekty leží v rozmezí 92,3 – 107,9 % ($c = 15 \text{ nM}$, $n = 10$) a 94,2 – 104,1 % ($c = 1500 \text{ nM}$, $n = 10$) a nepřekračují tedy limity dané směrnici EMA. Kompletní výsledky kvantitativního stanovení jsou uvedeny v Tabulce 5. Získaná data ukazují, že vyvinutá metoda je s vysokou mírou pravděpodobnosti prosta matričních efektů.

4.3.3. Výtěžnost metody

Výsledky měření výtěžnosti analytů při přípravě vzorků ($n=5$) byly konzistentní pro každou skupinu žlučových kyselin skrze celý testovaný koncentrační rozsah. Za zmínku stojí fakt, že žlučové kyseliny konjugované s taurinem vykazovaly v průměru nižší výtěžnost $71,7 \pm 1,83 \%$ (PRŮMĚR \pm SD) ve srovnání s nekonjugovanými žlučovými kyselinami ($84,5 \pm 0,58 \%$) a žlučovými kyselinami konjugovanými s glycinem ($80,8 \pm 1,83 \%$). Jednou z možných příčin je výrazně vyšší polarita taurin-konjugovaných žlučových kyselin, která by mohla vést k jejich nižší rozpustnosti ve 100 % acetonitrilu použitým při deproteinaci. Popsané chování však nemělo vliv na přesnost a správnost metody, jak bylo prokázáno dalšími validačními testy. Kompletní výsledky výtěžnosti jednotlivých analytů jsou k dispozici v Tabulce 6.

4.3.4. Kalibrační model

Kalibrační model pro každou žlučovou kyselinu byl individuálně vyhodnocen pomocí parametrů *CCF* a *CCP* dle metody popsané v práci Singtoroj et al. [98]. Jako nejvhodnější model byl vybrán ten, který získal hodnotu nejnižšího celkového koeficientu, který byl vypočítán jako součet koeficientů získaných pro *CCF* a *CCP*. Nejlepších výsledků bylo dosaženo s kvadratickým modelem a vážením $1/x^2$, kromě UDCA a GUDCA, kde byla použita váha $1/x$. Kompletní výsledky vyhodnocení kalibračního modelu jsou shrnuty v Tabulce 7 (*CCF*) a v Tabulce 8 (*CCP*).



Obrázek 6. Hodnocení matričních efektů ve vzorcích plazmy gravidních pacientek (n = 18) s použitím post-kolonové infúze (5 μ L/min) deuterovaných analogů žlučových kyselin (c = 50 nM) použitých jako zástupné analyty. Extrahované iontové proudy jednotlivých žlučových kyselin nevykazují žádné významné změny signálu v retenčních časech.

Tabulka 5. Matriční efekty (%) hodnocené při koncentracích 15 nM a 1500 nM v nezávislých vzorcích plazmy získaných od kohorty těhotných žen (n = 20).

Matriční efekty (%) při koncentraci 15 nM														
Plazma	UDCA-D4	CA-D5	CDCA-D4	DCA-D4	GUDCA-D4	GCA-D4	GCDCA-D4	GDCA-D4	GLCA-D4	TUDCA-D4	TCA-D4	TCDC-A-D4	TDCA-D4	TLCA-D4
A	98.9	100.3	98.8	98.0	104.2	96.9	101.4	98.2	97.8	101.2	98.4	99.0	100.1	99.4
B	100.4	98.4	98.9	96.0	100.0	96.9	99.3	99.3	97.7	101.2	97.7	100.4	99.2	99.2
C	100.2	95.1	98.7	95.7	103.5	99.8	98.8	101.5	98.3	99.4	99.1	98.5	99.1	99.2
D	98.9	98.5	98.5	97.8	100.4	98.4	98.4	99.1	98.9	100.3	99.4	96.7	98.6	98.6
E	99.4	96.6	98.7	98.0	101.8	96.6	96.8	98.5	97.2	99.2	99.9	96.7	99.3	97.1
F	96.3	96.0	98.2	95.9	99.6	97.0	98.6	96.3	95.7	97.3	96.6	99.3	97.0	97.1
G	93.9	97.8	98.2	107.9	102.3	97.9	101.7	98.6	96.5	101.4	98.0	99.9	98.9	98.0
H	99.5	95.9	104.3	99.4	101.4	101.4	101.5	98.2	97.3	101.7	102.3	102.1	98.4	99.7
I	95.3	92.3	96.9	92.6	96.6	95.7	95.4	96.5	93.9	95.9	92.6	95.6	95.1	96.1
J	98.5	97.9	99.1	96.7	102.2	98.8	100.7	98.3	96.4	103.3	99.8	103.1	99.6	98.8
Matriční efekty (%) při koncentraci 1500 nM														
Plazma	UDCA-D4	CA-D5	CDCA-D4	DCA-D4	GUDCA-D4	GCA-D4	GCDCA-D4	GDCA-D4	GLCA-D4	TUDCA-D4	TCA-D4	TCDC-A-D4	TDCA-D4	TLCA-D4
K	97.3	96.8	96.7	96.7	95.7	99.2	96.8	98.6	99.2	99.9	102.7	101.0	104.1	99.5
L	96.2	95.1	95.2	94.3	94.2	95.2	95.3	96.2	94.4	98.7	96.9	98.1	97.0	96.9
M	98.4	98.5	97.4	97.5	96.5	98.0	98.3	99.0	98.0	98.0	98.7	99.3	98.6	98.9
N	99.1	99.6	97.7	98.8	98.1	98.3	98.5	99.6	97.6	99.0	99.1	102.5	99.2	98.9
O	97.2	97.4	96.3	96.6	96.0	97.2	98.0	98.7	97.4	96.8	98.3	99.4	100.4	98.3
P	103.1	101.4	101.3	101.4	100.4	101.2	102.9	102.6	101.4	102.3	102.1	102.9	103.9	102.0
Q	97.1	96.9	96.6	97.0	97.1	98.0	97.9	98.4	97.6	98.5	100.2	99.4	98.9	97.8
R	96.8	96.8	95.5	94.6	96.4	96.9	95.4	96.9	96.3	97.7	96.9	97.4	98.7	97.5
S	98.9	98.4	97.7	98.3	96.4	99.8	98.4	100.5	98.7	99.0	99.7	101.8	101.5	99.3
T	97.3	96.4	96.8	96.4	94.9	96.6	98.5	96.6	97.3	97.7	99.3	98.9	98.2	98.2

Tabulka 6. Výtěžnost extrakce (%) hodnocená pro koncentrační hladiny 15, 500 a 1500 nM (opakování n = 5 pro každou koncentrační hladinu)

Zástupný Analyt	15 nM		500 nM		1500 nM	
	PRŮMĚR	SD	PRŮMĚR	SD	PRŮMĚR	SD
UDCA-D4	93.9	9.9	90.9	9.8	85.2	2.9
CA-D5	84.5	5.1	82.5	7.1	82.3	2.0
CDCA-D4	81.2	3.4	83.0	2.6	84.1	1.6
DCA-D4	80.2	1.0	82.5	1.9	83.8	1.8
GUDCA-D4	78.4	2.8	78.9	2.7	80.1	1.7
GCA-D4	77.7	2.7	75.3	1.4	78.6	1.7
GCDCA-D4	83.3	1.8	79.3	1.4	81.5	2.1
GDCA-D4	87.0	7.6	79.9	2.1	80.6	2.0
GLCA-D4	86.6	2.6	81.5	1.8	82.9	2.1
TUDCA-D4	72.7	4.4	70.2	0.8	72.6	3.5
TCA-D4	68.3	4.9	64.8	1.1	67.1	2.7
TCDCA-D4	74.2	4.6	71.3	2.6	70.9	2.5
TDCA-D4	79.1	7.8	71.7	1.8	71.1	2.3
TLCA-D4	74.6	3.8	73.0	1.0	74.6	1.8
nekonjugované	85.0	6.3	84.7	4.1	83.9	1.2
glycin-konjugované	82.6	4.4	79.0	2.3	80.7	1.6
taurin-konjugované	73.8	3.9	70.2	3.2	71.3	2.8

Tabulka 7. Vyhodnocení kalibračního modelu pro 15 žlučových kyselin (nekonjugovaných, glycin-konjugovaných a taurin-konjugovaných) na základě CCF. Relativní rezidua (RR %) byla vypočtena jako $RR \% = |(c_b - c_n)/c_n| \times 100$, kde c_n je jmenovitá koncentrace a c_b je koncentrace zpětně vypočtená z kalibrační křivky na dané kalibrační hladině. Pořadí bylo určeno podle rostoucí hodnoty relativního rezidua (Rank). Výsledná hodnota (Rank - suma) byla vypočítána jako součet jednotlivých hodnot.

Proložení kalibrační křivky																			
Analyt	Model	Váha	5 nM		10 nM		50 nM		100 nM		250 nM		500 nM		1000 nM		2000 nM		Rank suma
			RR %	Rank	RR %	Rank	RR %	Rank	RR %	Rank	RR %	Rank	RR %	Rank	RR %	Rank	RR %	Rank	
UDCA	Lineární	1/x	10.2	4	5.70	1	3.90	4	4.60	4	5.30	1	0.50	1	2.60	4	0.90	3	22
	Lineární	1/x ²	4.20	2	7.80	4	3.00	2	3.30	2	6.60	3	2.00	3	1.10	1	2.40	4	21
	Kvadratický	1/x	8.10	3	6.20	2	3.20	3	3.80	3	6.00	2	1.10	2	2.40	3	0.40	1	19
	Kvadratický	1/x ²	3.70	1	7.20	3	1.80	1	2.20	1	7.40	4	2.40	4	1.80	2	0.50	2	18
CA	Lineární	1/x	7.80	4	1.60	1	2.50	4	5.50	4	4.10	1	1.30	4	2.50	4	1.40	3	25
	Lineární	1/x ²	2.10	2	3.60	4	1.60	3	4.30	3	5.40	2	0.20	2	1.00	1	2.80	4	21
	Kvadratický	1/x	3.00	3	2.80	2	0.90	2	3.70	2	5.80	3	0.10	1	1.90	3	0.40	2	18
	Kvadratický	1/x ²	1.60	1	3.10	3	0.50	1	3.20	1	6.20	4	0.50	3	1.70	2	0.10	1	16
CDCA	Lineární	1/x	13.5	4	2.60	1	4.50	4	5.90	4	2.80	1	2.60	3	2.90	4	2.10	3	24
	Lineární	1/x ²	3.40	2	6.10	4	3.00	3	3.70	3	5.10	2	0.10	1	0.30	1	4.70	4	20
	Kvadratický	1/x	4.80	3	4.70	2	1.80	2	2.60	2	5.80	3	0.10	1	1.80	3	0.40	2	18
	Kvadratický	1/x ²	2.70	1	5.20	3	1.10	1	1.80	1	6.50	4	0.50	2	1.50	2	0.10	1	15
DCA	Lineární	1/x	4.40	4	1.90	1	1.90	4	3.90	4	5.60	1	0.90	4	2.00	4	0.80	3	25
	Lineární	1/x ²	1.70	2	2.90	4	1.60	3	3.40	3	6.20	2	0.20	2	1.30	1	1.50	4	21
	Kvadratický	1/x	2.40	3	2.40	2	1.30	2	3.20	2	6.20	2	0.30	3	1.80	3	0.40	2	19
	Kvadratický	1/x ²	1.40	1	2.70	3	1.00	1	2.80	1	6.60	3	0.00	1	1.60	2	0.20	1	13
LCA	Lineární	1/x	3.90	4	4.50	1	1.50	3	2.40	4	6.20	1	0.20	1	2.30	3	0.50	2	19
	Lineární	1/x ²	2.60	2	4.90	4	1.40	2	2.10	2	6.50	3	0.50	2	2.00	1	0.80	3	19
	Kvadratický	1/x	3.60	3	4.60	2	1.50	3	2.30	3	6.30	2	0.20	1	2.30	3	0.50	2	19
	Kvadratický	1/x ²	2.50	1	4.80	3	1.10	1	1.80	1	6.60	4	0.50	2	2.10	2	0.20	1	15

Tabulka 7. Pokračování ...

Proložení kalibrační křivky																			
Analyt	Model	Váha	5 nM		10 nM		50 nM		100 nM		250 nM		500 nM		1000 nM		2000 nM		Rank
			RR %	Rank	RR %	Rank	RR %	Rank	RR %	Rank	RR %	Rank	RR %	Rank	RR %	Rank	RR %	Rank	RR %
GUDCA	Lineární	1/x	12.9	4	3.30	1	5.00	4	5.70	4	2.00	1	0.30	1	2.50	4	1.30	3	22
	Lineární	1/x ²	3.70	2	6.50	4	3.70	3	3.70	2	4.10	3	2.50	3	0.10	1	3.70	4	22
	Kvadratický	1/x	7.80	3	4.50	2	3.40	2	3.80	3	3.70	2	1.70	2	1.90	3	0.30	1	18
	Kvadratický	1/x ²	3.00	1	5.60	3	1.90	1	2.00	1	5.40	4	3.10	4	1.20	2	0.80	2	18
GCA	Lineární	1/x	3.40	4	1.20	1	1.70	4	4.70	4	5.80	1	0.50	4	1.40	4	0.40	3	25
	Lineární	1/x ²	1.20	2	2.00	4	1.40	2	4.30	2	6.30	3	0.00	1	0.80	1	0.90	4	19
	Kvadratický	1/x	2.80	3	1.40	2	1.50	3	4.50	3	6.00	2	0.40	3	1.30	3	0.30	2	21
	Kvadratický	1/x ²	1.10	1	1.80	3	1.00	1	3.80	1	6.60	4	0.10	2	1.10	2	0.10	1	15
GCDCA	Lineární	1/x	5.50	4	4.80	1	1.30	4	3.20	4	4.60	1	0.50	1	1.80	4	0.40	3	22
	Lineární	1/x ²	3.00	2	5.70	4	0.90	2	2.60	2	5.20	3	1.20	3	1.10	1	1.00	4	21
	Kvadratický	1/x	5.30	3	4.90	2	1.20	3	3.10	3	4.70	2	0.60	2	1.70	3	0.30	2	20
	Kvadratický	1/x ²	2.80	1	5.50	3	0.40	1	2.10	1	5.60	4	1.30	4	1.40	2	0.20	1	17
GDCA	Lineární	1/x	2.00	3	0.90	1	2.00	3	3.60	3	5.60	2	0.30	2	1.60	3	0.30	2	19
	Lineární	1/x ²	0.90	2	1.30	3	1.90	2	3.40	2	5.80	3	0.60	3	1.30	1	0.60	3	19
	Kvadratický	1/x	2.30	4	0.90	1	2.10	4	3.70	4	5.50	1	0.20	1	1.60	3	0.30	2	20
	Kvadratický	1/x ²	0.80	1	1.20	2	1.60	1	3.10	1	6.00	4	0.60	3	1.40	2	0.00	1	15
GLCA	Lineární	1/x	14.0	4	0.10	1	7.40	4	7.50	4	4.10	1	1.50	3	3.80	4	2.30	3	24
	Lineární	1/x ²	2.70	2	4.10	4	5.70	3	5.10	3	6.60	2	1.30	2	0.90	1	5.10	4	21
	Kvadratický	1/x	5.10	3	2.30	2	4.50	2	4.10	2	7.00	3	1.00	1	2.70	3	0.50	2	18
	Kvadratický	1/x ²	1.90	1	3.10	3	3.50	1	2.90	1	8.10	4	2.00	4	2.30	2	0.20	1	17

Tabulka 7. Pokračování ...

Proložení kalibrační křivky																			
Analyt	Model	Váha	5 nM		10 nM		50 nM		100 nM		250 nM		500 nM		1000 nM		2000 nM		Rank
			RR %	Rank	RR %	Rank	RR %	Rank	RR %	Rank	RR %	Rank	RR %	Rank	RR %	Rank	RR %	Rank	RR %
TUDCA	Lineární	1/x	10.1	4	5.10	1	2.80	4	4.30	4	5.30	1	1.80	3	3.20	4	1.70	3	24
	Lineární	1/x ²	3.80	2	7.20	4	1.90	3	3.00	3	6.70	2	0.20	2	1.50	1	3.20	4	21
	Kvadratický	1/x	4.50	3	6.40	2	1.00	2	2.20	2	7.20	3	0.20	2	2.50	3	0.50	2	19
	Kvadratický	1/x ²	3.30	1	6.60	3	0.60	1	1.80	1	7.60	4	0.10	1	2.30	2	0.30	1	14
TCA	Lineární	1/x	5.30	4	3.50	1	2.90	4	2.30	4	5.20	1	0.70	4	1.80	4	0.60	3	25
	Lineární	1/x ²	2.50	2	4.50	4	2.40	2	1.70	2	5.90	3	0.00	1	1.00	1	1.30	4	19
	Kvadratický	1/x	4.10	3	3.80	2	2.50	3	1.90	3	5.70	2	0.30	3	1.60	3	0.30	2	21
	Kvadratický	1/x ²	2.20	1	4.20	3	1.90	1	1.20	1	6.30	4	0.20	2	1.40	2	0.00	1	15
TCDCA	Lineární	1/x	6.90	4	3.70	1	3.90	4	4.00	3	6.50	1	0.80	1	3.50	4	1.10	3	21
	Lineární	1/x ²	2.90	2	5.10	4	3.30	3	3.20	2	7.40	3	1.70	3	2.50	1	2.10	4	22
	Kvadratický	1/x	4.70	3	4.30	2	3.20	2	3.20	2	7.20	2	1.40	2	3.30	3	0.60	2	18
	Kvadratický	1/x ²	2.60	1	4.70	3	2.50	1	2.40	1	7.90	4	2.00	4	3.00	2	0.20	1	17
TDCA	Lineární	1/x	11.2	4	5.90	1	3.60	4	6.40	4	6.70	1	0.00	1	2.90	4	1.00	2	21
	Lineární	1/x ²	4.40	2	8.20	4	2.60	2	5.00	2	8.20	3	1.60	3	1.10	1	2.70	3	20
	Kvadratický	1/x	8.50	3	6.50	2	2.80	3	5.40	3	7.60	2	0.70	2	2.50	3	0.50	1	19
	Kvadratický	1/x ²	3.90	1	7.60	3	1.30	1	3.70	1	9.10	4	2.00	4	2.00	2	0.50	1	17
TLCA	Lineární	1/x	13.3	4	0.10	1	5.20	4	6.90	4	1.90	1	1.80	4	3.70	4	2.50	3	25
	Lineární	1/x ²	2.50	2	4.00	4	3.60	3	4.60	3	4.40	2	0.90	1	0.90	1	5.20	4	20
	Kvadratický	1/x	3.20	3	2.60	2	2.00	2	3.10	2	5.30	3	1.10	2	2.50	3	0.50	2	19
	Kvadratický	1/x ²	1.70	1	3.00	3	1.50	1	2.50	1	5.90	4	1.60	3	2.20	2	0.10	1	16

Tabulka 8. Vyhodnocení kalibračního modelu pro 15 žlučových kyselin (nekonjugovaných, glycin-konjugovaných a taurin-konjugovaných) na základě CCP. Hodnoty (Rank) byly přiřazeny v pořadí dle absolutní hodnoty relativní chyby $|RE\%|$. Výsledná hodnota (Rank - suma) byl vypočítána jako součet jednotlivých hodnot Rank. Celkové pořadí (Celkový rank) bylo vypočteno jako součet hodnot (Rank - suma) pro CCF (Tabulka 7) a CCP (Tabulka 8).

Předvídatelnost kalibrační křivky												
Analyt	Model	Váha	LLOQ (5 nM)		QC1 (15 nM)		QC2 (500 nM)		QC3 (1500 nM)		Rank	Celkový rank
			$ RE\% $	Rank	$ RE\% $	Rank	$ RE\% $	Rank	$ RE\% $	Rank	suma	
UDCA	Lineární	$1/x$	3.48	4	0.76	4	0.98	1	10.1	1	10	32
	Lineární	$1/x^2$	3.16	2	0.46	1	2.40	3	11.5	4	10	31
	Kvadratický	$1/x$	2.24	1	0.72	3	1.52	2	10.2	2	8	27
	Kvadratický	$1/x^2$	3.34	3	0.64	2	2.76	4	10.2	3	12	30
CA	Lineární	$1/x$	6.88	4	2.40	4	1.08	1	9.40	1	10	35
	Lineární	$1/x^2$	2.85	2	1.82	1	1.68	3	10.7	4	10	31
	Kvadratický	$1/x$	3.30	3	2.28	3	1.64	2	9.42	2	10	28
	Kvadratický	$1/x^2$	2.63	1	2.26	2	2.02	4	9.46	3	10	26
CDCA	Lineární	$1/x$	15.0	4	5.06	4	0.76	1	10.6	1	10	34
	Lineární	$1/x^2$	4.92	2	3.40	1	3.04	2	12.9	4	9	29
	Kvadratický	$1/x$	6.26	3	4.70	3	3.06	3	10.7	2	11	29
	Kvadratický	$1/x^2$	4.12	1	4.60	2	3.68	4	10.8	3	10	25
DCA	Lineární	$1/x$	7.72	4	2.92	4	2.00	1	9.92	1	10	35
	Lineární	$1/x^2$	4.96	2	2.46	1	2.70	3	10.5	2	8	29
	Kvadratický	$1/x$	5.72	3	2.86	3	2.60	2	9.92	1	9	28
	Kvadratický	$1/x^2$	4.76	1	2.82	2	2.84	4	9.92	1	8	21
LCA	Lineární	$1/x$	3.78	4	2.38	3	2.70	1	8.80	1	9	28
	Lineární	$1/x^2$	2.54	2	2.22	1	3.04	3	9.10	2	8	27
	Kvadratický	$1/x$	3.58	3	2.36	2	2.76	2	8.80	1	8	27
	Kvadratický	$1/x^2$	2.48	1	2.36	2	3.08	4	8.80	1	8	23

Tabulka 8. Pokračování ...

Předvídatelnost kalibrační křivky												
Analyt	Model	Váha	LLOQ (5 nM)		QC1 (15 nM)		QC2 (500 nM)		QC3 (1500 nM)		Rank	Celkový rank
			RE %	Rank	RE %	Rank	RE %	Rank	RE %	Rank	suma	
GUDCA	Lineární	1/x	2.66	1	2.68	1	1.58	4	8.32	1	7	29
	Lineární	1/x ²	7.32	3	4.04	3	0.72	2	10.5	3	11	33
	Kvadratický	1/x	3.90	2	2.74	2	0.30	1	8.32	1	6	24
	Kvadratický	1/x ²	7.80	4	2.74	2	1.28	3	8.36	2	11	29
GCA	Lineární	1/x	1.16	2	1.76	2	0.42	2	8.56	1	7	32
	Lineární	1/x ²	1.96	3	1.80	3	0.50	3	9.06	2	11	30
	Kvadratický	1/x	1.06	1	1.76	2	0.34	1	8.56	1	5	26
	Kvadratický	1/x ²	2.14	4	1.72	1	0.58	4	8.56	1	10	25
GCDCA	Lineární	1/x	5.90	4	1.26	2	0.44	1	9.46	1	8	30
	Lineární	1/x ²	4.36	2	1.32	3	0.56	3	10.1	3	11	32
	Kvadratický	1/x	5.76	3	1.24	1	0.46	2	9.46	1	7	27
	Kvadratický	1/x ²	4.22	1	1.26	2	0.74	4	9.52	2	9	26
GDCA	Lineární	1/x	5.36	3	1.94	2	1.22	2	9.78	1	8	27
	Lineární	1/x ²	4.70	2	1.88	1	1.52	3	10.1	3	9	28
	Kvadratický	1/x	5.62	4	1.94	2	1.12	1	9.78	1	8	28
	Kvadratický	1/x ²	4.64	1	1.94	2	1.58	4	9.80	2	9	24
GLCA	Lineární	1/x	12.1	4	1.70	4	1.34	2	10.2	1	11	35
	Lineární	1/x ²	2.06	2	0.62	1	1.42	3	12.7	4	10	31
	Kvadratický	1/x	3.40	3	1.52	3	1.18	1	10.3	2	9	27
	Kvadratický	1/x ²	1.86	1	1.46	2	2.12	4	10.4	3	10	27

Tabulka 8. Pokračování ...

Předvídatelnost kalibrační křivky												
Analyt	Model	Váha	LLOQ (5 nM)		QC1 (15 nM)		QC2 (500 nM)		QC3 (1500 nM)		Rank	Celkový rank
			RE %	Rank	RE %	Rank	RE %	Rank	RE %	Rank	suma	
TUDCA	Lineární	1/x	11.2	4	3.06	4	0.66	1	9.14	1	10	34
	Lineární	1/x ²	4.85	2	2.04	1	1.68	2	10.6	3	8	29
	Kvadratický	1/x	5.48	3	2.86	3	1.70	3	9.18	2	11	30
	Kvadratický	1/x ²	4.35	1	2.84	2	2.06	4	9.18	2	9	23
TCA	Lineární	1/x	2.48	1	2.26	2	1.60	1	10.0	1	5	30
	Lineární	1/x ²	3.80	3	2.34	3	2.32	3	10.6	3	12	31
	Kvadratický	1/x	3.14	2	2.26	2	1.94	2	10.0	2	8	29
	Kvadratický	1/x ²	4.26	4	2.22	1	2.46	4	10.0	2	11	26
TCDCA	Lineární	1/x	12.1	4	2.68	4	1.08	1	9.46	1	10	31
	Lineární	1/x ²	8.10	2	2.04	1	2.06	3	10.4	4	10	32
	Kvadratický	1/x	9.90	3	2.64	3	1.72	2	9.48	2	10	28
	Kvadratický	1/x ²	7.78	1	2.56	2	2.30	4	9.54	3	10	27
TDCA	Lineární	1/x	4.6	4	2.38	2	1.02	1	9.20	1	8	29
	Lineární	1/x ²	4.00	2	2.52	3	2.58	3	10.8	4	12	32
	Kvadratický	1/x	2.98	1	2.34	1	1.70	2	9.24	2	6	25
	Kvadratický	1/x ²	4.22	3	2.34	1	3.00	4	9.28	3	11	28
TLCA	Lineární	1/x	12.0	4	1.96	4	0.90	1	9.68	1	10	35
	Lineární	1/x ²	1.96	2	0.92	1	2.04	2	12.2	4	9	29
	Kvadratický	1/x	2.38	3	1.72	2	2.24	3	9.78	2	10	29
	Kvadratický	1/x ²	1.76	1	1.74	3	2.70	4	9.80	3	11	27

4.3.5. Dolní mez kvantifikace

Stanovení dolní meze kvantifikace (LLOQ) bylo provedeno pouze u vzorků QC-Set-A na koncentrační hladině 5 nM. LLOQ u QC vzorků připravených v autentické plazmě nebylo možné stanovit z důvodu přirozeného výskytu žlučových kyselin, který byl vyšší než zvolená koncentrační hladina. Přesnost na hladině LLOQ vyjádřená jako variační koeficient byla lepší než 7,72 % (GCDCA) a správnost vyjádřená jako relativní chyba byla v rozmezí -3,82 % až 2,38 % napříč všemi žlučovými kyselinami (Tabulka 9).

4.3.6. Přesnost a správnost

Přesnost a správnost byla stanovena pro referenční vzorky připravené v autentické matrici i v zástupné matrici. V případě autentické matrice (QC-Set-B) nemohlo být měření referenčních vzorků o nižších koncentracích provedeno striktně v souladu s doporučením EMA. Nejnižší QC vzorek dle tohoto doporučení by měl mít koncentraci na hladině odpovídající $3 \times \text{LLOQ}$, nebo nižší. V našem případě nebylo možné takový vzorek připravit z důvodu přirozeného výskytu vyšších koncentrací některých žlučových kyselin v biologické matrici, než je výše uvedená doporučená koncentrační hladina. Z tohoto důvodu byla pro většinu testovaných žlučových kyselin jako kompromisní koncentrace zvolena hladina 50 nM, kromě UDCA, CDCA, DCA, TCDCA, GUDCA, GDCA a GCA, jejichž přirozená koncentrace byla vyšší než 50 nM a GCDCA, která se přirozeně vyskytovala v koncentracích vyšších než 500 nM. U těchto žlučových kyselin nebyly zmiňované koncentrační hladiny hodnoceny. Ostatní koncentrace žlučových kyselin v QC-Set-B však již byly v souladu s předpisy validační směrnice EMA. Paralelně se přesnost a správnost hodnotily také pomocí QC vzorků z QC-Set-A, připravených v zástupné matrici (50 % v/v methanol). V tomto případě všechny koncentrační hladiny striktně kopírovaly doporučení směrnice EMA. Výsledky hodnocení přesnosti a správnosti jsou shrnuty v Tabulce 9.

Hodnocení správnosti u zástupné matrice (QC-Set-A) v rámci dne poskytovalo relativní chyby v rozsahu -9,88 % (UDCA) až 0,76 % (DCA) pro nekonjugované žlučové kyseliny, od -9,52 % (GCDCA) do 0,52 % (GCDCA) pro žlučové kyseliny konjugované s glycinem a od -9,40 % (TCA) do 0,70 % (TDCA) pro žlučové kyseliny konjugované s taurinem. V případě mezidenního měření byly relativní chyby v rozsahu -10,3 % (CA) až 0,31 % (CDCA) pro nekonjugované žlučové kyseliny, od -9,87 % (GCDCA) do 1,79 % (GUDCA) pro žlučové kyseliny konjugované s glycinem a v rozmezí -9,91 % (TCA) až 1,53 % (TDCA) pro taurinem konjugované žlučové kyseliny.

Hodnocení správnosti pro autentickou matrici (QC-Set-B) v rámci jednoho dne poskytovalo relativní chyby v rozsahu -11,7 % (CA) až 1,18 % (LCA) pro nekonjugované žlučové kyseliny, od -13,8 % (GLCA) do 7,30 % (GUDCA) pro žlučové kyseliny konjugované s glycinem a od -9,74 % (TDCA) do 3,04 % (TDCA) pro žlučové kyseliny konjugované s taurinem. Pro mezidenní stanovení byly relativní chyby od -12,2 % (CA) do 0,86 % (UDCA) pro nekonjugované žlučové kyseliny, od -12,9 % (GLCA) do 8,13 % (GUDCA) pro žlučové kyseliny konjugované s glycinem a od -10,8 % (TDCA) do 4,10 % (TDCA) pro taurinem konjugované žlučové kyseliny.

Variační koeficienty (přesnost), vycházely u vzorků QC-Set-A v rámci dne <1,54 % (CA) pro nekonjugované žlučové kyseliny, <2,29 % (GCA) pro žlučové kyseliny konjugované s glycinem a <2,95 % (TUDCA) pro žlučové kyseliny konjugované s taurinem. Variační koeficienty u mezidenního stanovení přesnosti byly <5,93 % (CDCA) nekonjugované žlučové kyseliny, <2,58 % (GDCA) pro glycinem konjugované žlučové kyseliny a <2,40 % (TUDCA) pro žlučové kyseliny konjugované s taurinem.

Výsledky přesnosti metody v rámci jednoho dne u QC-Set-B poskytovaly variační koeficienty <3,85 % (UDCA) u nekonjugovaných žlučových kyselin, <2,05 % (GCA) u glycinem konjugovaných žlučových kyselin a <2,37 % (TCA) u taurinem konjugovaných žlučových kyselin. Mezidenní variační koeficienty vycházely <3,34 % (LCA), <2,41 % (GCA) a <3,67 % (TDCA) pro nekonjugované, glycinem konjugované a taurinem konjugované žlučové kyseliny.

Tabulka 9. Správnost (RE %) a přesnost (CV %) metody v rámci dne a mezi jednotlivými dny pro stanovení 15 nekonjugovaných, glycinem konjugovaných a taurinem konjugovaných žlučových kyselin v lidské plazmě a 50 % v/v methanolu jako zástupné matrice (opakování n=5 na každé koncentrační hladině).

Žlučová kyselina	QC-Set-A (50 % v/v methanol)					QC-Set-B (autentická plazma)				
	Konc. hladina (nM)	V rámci dne		Mezidenní		Konc. hladina (nM)	V rámci dne		Mezidenní	
		CV (%)	RE (%)	CV (%)	RE (%)		CV (%)	RE (%)	CV (%)	RE (%)
UDCA	5	2.99	-0.96	4.83	-2.17	_*	_*	_*	_*	_*
	15	0.93	-0.68	1.93	-0.17	50	3.85	-5.88	3.15	-7.59
	500	1.07	-1.50	0.54	-1.64	500	0.97	0.64	0.59	0.86
	1500	0.84	-9.88	0.42	-10.1	1500	1.07	-3.34	0.68	-4.13
CA	5	3.38	-1.14	2.35	0.97	_*	_*	_*	_*	_*
	15	1.54	-0.46	1.21	-1.59	50	1.49	-11.7	1.39	-12.2
	500	1.25	-2.02	1.43	-3.87	500	1.73	-1.60	0.97	-2.09
	1500	0.82	-9.46	1.47	-10.3	1500	1.09	-6.48	0.92	-7.23
CDCA	5	6.18	0.54	5.39	2.55	_*	_*	_*	_*	_*
	15	0.57	-1.24	5.93	0.31	50 (141.6) **	1.50	-	0.82	-
	500	0.99	-2.82	1.38	-3.15	500	1.55	-5.74	2.06	-6.84
	1500	0.76	-8.80	1.21	-9.55	1500	0.99	-9.18	2.34	-9.78
DCA	5	0.96	-1.10	2.82	0.51	_*	_*	_*	_*	_*
	15	0.97	0.76	1.81	-1.05	50 (252.4) **	1.27	-	0.69	-
	500	0.90	-2.50	0.71	-3.01	500	1.33	-6.84	1.30	-8.19
	1500	0.48	-9.16	0.60	-9.73	1500	0.84	-8.30	0.82	-8.96
LCA	5	1.51	-0.14	2.29	1.25	_*	_*	_*	_*	_*
	15	1.22	-0.30	1.15	-1.48	50	0.90	1.18	3.34	-3.86
	500	0.69	-3.08	0.35	-3.57	500	1.27	-6.28	1.90	-7.81
	1500	0.53	-8.48	1.10	-9.23	1500	0.86	-9.10	1.55	-11.0
GUDCA	5	2.52	-0.78	2.80	0.21	_*	_*	_*	_*	_*
	15	2.12	0.50	1.43	1.79	50 (102.3) **	1.54	-	1.64	-
	500	0.88	0.14	1.95	-0.51	500	1.36	6.82	0.97	7.39
	1500	0.98	-8.32	1.10	-9.36	1500	0.94	7.30	0.95	8.13
GCA	5	1.70	2.14	5.20	3.99	_*	_*	_*	_*	_*
	15	2.29	0.36	2.18	-0.43	50 (184.5) **	2.05	-	0.93	-
	500	0.54	-0.26	1.56	-1.98	500	1.50	-1.90	2.41	-5.51
	1500	0.51	-8.56	0.73	-9.31	1500	1.57	-3.54	1.87	-5.31
GCDCA	5	7.72	-0.66	5.13	4.46	_*	_*	_*	_*	_*
	15	1.79	0.52	1.21	-0.50	50 (752.6) **	1.81	-	1.33	-
	500	1.15	-0.74	1.05	-1.94	500 (752.6) **	1.52	-	1.61	-
	1500	1.07	-9.52	0.60	-9.87	1500	1.32	-8.82	1.31	-9.92
GDCA	5	3.54	-0.62	4.01	0.53	_*	_*	_*	_*	_*
	15	1.56	-0.62	2.58	-0.12	50 (179.7) **	1.84	-	1.40	-
	500	1.32	-1.58	0.85	-2.05	500	1.60	-6.60	1.30	-7.29
	1500	1.10	-9.30	0.59	-9.49	1500	1.35	-1.38	1.14	-2.39
GLCA	5	2.49	-0.06	2.12	1.35	_*	_*	_*	_*	_*
	15	1.16	-0.46	0.59	-0.92	50	1.41	-6.34	1.96	-7.81
	500	1.27	-2.12	0.65	-2.44	500	1.17	-2.00	1.27	-3.83
	1500	1.22	-8.46	1.30	-9.71	1500	1.43	-13.8	0.96	-12.9

Tabulka 9. Pokračování ...

Žlučová kyselina	QC-Set-A (50 % v/v methanol)					QC-Set-B (autentická plazma)				
	Konc. hladina (nM)	V rámci dne		Mezidenní		Konc. hladina (nM)	V rámci dne		Mezidenní	
		CV (%)	RE (%)	CV (%)	RE (%)		CV (%)	RE (%)		
TUDCA	5	5.17	-1.90	4.18	-2.36	_*	_*	_*	_*	_*
	15	2.95	-0.66	2.40	-0.76	50	2.24	0.18	2.41	-1.00
	500	1.51	-1.08	1.34	-1.52	500	1.18	1.66	0.65	2.42
	1500	1.34	-8.68	0.70	-9.07	1500	1.77	-0.96	1.71	0.85
TCA	5	3.95	2.38	3.16	4.64	_*	_*	_*	_*	_*
	15	2.72	-0.30	1.64	0.97	50	2.37	-5.12	3.48	-6.00
	500	1.42	-1.24	0.87	-2.09	500	1.71	0.74	1.15	2.37
	1500	0.90	-9.40	0.64	-9.91	1500	0.80	2.58	0.90	3.16
TCDCA	5	6.13	-3.82	6.22	-0.95	_*	_*	_*	_*	_*
	15	1.49	-0.22	1.81	-2.06	50 (132.3) **	2.11	-	1.39	-
	500	0.61	-2.14	0.43	-2.74	500	1.97	-5.44	1.07	-6.24
	1500	1.15	-8.92	0.93	-9.63	1500	0.84	-1.36	1.50	-2.69
TDCA	5	5.01	-0.14	4.92	1.81	_*	_*	_*	_*	_*
	15	2.92	0.70	1.81	1.53	50	2.03	-9.74	3.67	-10.8
	500	1.15	-0.40	0.90	-1.24	500	2.30	1.06	1.27	1.78
	1500	1.14	-8.48	1.12	-9.34	1500	1.06	3.04	1.04	4.10
TLCA	5	2.31	-0.44	2.55	3.56	_*	_*	_*	_*	_*
	15	1.24	0.08	1.36	-0.04	50	1.69	-0.64	2.30	-1.83
	500	0.97	-1.82	0.91	-2.35	500	1.55	-1.42	1.39	-3.00
	1500	0.98	-9.26	0.58	-9.66	1500	0.90	-3.58	0.65	-4.13

* Bazální koncentrace endogenní žlučové kyseliny v autentické plazmě byla vyšší než koncentrační hladina odpovídající LLOQ.

** Bazální koncentrace endogenní žlučové kyseliny v autentické plazmě byla vyšší než nejnižší koncentrační hladina odpovídajícího vzorku kontroly kvality. Skutečná koncentrace je uvedena v závorce.

4.3.7. Stabilita

V rámci stanovení stability byla hodnocena krátkodobá stabilita, stabilita v autosampleru a test stability zmrazení/rozmrazení (3. cyklus) pro dvě koncentrační hladiny v případě QC-Set-A: 15nM (QCA1) a 1500nM (QCA3) a pro tři koncentrační hladiny v případě QC-Set-B: 50nM (QCB1), 500nM (QCB2) a 1500nM (QCB3).

Relativní chyby při ověřování krátkodobé stability u QC-Set-A byly od 1,63 % (GDCA) do 8,50 % (TDCA) pro QCA1 a v rozsahu -5,20 % (LCA) až - 1,27 % (TCDCA) pro QCA3. Při testování stability v autosampleru se relativní chyby pohybovaly od 2,23 % (CDCA) do 8,90 % (TDCA) pro QCA1 a od -3,70 % (CDCA) do 0,37 % (LCA) pro QCA3. Test stability zmrazení/rozmrazení po třetím cyklu vykazoval relativní chyby v rozmezí od 1,83 % (TCA) do 9,27 % (GCDCA) pro QCA1 a od -3,07 % (UDCA, GLCA) do - 0,63 % (TUDCA) pro QCA3.

Hodnocení správnosti u krátkodobé stability hodnocené pomocí QC-Set-B poskytovalo relativní chybu v rozmezí -13,5 % (CA) až -0,60 % (UDCA) pro QCB1, od -11,2 % (DCA) do 0,40 % (GUDCA) pro QCB2 a od -12,3 % (GLCA) do 1,10 % (TCA) pro QCB3. Stabilita v autosampleru se pohybovala od -11,7 % (CA) do 1,27 % (TLCA) pro QCB1, od -10,2 % (LCA) do 8,80 % (GUDCA) pro QCB2 a od -13,7 % (GLCA) do 8,23 % (GUDCA) pro QCB3. Testování stability zmrazení/rozmrazení po třetím cyklu vykazovalo relativní chyby stanovení koncentrace v rozsahu -11,5 % (CA) až 0,6 % (TUDCA) pro QCB1, od -10,6 % (LCA) do 5,9 % (GUDCA) pro QCB2 a od -13,9 % (GLCA) do 6,27 % (GUDCA) pro QCB3. Kompletní výsledky testování stability jsou shrnuty v Tabulce 10.

4.3.8. Integrita ředění

Integrita ředění byla stanovena za pomoci autentické plazmy fortifikované o žlučové kyseliny na výslednou koncentraci 20 μM . Vzorky byly následně před analýzou 40x ředěny vodou. Faktor ředění byl zvolen na základě předběžných testů s plazmami těhotných žen s prokázanou ICP. Zjištěné relativní chyby při ředění zvolenou maticí byly v rozsahu od -4,77 % (CA) do 14,2 % (LCA) pro nekonjugované žlučové kyseliny, od -6,65 % (GDCA) do 1,38 % (GUDCA) pro žlučové kyseliny konjugované s glycinem a od -8,45 % (TDCA) do 1,60 % (TLCA) pro žlučové kyseliny konjugované s taurinem. Variační koeficienty v případě testování přesnosti byly následující: <5,55 % (UDCA) pro nekonjugované žlučové kyseliny, <10,4 % (GUDCA) pro glycinem konjugované žlučové kyseliny a <8,52 % (TUDCA) taurinem konjugované žlučové kyseliny. Výsledky testu jsou shrnuty v Tabulce 11.

Tabulka 10. Stabilita uvedená pro 15 nekonjugovaných, glycinem konjugovaných a taurinem konjugovaných žlučových kyselin v lidské plazmě a v 50 % v/v methanolu jako zástupné matrici (opakování n = 5 pro koncentrační úroveň). Správnost je vyjádřena jako relativní chyba (RE %).

Žlučová kyselina	QC-Set-A (50 % v/v methanol)						QC-Set-B (autentická plazma)								
	Krátkodobá (4 h)		Autosampler (12 h)		Zmrazení/rozmraz. (3. cyklus)		Krátkodobá (4 h)			Autosampler (12 h)			Zmrazení/rozmraz. (3. cyklus)		
	15 nM RE (%)	1500 nM RE (%)	15 nM RE (%)	1500 nM RE (%)	15 nM RE (%)	1500 nM RE (%)	50 nM RE (%)	500 nM RE (%)	1500 nM RE (%)	50 nM RE (%)	500 nM RE (%)	1500 nM RE (%)	50 nM RE (%)	500 nM RE (%)	1500 nM RE (%)
UDCA	4.67	-1.67	5.07	-1.97	4.43	-3.07	-0.60	-6.40	-6.50	-9.10	-1.90	-2.37	-5.10	-3.07	-7.10
CA	7.87	-2.70	5.87	-2.90	3.87	-2.53	-13.5	-3.80	-7.40	-11.7	-1.00	-4.67	-11.5	-2.27	-9.67
CDCA	5.87	-2.00	2.23	-3.70	3.90	-2.33	*	-8.60	-9.00	*	-5.27	-7.33	*	-6.83	-10.2
DCA	5.97	-3.00	6.03	-0.93	5.47	-2.40	*	-11.2	-11.1	*	-6.50	-6.87	*	-7.97	-11.5
LCA	6.23	-5.20	4.67	0.37	2.33	-0.90	-10.0	-10.8	-6.10	-7.43	-10.2	-12.7	-6.63	-10.6	-13.5
GUDCA	6.60	-4.20	8.60	-0.90	5.47	-2.47	*	0.40	-8.20	*	8.80	8.23	*	5.90	6.27
GCA	6.27	-3.80	6.47	-0.90	3.83	-2.17	*	-10.0	-8.20	*	-5.47	-5.50	*	-4.47	-7.97
GCDCA	5.60	-3.17	6.37	-1.53	9.27	-2.20	*	*	-10.5	*	*	-8.37	*	*	-10.4
GDCA	1.63	-2.80	6.77	-0.77	2.53	-1.93	*	-8.70	-5.90	*	-7.07	-1.13	*	-7.40	-7.30
GLCA	4.27	-2.13	6.57	-2.13	3.93	-3.07	-12.7	-8.60	-12.3	-6.40	-2.90	-13.7	-6.00	-4.30	-13.9
TUDCA	7.43	-4.03	8.83	-1.07	3.50	-0.63	-3.90	-1.00	-0.10	0.07	2.93	1.83	0.60	1.13	-2.00
TCA	6.37	-1.47	8.43	-1.73	1.83	-2.30	-8.20	0.00	1.10	-2.90	3.83	4.37	-6.63	1.27	-1.33
TCDCA	3.80	-1.27	6.47	-1.03	3.30	-1.97	*	-8.80	-5.10	*	-4.93	-1.60	*	-6.77	-5.83
TDCA	8.50	-2.53	8.90	-1.17	6.80	-1.77	-12.7	-2.50	-0.60	-9.07	0.30	5.37	-10.1	-0.03	1.37
TLCA	6.57	-1.83	4.90	-2.57	3.80	-2.67	-4.80	-7.10	-5.60	1.27	-1.47	-1.90	-1.77	-4.43	-7.10

* Koncentrace endogenní žlučové kyseliny v autentické plazmě byla vyšší než zvolená koncentrační hladina

Tabulka 11. Výsledky integrity ředění pro 15 nekonjugovaných, glycinem konjugovaných a taurinem konjugovaných žlučových kyselin. Vzorky (n = 5) nativní plazmy byly obohaceny o žlučové kyseliny (20 μM) a zředěny 40× vodou Milli-Q. Přesnost a správnost jsou vyjádřeny jako variační koeficient (CV %) a relativní chyba (RE %).

Parametr	Žlučová kyselina														
	UDCA	CA	CDCA	DCA	LCA	GUDCA	GCA	GCDCA	GDCA	GLCA	TUDCA	TCA	TCDCa	TDCA	TLCA
Přesnost (CV%)	5.55	2.93	3.26	2.48	3.42	10.43	8.52	4.91	6.46	5.05	8.52	6.66	3.43	7.17	2.81
Správnost (RE%)	0.19	-4.77	-0.87	-4.00	13.2	1.38	0.55	1.28	-6.65	-2.79	-0.21	-4.22	-2.27	-8.45	1.60

4.4. Aplikace metody

4.4.1. Stanovení koncentrací žlučových kyselin u gravidních pacientek

Jak již bylo zmíněno v úvodu práce, žlučové kyseliny mohou být významnými diagnostickými markery některých onemocnění. Jednou z nemocí, která ovlivňuje jejich homeostázu je i intrahepatální cholestáza spojená s těhotenstvím (ICP). Tato patologie může vést ke komplikacím v průběhu těhotenství s vážnými následky jak pro matku, tak pro plod. Jedná se zejména o riziko spontánního předčasného porodu, nebo potratu [99]. Vzhledem k signifikantním změnám zastoupení žlučových kyselin v plazmě při rozvoji této patologie mají žlučové kyseliny velký diagnostický potenciál v rámci screeningu a monitorování ICP [32].

Jedním z cílů bylo aplikovat validovanou metodu při screeningu ICP na kohortě těhotných pacientek. Snahou bylo pomocí metody demonstrovat změny ve spektru žlučových kyselin, které mohou být spojené s nefyziologickým průběhem těhotenství. Detekce změn v koncentracích konkrétních žlučových kyselin může mít velký potenciál pro včasnou diagnostiku, prevenci nebo kontrolu probíhající terapie. Pro srovnání byly v kohortě sledovaných zahrnuty nejenom pacientky kontrolní skupiny a s ICP, ale i pacientky s dalšími diagnostikovanými patologiemi souvisejícími s těhotenstvím jako je gestační diabetes mellitus (GDM), nebo gestační hypotyreóza (GHT).

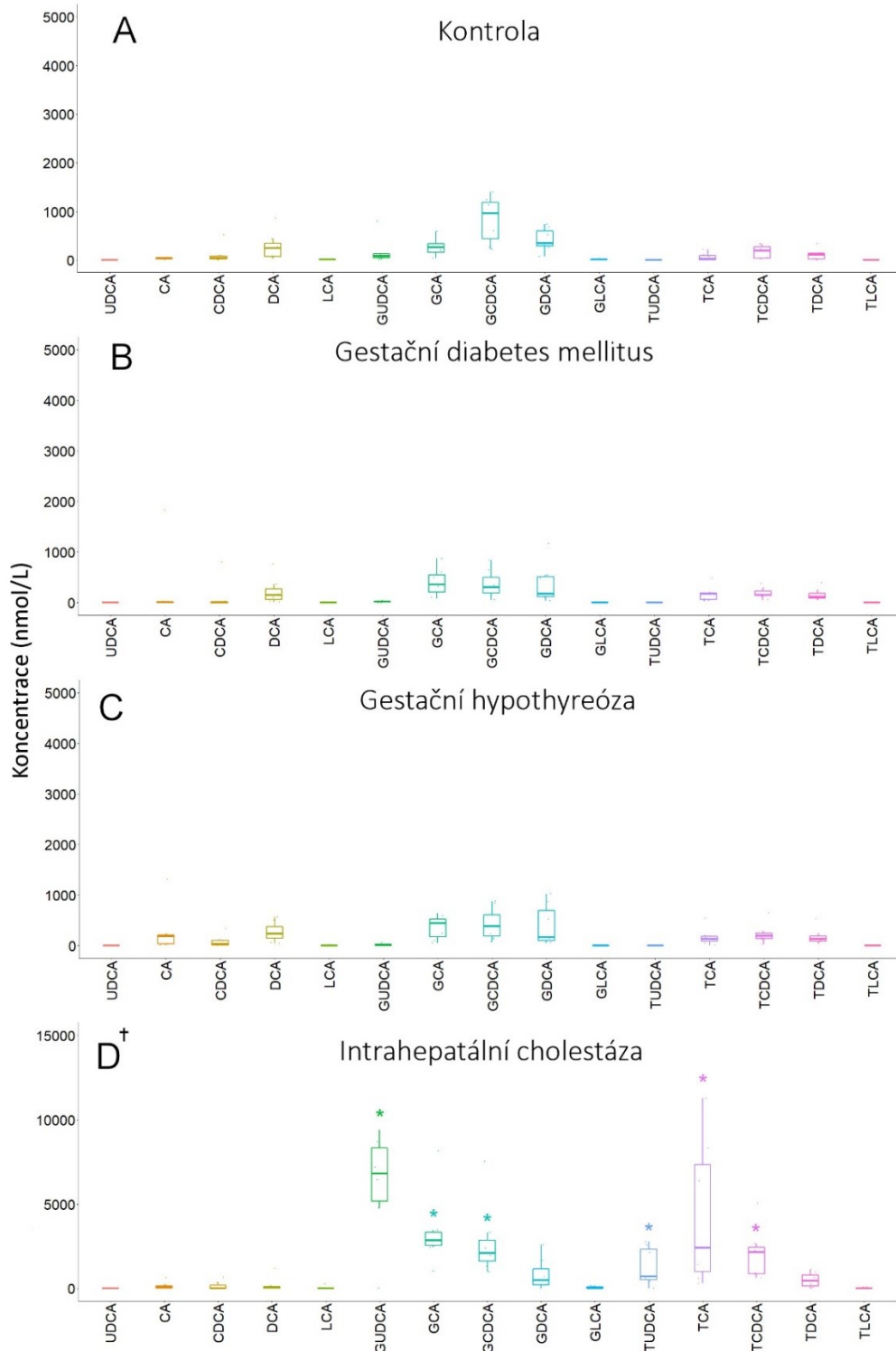
Pacientky zahrnuté ve studii

Vzorky plazmy byly získány od těhotných žen přijatých na Porodnicko-gynekologickou kliniku Fakultní nemocnice Hradec Králové. Studie byla schválena etickou komisí dne 7. února 2019 pod číslem 201902 S16P a od všech pacientů zařazených do studie byl před odběrem krve získán informovaný souhlas. Odběry vzorků byly provedeny v průběhu třetího trimestru (>28 týdnů). Gestační věk byl stanoven na základě biometrie plodu v prvním trimestru. Vzorky plazmy byly odebrány od zdravých těhotných žen (KO) a těhotných s diagnostikovaným GDM, GHT a ICP. V každé z uvedených skupin bylo získáno a analyzováno sedm vzorků plazmy.

Výsledky a diskuze

Pokud se podíváme na celkovou fyziologickou koncentraci žlučových kyselin v plazmě, tak by neměla překročit hodnotu 10 μM [35], což bylo potvrzeno i v naší studii u kontrolní skupiny těhotných žen. V rámci patologických změn jsme spolehlivě identifikovali těhotné ženy s ICP, které měly plazmatické koncentrace ve všech případech nad uvedenou hranicí. Ve skupině ICP byly ve srovnání s kontrolní skupinou významně zvýšené koncentrace zejména konjugovaných žlučových kyselin, konkrétně GCDCA, GCA, TCDCA, TDCA a TCA (viz Obrázek 7). Za zmínku stojí, že jsme byli schopni oproti fyziologickým vzorkům detekovat významné zvýšení koncentrace i u konjugátů kyseliny ursodeoxycholové (GUDCA, TUDCA). Kyselina ursodeoxycholová sice nepatří u lidí mezi běžné majoritní žlučové kyseliny, nicméně její nekonjugovaná podoba, známá pod názvem ursodiol, se využívá při farmakoterapii ICP. Metodou tedy bylo možné identifikovat v kohortě pacientek ženy, užívající tento přípravek. Jednou z potenciálních aplikací prezentované metody je tedy i monitoring léčby ICP pomocí ursodiolu, případně ověřování compliance při léčbě. V případě ostatních diagnóz (GDM a GHT) nebyly pozorovány žádné významné odchylky ve změnách koncentrací žlučových kyselin.

Výsledky této studie byly 01/2023 odeslány do redakce časopisu *Journal of Chromatography A* v manuskriptu: **An alternative approach to validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods for the quantification of endogenous compounds**, M. Uher, S. Mičuda, M. Kacerovský, M. Hroch. V době sepsování práce byl manuskript v recezním řízení po provedené první revizi.



Obrázek 7. Obsah žlučových kyselin ve vzorcích plazmy (A) zdravých těhotných žen, (B) těhotných žen s diagnózou gestační diabetes mellitus, (C) gestační hypothyreózy a (D) intrahepatální cholestázy v těhotenství. Data jsou prezentována jako mediány, přičemž box-ploty představují mezikvartilové rozmezí (IQR 25.-75. percentil) a vousy ukazují minima a maxima. *P < 0,05 byla brána jako hladina významnosti při srovnání s kontrolní skupinou. † Údaje ICP jsou prezentovány v jiném měřítku.

4.4.2. In vivo studie na potkanech s deficiencí MRP2

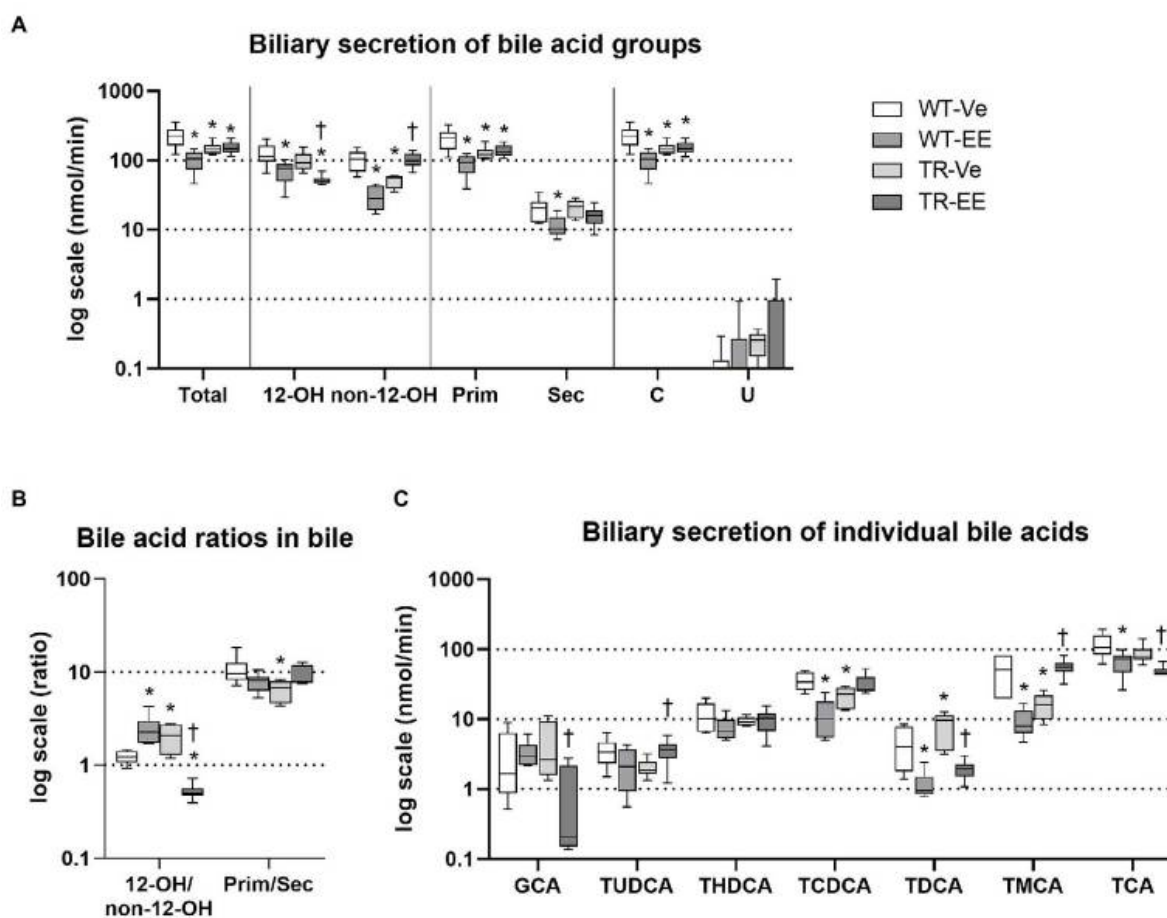
Druhou aplikací metody bylo sledování efektu deficiencie MRP2 u potkanů s estrogeny indukovanou poruchou metabolismu žlučových kyselin. Multidrug resistance-associated protein-2 (MRP2) je transportní protein jenž se podílí na biliární sekreci amfipatických organických aniontů a jejich konjugátů včetně žlučových kyselin. Je známo, že homozygotní mutace genu kódujícího protein MRP2 může způsobovat vzácnou poruchu jater, Dubin-Johnsonův syndrom, která se projevuje konjugovanou hyperbilirubinémií [100]. V souvislosti s deficitem MRP2 byly mimo jiné pozorovány i změny ve spektru žlučových kyselin [101]. Novější studie poukazují na zvýšení plazmatických koncentrací žlučových kyselin u jedinců s mutacemi genu pro MRP2, nicméně neposkytují informaci o změnách jednotlivých žlučových kyselin [102, 103]. Jiné studie se pro změnu zabývaly možnou souvislostí mezi deficitem MRP2 a cholestázou u těhotných, avšak ani zde nebyly přesné mechanismy studovány [104, 105]. Celková metabolická analýza žlučových kyselin v souvislosti s deficitem MRP2 nebyla doposud provedena.

Na základě těchto poznatků bylo cílem další prováděné studie objasnit úlohu MRP2 ve vztahu k ICP u *in vivo* modelu s estrogeny indukovanou cholestázou. K tomuto účelu byli použiti potkani s MRP2 deficiencí společně s kontrolní skupinou zdravých jedinců, kde byla následně u obou skupin indukována cholestáza ethinylestradiolem. V předchozích experimentálních studiích nebyly pozorovány žádné změny v biliární sekreci během krátkodobého (1-3 dny) podávání ethinylestradiolu. Vzhledem k tomu, že poškození biliární sekrece je spíše chronického charakteru, byl v naší studii použit standardní model ICP s dlouhodobějším podáváním ethinylestradiolu (5 dnů). Koncentrace jednotlivých žlučových kyselin byly poté analyzovány v plazmě, žluči a stolici pomocí naší LC-MS metody.

Výsledky a diskuze

U skupiny potkanů s deficientem MRP2 a indukovanou cholestázou byly pozorovány vyšší koncentrace žlučových kyselin v plazmě v souladu se sníženou biliární sekrecí žlučových kyselin (Obrázek 8) a jejich zvýšeným odtokem z hepatocytů do krve prostřednictvím upregulovaných transportérů MRP3 a MRP4. Tato skupina také vykazovala sníženou střevní reabsorpci žlučových kyselin v důsledku snížené exprese apikálního transportéru ASBT (apical sodium dependent bile acid transporter - ileální transportér pro žlučové kyseliny).

Získaná data poukazují na skutečnost, že estrogény indukovaná cholestáza, kombinovaná s MRP2 deficiencí a následnou aktivací transportérů MRP3 a MRP4 může představovat pro organismus vážné riziko. MRP2 transportér vykazuje širokou substrátovou specifitu a mimo žlučových kyselin se podílí na exkreci širokého spektra endogenních látek i xenobiotik. Za zmínku stojí, že prostřednictvím tohoto transportéru jsou z jater vylučovány i konjugáty bilirubinu. Proto v případě deficitu tohoto transportéru u pacientek s diagnostikovanou konjugovanou hyperbilirubinemií by v případě těhotenství mohlo monitorování žlučových kyselin pomoci s včasným záchytem rozvíjející se ICP.



Obrázek 8. Podávání ethinylestradiolu snížilo biliární sekreci žlučových kyselin u zdravých jedinců (WT) a skupiny s MRP2 deficiencí (TR). Experimentální skupiny: WT-Ve, WT potkani dostávající vehikulum; WT-EE, WT potkani dostávající ethinylestradiol; TR-Ve, TR potkani dostávající vehikulum; a TR-EE, TR potkani dostávající ethinylestradiol. (A) Biliární sekrece různých tříd žlučových kyselin. (B) Poměry skupin žlučových kyselin ve žluči. (C) Biliární sekrece jednotlivých žlučových kyselin. Data jsou prezentována jako mediány, přičemž box plot a vousy představují mezikvartilové rozmezí (5. – 95. percentil). Významnost: * $p < 0,1$ ve srovnání s potkany WT léčenými vehikulem; † $p < 0,05$ ve srovnání se skupinou TR léčenou vehikulem. Žlučové kyseliny: 12 α -hydroxylovaný (12-OH), 12 α -nehydroxylovaný (non-12-OH), primární (Prim), sekundární (Sec), konjugovaný (C) a nekonjugovaný (U). Zdroj: společná publikace, viz další strana.

Výsledky této studie jsou publikovány v práci: **Multidrug Resistance-Associated Protein 2 Deficiency Aggravates Estrogen-Induced Impairment of Bile Acid**, F. Alaei Faradonbeh, H. Lastuvkova, J. Cermanova, M. Hroch, Z. Nova, M. Uher, P. Hirsova, P. Pavek, S. Micuda, *Metabolomics in Rats*, *Front Physiol* 13 (2022) 859294.

4.4.3. In vivo studie na myších po podání metforminu

Třetí aplikací metody bylo sledování efektu metforminu na homeostázu žlučových kyselin u ethinylestradiolem vyvolané cholestázy u myší. Intrahepatální cholestáza je nejčastějším jaterním onemocněním v těhotenství, které se manifestuje hlavně během třetího trimestru a je provázené nálezem zvýšených aktivit jaterních enzymů a koncentrací žlučových kyselin v séru [22, 36]. Za hlavní příčinu komplikací ICP je označována kumulace žlučových kyselin v organismu matky a plodu v důsledku jejich porušené sekrece do žluče na straně matky. To je podmíněno snížením funkce základních transportních proteinů pro sekreci žlučových kyselin (BSEP – Bile Salt Exporting Protein, gen ABCB11) a fosfolipidů (MRP3 – Multidrug Resistance Protein 3, gen ABCB4) [106]. Současně dochází k nerovnováze v jaterních enzymech syntetizujících žlučové kyseliny z cholesterolu, což vede ke kvalitativním a kvantitativním změnám v jejich plazmatických hladinách směrem k CA a DCA a poklesu jejich rozpustnosti v důsledku snížení jejich konjugace s glycinem [107]. Primární příčinou, proč dochází k takto komplexním změnám v homeostáze žlučových kyselin a následně k rozvoji ICP je zvýšená produkce cholestatických metabolitů estrogenu a progesteronu [36].

Základní terapií ICP je v současnosti podávání UDCA [22]. Účinky této hydrofilní žlučové kyseliny jsou založeny na stimulaci žlučové sekrece prostřednictvím indukce BSEP transportéru [106]. Celkově pak podání UDCA snižuje intenzitu příznaků a rizika ICP pro matku a plod, a to při absenci nežádoucích účinků na plod [106]. Nicméně část žen s ICP na podání UDCA nereaguje [36] a proto jsou testovány nové terapeutické přístupy, které by na základě pozitivní klinické zkušenosti, nebo svého molekulárního účinku, mohly přinést benefit v léčbě ICP.

Byl zaznamenán případ snížení hladin žlučových kyselin a zlepšení příznaků ICP po podání perorálního antidiabetika metforminu, který je schválen i pro podání těhotným s gestačním diabetem mellitem [108]. Účinek metforminu za této situace však nebyl doposud studován, a tak byla hypotéza o možných pozitivních účincích metforminu při terapii ICP předmětem další studie v rámci naší hepatologické skupiny, kde bylo jeho působení sledované za podmínek estrogenu indukované cholestázy.

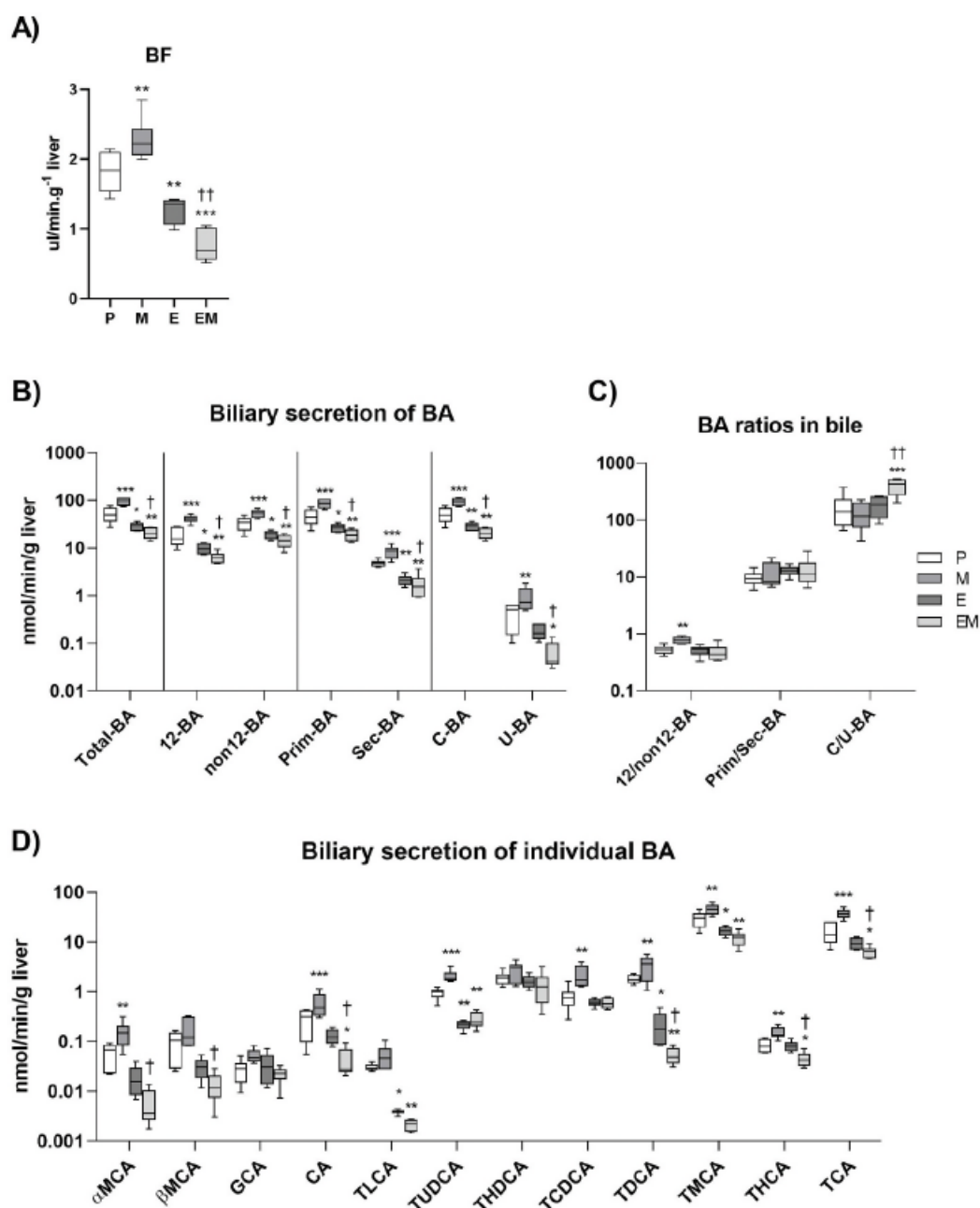
Pro studium ICP se s výhodou používá myší nebo potkaní model s cholestázou indukovanou ethinylestradiolem. Cholestáza byla indukována u myších samic C57BL/6 opakovaným podáváním ethinylestradiolu (10 mg/kg tělesné hmotnosti s.c.).

U skupiny myší s indukovanou cholestázou a kontrolní skupiny bez indukované cholestázy, byl podáván také metformin (150 mg/kg tělesné hmotnosti orálně) po dobu 5 po sobě jdoucích dnech s následným odběrem biologického materiálu (plazma, žluč, játra a stolice). Metabolomická studie žlučových kyselin byla opět provedena pomocí naší LC-MS metody.

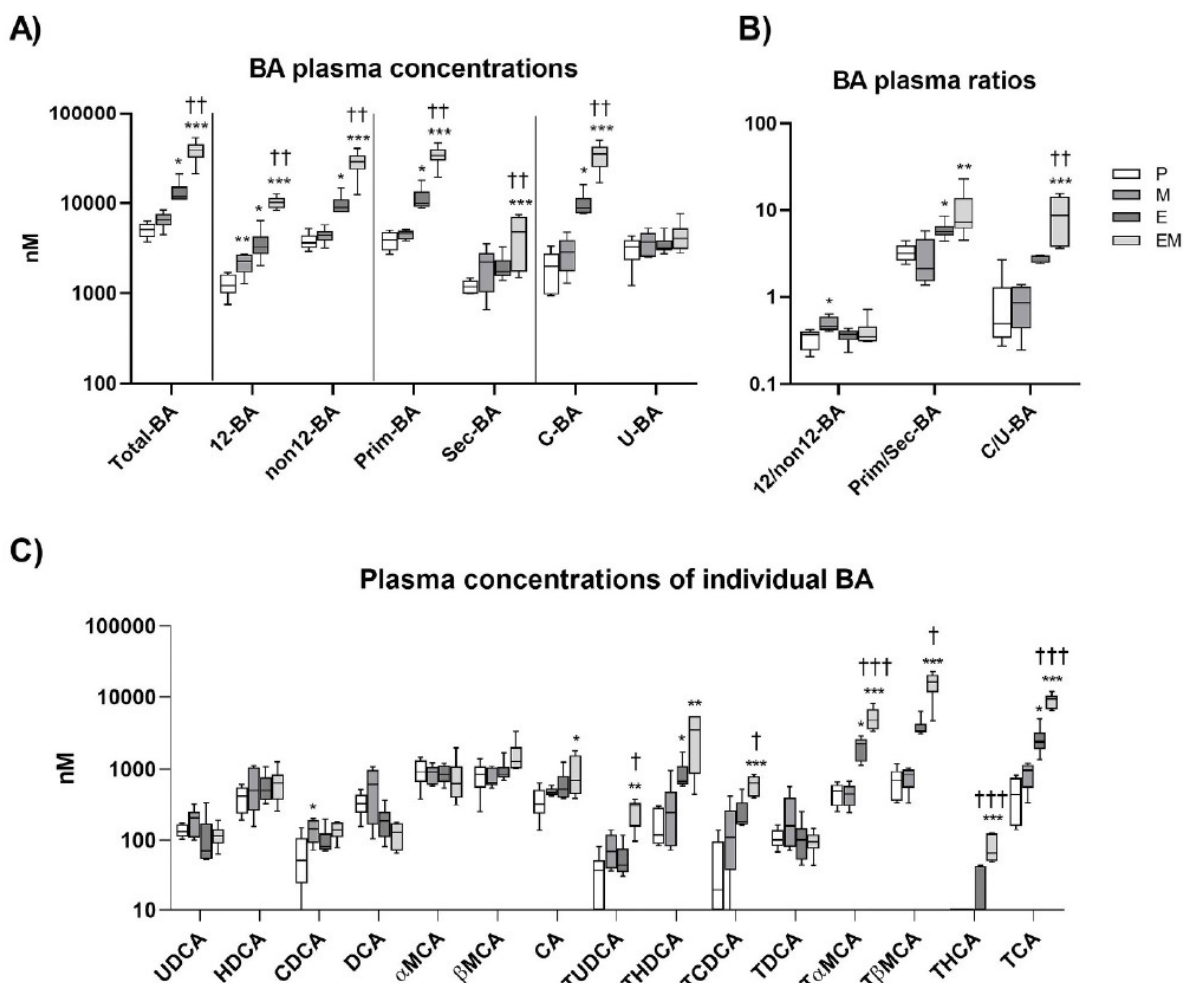
Výsledky a diskuze

Studie prokázala, že u kontrolní skupiny metformin významně zvýšil rychlost biliární sekrece jednotlivých žlučových kyselin nestejnou měrou (Obrázek 9). Toto zvýšení bylo způsobeno jak zvýšenou syntézou žlučových kyselin v játrech prostřednictvím indukované cholesterol-7 α -hydroxylázy (Cyp7a1), tak zvýšenou reabsorpcí žlučových kyselin v ileu prostřednictvím indukce transportéru pro žlučové kyseliny (ASBT). Na druhou stranu, u skupiny myší s ethinylestradiolem indukovanou cholestázou došlo k signifikantnímu zhoršení sekrece žluči. Toto snížení se opět lišilo v závislosti na konkrétní žlučové kyselině a korespondovalo s významnou downregulací hlavních transportérů pro vylučování a vychytávání žlučových kyselin v hepatocytech.

U skupiny myší léčených metforminem došlo též k významnému zvýšení plazmatických koncentrací žlučových kyselin (Obrázek 10). Získaná data naznačují pozitivní stimulaci sekrece žluči metforminem v játrech za fyziologických podmínek, na druhou stranu však tento lék indukuje vážné poškození biliární sekrece s výrazným zvýšením plazmatických koncentrací žlučových kyselin při estrogeny indukované cholestáze. Výsledky studie tedy naznačují, že metformin by měl být používán s opatrností v situacích, kdy může dojít k hormonálně indukované cholestáze, jako je tomu například i v případě ICP.



Obrázek 9. Metformin zvýšil biliární sekreci žlučových kyselin u myši s ethinylestradiolem indukovanou cholestázou. Fyziologický roztok nebo metformin (M; 150 mg/kg) byl podáván denně (p.o.) po dobu 5 po sobě jdoucích dnů myším samicím ($n = 6$ /skupina) paralelně s propandiolem (P) nebo ethinylestradiolem (E; 10 mg/kg, s. c.). Data jsou prezentována jako mediány, přičemž box ploty a vousy představují mezikvartilové rozmezí a 5.–95. percentily. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ metformin a/nebo ethinylestradiol vs. myši po podání fyziologického roztoku/propandiolu; † $p < 0,05$, †† $p < 0,01$, ††† $p < 0,001$ myši léčené metforminem vs. myši léčené fyziologickým roztokem s indukovanou cholestázou. Žlučové kyseliny (BA): primární (Prim-BA), sekundární (Sec-BA), 12 α -hydroxylované (12-BA), 12 α -nehydroxylované (non12-BA), konjugované (C-BA), nekonjugované (U-BA). Zdroj: společná publikace, viz konec sekce.



Obrázek 10. Metformin zvýšil plazmatické koncentrace žlučových kyselin u myši s ethinylestradiolem indukovanou cholestázou. Fyziologický roztok nebo metformin (M; 150 mg/kg) byl podáván denně (p.o.) po dobu 5 po sobě jdoucích dnů myším samicím (n = 6/skupina) paralelně s propandiolem (P) nebo ethinylestradiolem (E; 10 mg/kg, s.c.). Data jsou prezentována jako mediány, přičemž box ploty a vousy představují mezikvartilové rozmezí a 5.–95. percentily. *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001 metformin a/nebo ethinylestradiol vs. myši po podání fyziologického roztoku/propandiolu; †p <0,05, ††p <0,01, †††p <0,001 myši léčené metforminem vs. myši léčené fyziologickým roztokem s indukovanou cholestázou. Žlučové kyseliny (BA): primární (Prim-BA), sekundární (Sec-BA), 12 α -hydroxylované (12-BA), 12 α -nehydroxylované (non12-BA), konjugované (C-BA), nekonjugované (U-BA). Zdroj: společná publikace, viz níže.

Výsledky této studie jsou publikovány v práci: **Metformin impairs bile acid homeostasis in ethinylestradiol-induced cholestasis in mice**, F.A. Faradonbeh, I.I. Sa, H. Lastuvkova, J. Cermanova, M. Hroch, H. Faistova, J. Mokry, Z. Nova, M. Uher, P. Nachtigal, P. Pavek, S. Micuda, Chem Biol Interact 345 (2021) 109525

5. Závěr

Validace bioanalytických metod pro stanovení endogenních látek pomocí LC-MS může být i přes veškerý pokrok v bioanalýze stále náročný proces z důvodu absence autentické matrice bez přítomnosti stanovovaného analytu, tzv. slepého vzorku. Metodika prezentovaná v této práci poukazuje na další možný přístup pro validaci bioanalytických metod určených ke kvantifikaci endogenních látek v biologickém materiálu. Podstatou metody je využití kombinace zástupné a autentické matrice pro přípravu referenčních vzorků. Validace byla založena na pokynech Evropské lékové agentury, které jsou primárně určeny pro xenobiotika, z důvodu absence ekvivalentních pokynů pro validaci metod zaměřených na endogenních látek. Úspěšně validovaná LC-MS/MS metoda pro stanovení 15 lidských žlučových kyselin byla následně využita v rámci klinické studie zaměřené na screening kohorty těhotných pro ověření možnosti detekce ICP. Zde se ukázalo, že metodou jsme schopni bezpečně rozlišit vzorky pacientek, u kterých byla diagnostikována ICP, navíc se ukázalo, že metodu by bylo možné aplikovat i k terapeutickému monitorování lékových hladin ursodiolu, léčiva používaného k farmakoterapii ICP. Metoda byla též využita ve dvou *in vivo* studiích prováděných na zvířecích modelech.

První studie se zabývala vlivem deficience transportéru MRP2 u potkanů na zhoršení estrogenu indukované cholestázy. Studií byly prokázány zvýšené koncentrace žlučových kyselin v plazmě současně se sníženou biliární sekrecí v případě současné indukované cholestázy a MRP2 deficience. MRP2 deficience je spojená s hyperbilirubinemií a v případě prokázání této diagnózy je doporučeno monitorovat také žlučové kyseliny jako časného markeru z důvodu možného rozvoje ICP.

Druhá studie se zabývala možným pozitivním terapeutickým účinkem podávání metforminu v případě rozvoje ICP u gravidních pacientek. Asi nejdůležitějším poznatkem studie je významné zvýšení plazmatických koncentrací žlučových kyselin po podání metforminu při estrogenu indukované cholestáze. Výsledek studie ukazuje na nutnost zvýšené opatrnosti u gravidních pacientek s gestačním diabetem, léčených metforminem, vzhledem k možným komplikacím v souvislosti s narušením homeostázy žlučových kyselin.

6. Citace

- [1] Guideline on bioanalytical method validation, European Medicines Agency, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 (2011) 1-23,.
- [2] D.W. Johnson, Contemporary clinical usage of LC/MS: analysis of biologically important carboxylic acids, *Clin Biochem* 38(4) (2005) 351-61.
- [3] R. Thakare, Y.S. Chhonker, N. Gautam, J.A. Alamoudi, Y. Alnouti, Quantitative analysis of endogenous compounds, *J Pharm Biomed Anal* 128 (2016) 426-437.
- [4] D. Wolrab, R. Jirasko, E. Cifkova, M. Horing, D. Mei, M. Chocholouskova, O. Peterka, J. Idkowiak, T. Hrnčiarova, L. Kuchar, R. Ahrends, R. Brumarova, D. Friedecky, G. Vivo-Truyols, P. Skrha, J. Skrha, R. Kucera, B. Melichar, G. Liebisch, R. Burkhardt, M.R. Wenk, A. Cazenave-Gassiot, P. Karasek, I. Novotny, K. Greplova, R. Hrstka, M. Holcapek, Lipidomic profiling of human serum enables detection of pancreatic cancer, *Nat Commun* 13(1) (2022) 124.
- [5] C. Nico, Quantitative determination of endogenous compounds in biological samples using chromatographic techniques, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 27(10) (2008) 924-933.
- [6] J.Y. Chiang, Bile acid metabolism and signaling, *Compr Physiol* 3(3) (2013) 1191-212.
- [7] D.W. Russell, The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis, *Annu Rev Biochem* 72 (2003) 137-74.
- [8] D. Sangaraju, Y. Shi, M. Van Parys, A. Ray, A. Walker, R. Caminiti, D. Milanowski, A. Jaochico, B. Dean, X. Liang, Robust and Comprehensive Targeted Metabolomics Method for Quantification of 50 Different Primary, Secondary, and Sulfated Bile Acids in Multiple Biological Species (Human, Monkey, Rabbit, Dog, and Rat) and Matrices (Plasma and Urine) Using Liquid Chromatography High Resolution Mass Spectrometry (LC-HRMS) Analysis, *J Am Soc Mass Spectrom* 32(8) (2021) 2033-2049.
- [9] M. Fuchs, Bile acid regulation of hepatic physiology: III. Regulation of bile acid synthesis: past progress and future challenges, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284(4) (2003) G551-7.
- [10] M. Funabashi, T.L. Grove, M. Wang, Y. Varma, M.E. McFadden, L.C. Brown, C. Guo, S. Higginbottom, S.C. Almo, M.A. Fischbach, A metabolic pathway for bile acid dehydroxylation by the gut microbiome, *Nature* 582(7813) (2020) 566-570.
- [11] T.M. Šarenac, M. Mikov, Bile Acid Synthesis: From Nature to the Chemical Modification and Synthesis and Their Applications as Drugs and Nutrients, *Front Pharmacol* 9 (2018) 939.
- [12] A.F. Hofmann, L.R. Hagey, Key discoveries in bile acid chemistry and biology and their clinical applications: history of the last eight decades, *J Lipid Res* 55(8) (2014) 1553-95.

- [13] F.M. Vaz, S. Ferdinandusse, Bile acid analysis in human disorders of bile acid biosynthesis, *Mol Aspects Med* 56 (2017) 10-24.
- [14] M.J. Monte, J.J. Marin, A. Antelo, J. Vazquez-Tato, Bile acids: chemistry, physiology, and pathophysiology, *World J Gastroenterol* 15(7) (2009) 804-16.
- [15] I. Björkhem, D. Lütjohann, U. Diczfalusy, L. Ståhle, G. Ahlborg, J. Wahren, Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation, *J Lipid Res* 39(8) (1998) 1594-600.
- [16] A. Di Ciaula, G. Garruti, R. Lunardi Baccetto, E. Molina-Molina, L. Bonfrate, D.Q. Wang, P. Portincasa, Bile Acid Physiology, *Ann Hepatol* 16(Suppl. 1: s3-105.) (2017) s4-s14.
- [17] J.Y. Chiang, Recent advances in understanding bile acid homeostasis, *F1000Res* 6 (2017) 2029.
- [18] A.W. Wolkoff, D.E. Cohen, Bile acid regulation of hepatic physiology: I. Hepatocyte transport of bile acids, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284(2) (2003) G175-9.
- [19] P. Hegyi, J. Maléth, J.R. Walters, A.F. Hofmann, S.J. Keely, Guts and Gall: Bile Acids in Regulation of Intestinal Epithelial Function in Health and Disease, *Physiol Rev* 98(4) (2018) 1983-2023.
- [20] P.A. Dawson, S.J. Karpen, Intestinal transport and metabolism of bile acids, *J Lipid Res* 56(6) (2015) 1085-99.
- [21] T. Li, U. Apte, Bile Acid Metabolism and Signaling in Cholestasis, Inflammation, and Cancer, *Adv Pharmacol* 74 (2015) 263-302.
- [22] D.D. Smith, K.M. Rood, Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy, *Clin Obstet Gynecol* 63(1) (2020) 134-151.
- [23] W. Jia, G. Xie, Bile acid-microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis, *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 15(2) (2018) 111-128.
- [24] J.Y.L. Chiang, J.M. Ferrell, Bile Acid Metabolism in Liver Pathobiology, *Gene Expr* 18(2) (2018) 71-87.
- [25] J.Y.L. Chiang, J.M. Ferrell, Up to date on cholesterol 7 alpha-hydroxylase (CYP7A1) in bile acid synthesis, *Liver Res* 4(2) (2020) 47-63.
- [26] J.Y. Chiang, Bile acids: regulation of synthesis, *J Lipid Res* 50(10) (2009) 1955-66.
- [27] D.a.J.G. Stamp, An Overview of Bile-Acid Synthesis, Chemistry and Function, *Issues in Toxicology* (2008).
- [28] L. Baiocchi, T. Zhou, S. Liangpunsakul, I. Lenci, F. Santopaolo, F. Meng, L. Kennedy, S. Glaser, H. Francis, G. Alpini, Dual Role of Bile Acids on the Biliary Epithelium: Friend or Foe?, *Int J Mol Sci* 20(8) (2019).

- [29] W.A. Alrefai, R.K. Gill, Bile acid transporters: structure, function, regulation and pathophysiological implications, *Pharm Res* 24(10) (2007) 1803-23.
- [30] Y. Shi, Y. Gao, M.V. Parys, D. Miller, D. Milanowski, B. Dean, X. Liang, Definitive profiling of plasma bile acids as potential biomarkers for human liver diseases using UPLC-HRMS, *Bioanalysis* 10(12) (2018) 917-932.
- [31] L. Yu, Y. Liu, S. Wang, Q. Zhang, J. Zhao, H. Zhang, A. Narbad, F. Tian, Q. Zhai, W. Chen, Cholestasis: exploring the triangular relationship of gut microbiota-bile acid-cholestasis and the potential probiotic strategies, *Gut Microbes* 15(1) (2023) 2181930.
- [32] Y. Shao, S. Chen, H. Li, Q. Tang, D. Xu, Maternal bile acid profile and subtype analysis of intrahepatic cholestasis of pregnancy, *Orphanet J Rare Dis* 16(1) (2021) 259.
- [33] M. Gagnon, J. Trottier, S.J. Weisnagel, C. Gagnon, A.M. Carreau, O. Barbier, A.S. Morisset, Bile acids during pregnancy: Trimester variations and associations with glucose homeostasis, *Health Sci Rep* 4(1) (2021) e243.
- [34] F. Z., Š. P., V. L., A. K., H. V., K. M., H. M., D. M., P. A., Intrahepatic cholestasis of pregnancy, *Czech Gynaecology* 78(3) (2013) 276-280.
- [35] T. Pusl, U. Beuers, Intrahepatic cholestasis of pregnancy, *Orphanet J Rare Dis* 2 (2007) 26.
- [36] J. Xiao, Z. Li, Y. Song, Y. Sun, H. Shi, D. Chen, Y. Zhang, Molecular Pathogenesis of Intrahepatic Cholestasis of Pregnancy, *Can J Gastroenterol Hepatol* 2021 (2021) 6679322.
- [37] F. Saint-Marcoux, F.L. Sauvage, P. Marquet, Current role of LC-MS in therapeutic drug monitoring, *Anal Bioanal Chem* 388(7) (2007) 1327-49.
- [38] C. Martin Uher and Miloš Hroch and Rozálie Peřinová and Radim Havelek and Jana Křoustková and Martina Řezáčová and Darina Muthná and Darja Koutová and Jiří Kuneš and Lucie, Semisynthetic derivatives of haemanthamine and their in vitro antiproliferative activity evaluation against a panel of human cell lines, *Arabian Journal of Chemistry* 15(5) (2022) 103746.
- [39] M. Uher, M. Mžik, J. Karasová, D. Herman, L. Čechová, A. Dlabková, A. Mrkvicová, M. Hroch, In vitro and in vivo metabolism of 3-quinuclidinyl benzilate by high-resolution mass spectrometry, *J Pharm Biomed Anal* 190 (2020) 113519.
- [40] P. Marquet, Is LC-MS suitable for a comprehensive screening of drugs and poisons in clinical toxicology?, *Ther Drug Monit* 24(1) (2002) 125-33.
- [41] H.H. Maurer, Perspectives of liquid chromatography coupled to low- and high-resolution mass spectrometry for screening, identification, and quantification of drugs in clinical and forensic toxicology, *Ther Drug Monit* 32(3) (2010) 324-7.

- [42] Z. Feng, J. Gao, X. Gao, L. Hua, X. Nie, Y. Sun, M. Wang, A Validated HPLC-MS/MS Method for Quantification of Methotrexate and Application for Therapeutic Drug Monitoring in Children and Adults with Non-Hodgkin Lymphoma, *Drug Des Devel Ther* 15 (2021) 4575-4583.
- [43] J. Qu, W.J. Jusko, R.M. Straubinger, Utility of cleavable isotope-coded affinity-tagged reagents for quantification of low-copy proteins induced by methylprednisolone using liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Anal Chem* 78(13) (2006) 4543-52.
- [44] M. Costanzo, M. Caterino, Targeted lipidomics data of COVID-19 patients, *Data Brief* 48 (2023) 109089.
- [45] A.E. Lewandowska, A. Fel, M. Thiel, P. Czaplewska, K. Łukaszuk, J.R. Wiśniewski, S. Ołdziej, Compatibility of Distinct Label-Free Proteomic Workflows in Absolute Quantification of Proteins Linked to the Oocyte Quality in Human Follicular Fluid, *Int J Mol Sci* 22(14) (2021).
- [46] S.L. Hansen, M.K.K. Nielsen, K. Linnet, B.S. Rasmussen, Simple implementation of muscle tissue into routine workflow of blood analysis in forensic cases - A validated method for quantification of 29 drugs in postmortem blood and muscle samples by UHPLC-MS/MS, *Forensic Sci Int* 325 (2021) 110901.
- [47] B. Yu, Y. Wang, Z. Geng, Y. Qu, J. Pan, Q. Zhai, Establishment and validation of analytical methods for 15 hazardous drugs by UPLC-Q/Orbitrap-HRMS, *Ann Transl Med* 10(12) (2022) 686.
- [48] F. Vincenti, C. Montesano, S. Pirau, A. Gregori, F. Di Rosa, R. Curini, M. Sergi, Simultaneous Quantification of 25 Fentanyl Derivatives and Metabolites in Oral Fluid by Means of Microextraction on Packed Sorbent and LC-HRMS/MS Analysis, *Molecules* 26(19) (2021).
- [49] D. Liu, Z. An, P. Li, Y. Chen, R. Zhang, L. Liu, J. He, Z. Abliz, A targeted neurotransmitter quantification and nontargeted metabolic profiling method for pharmacometabolomics analysis of olanzapine by using UPLC-HRMS, *RSC Adv* 10(31) (2020) 18305-18314.
- [50] P. Bhadwal, D. Dahiya, D. Shinde, K. Vaiphei, R.G.H. Math, V. Randhawa, N. Agnihotri, LC-HRMS based approach to identify novel sphingolipid biomarkers in breast cancer patients, *Sci Rep* 10(1) (2020) 4668.
- [51] A. Martín-Blázquez, C. Díaz, E. González-Flores, D. Franco-Rivas, C. Jiménez-Luna, C. Melguizo, J. Prados, O. Genilloud, F. Vicente, O. Caba, J. Pérez Del Palacio, Untargeted LC-HRMS-based metabolomics to identify novel biomarkers of metastatic colorectal cancer, *Sci Rep* 9(1) (2019) 20198.
- [52] D. Wolrab, R. Jirásko, E. Cífková, M. Höring, D. Mei, M. Chocholoušková, O. Peterka, J. Idkowiak, T. Hrnčiarová, L. Kuchař, R. Ahrends, R. Brumarová, D. Friedecký, G. Vivo-Truyols, P. Škrha, J. Škrha, R. Kučera, B. Melichar, G. Liebisch, R. Burkhardt, M.R. Wenk, A. Cazenave-Gassiot, P. Karásek, I. Novotný, K. Greplová, R. Hrstka, M. Holčapek, Lipidomic profiling of human serum enables detection of pancreatic cancer, *Nat Commun* 13(1) (2022) 124.

- [53] Bioanalytical Method Validation Guidance for Industry, Food and Drug Administration, (2018) 1-44,.
- [54] S. MahmoudianDehkordi, M. Arnold, K. Nho, S. Ahmad, W. Jia, G. Xie, G. Louie, A. Kueider-Paisley, M.A. Moseley, J.W. Thompson, L. St John Williams, J.D. Tenenbaum, C. Blach, R. Baillie, X. Han, S. Bhattacharyya, J.B. Toledo, S. Schafferer, S. Klein, T. Koal, S.L. Risacher, M.A. Kling, A. Motsinger-Reif, D.M. Rotroff, J. Jack, T. Hankemeier, D.A. Bennett, P.L. De Jager, J.Q. Trojanowski, L.M. Shaw, M.W. Weiner, P.M. Doraiswamy, C.M. van Duijn, A.J. Saykin, G. Kastenmüller, R. Kaddurah-Daouk, A.s.D.N.I.a.t.A.D.M. Consortium, Altered bile acid profile associates with cognitive impairment in Alzheimer's disease-An emerging role for gut microbiome, *Alzheimers Dement* 15(1) (2019) 76-92.
- [55] M. Camilleri, Bile Acid diarrhea: prevalence, pathogenesis, and therapy, *Gut Liver* 9(3) (2015) 332-9.
- [56] A. Lavelle, S. Nancey, J.M. Reimund, D. Laharie, P. Marteau, X. Treton, M. Allez, X. Roblin, G. Malamut, C. Oeuvray, N. Rolhion, X. Dray, D. Rainteau, A. Lamaziere, E. Gaudiard, J. Kirchgerner, L. Beaugerie, P. Seksik, L. Peyrin-Biroulet, H. Sokol, Fecal microbiota and bile acids in IBD patients undergoing screening for colorectal cancer, *Gut Microbes* 14(1) (2022) 2078620.
- [57] T. Rabbani, S.L. Guthery, R. Himes, B.L. Shneider, S. Harpavat, Newborn Screening for Biliary Atresia: a Review of Current Methods, *Curr Gastroenterol Rep* 23(12) (2021) 28.
- [58] K. Hasegawa, K. Minakata, M. Suzuki, O. Suzuki, The standard addition method and its validation in forensic toxicology, *Forensic Toxicology* 39(2) (2021) 311-333.
- [59] I. Bobeldijk, M. Hekman, J. de Vries-van der Weij, L. Coulier, R. Ramaker, R. Kleemann, T. Kooistra, C. Rubingh, A. Freidig, E. Verheij, Quantitative profiling of bile acids in biofluids and tissues based on accurate mass high resolution LC-FT-MS: compound class targeting in a metabolomics workflow, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 871(2) (2008) 306-13.
- [60] J.C. García-Cañaveras, M.T. Donato, J.V. Castell, A. Lahoz, Targeted profiling of circulating and hepatic bile acids in human, mouse, and rat using a UPLC-MRM-MS-validated method, *J Lipid Res* 53(10) (2012) 2231-2241.
- [61] J. Han, Y. Liu, R. Wang, J. Yang, V. Ling, C.H. Borchers, Metabolic profiling of bile acids in human and mouse blood by LC-MS/MS in combination with phospholipid-depletion solid-phase extraction, *Anal Chem* 87(2) (2015) 1127-36.
- [62] S. Mi, D.W. Lim, J.M. Turner, P.W. Wales, J.M. Curtis, Determination of Bile Acids in Piglet Bile by Solid Phase Extraction and Liquid Chromatography-Electrospray Tandem Mass Spectrometry, *Lipids* 51(3) (2016) 359-72.
- [63] M.J. de Paiva, H.C. Menezes, J.C. da Silva, R.R. Resende, Z.e.L. Cardeal, New method for the determination of bile acids in human plasma by liquid-phase microextraction using liquid chromatography-ion-trap-time-of-flight mass spectrometry, *J Chromatogr A* 1388 (2015) 102-9.

- [64] C. Steiner, A. von Eckardstein, K.M. Rentsch, Quantification of the 15 major human bile acids and their precursor 7 α -hydroxy-4-cholesten-3-one in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 878(28) (2010) 2870-80.
- [65] L. Luo, S. Schomaker, C. Houle, J. Aubrecht, J.L. Colangelo, Evaluation of serum bile acid profiles as biomarkers of liver injury in rodents, *Toxicol Sci* 137(1) (2014) 12-25.
- [66] J.J. Zheng, E.E. Shields, K.J. Snow, D.M. Nelson, T.V. Olah, M.D. Reily, D.G. Robertson, P.A. Shipkova, S.A. Stryker, B. Xin, D.M. Drexler, The utility of stable isotope labeled (SIL) analogues in the bioanalysis of endogenous compounds by LC-MS applied to the study of bile acids in a metabolomics assay, *Anal Biochem* 503 (2016) 71-8.
- [67] K. Kato, S. Jingu, N. Ogawa, S. Higuchi, Determination of pibutidine metabolites in human plasma by LC-MS/MS, *J Pharm Biomed Anal* 24(2) (2000) 237-49.
- [68] M.M. Khamis, D.J. Adamko, A. El-Aneed, Strategies and Challenges in Method Development and Validation for the Absolute Quantification of Endogenous Biomarker Metabolites Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Mass Spectrom Rev* 40(1) (2021) 31-52.
- [69] L. Shuang Zhao and Liang, Chemical derivatization in LC-MS-based metabolomics study, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 131 (2020) 115988.
- [70] L. Ye, S. Liu, M. Wang, Y. Shao, M. Ding, High-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of bile acid profiles in serum of women with intrahepatic cholestasis of pregnancy, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 860(1) (2007) 10-7.
- [71] A. Shafaei, J. Rees, C.T. Christophersen, A. Devine, D. Broadhurst, M.C. Boyce, Extraction and quantitative determination of bile acids in feces, *Anal Chim Acta* 1150 (2021) 338224.
- [72] S.J. Shiffka, J.W. Jones, L. Li, A.M. Farese, T.J. MacVittie, H. Wang, P.W. Swaan, M.A. Kane, Quantification of common and planar bile acids in tissues and cultured cells, *J Lipid Res* 61(11) (2020) 1524-1535.
- [73] W.J. Griffiths, J. Sjövall, Bile acids: analysis in biological fluids and tissues, *J Lipid Res* 51(1) (2010) 23-41.
- [74] M. Scherer, C. Gnewuch, G. Schmitz, G. Liebisch, Rapid quantification of bile acids and their conjugates in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877(30) (2009) 3920-5.
- [75] J. SJOVALL, On the separation of bile acids by partition chromatography, *Acta Physiol Scand* 29(2-3) (1953) 232-40.
- [76] L. Lepri, D. Heimler, P.G. Desideri, Reversed-phase high-performance thin-layer chromatography of free and conjugated bile acids, *J Chromatogr* 288(2) (1984) 461-8.

- [77] T. Momose, M. Mure, T. Iida, J. Goto, T. Nambara, Method for the separation of the unconjugates and conjugates of chenodeoxycholic acid and deoxycholic acid by two-dimensional reversed-phase thin layer chromatography with methyl beta-cyclodextrin, *J Chromatogr A* 811(1-2) (1998) 171-80.
- [78] M. Aso, K. Miyazaki, J. Yanagisawa, F. Nakayama, Bile acid metabolism in isolated rat hepatocytes: studied by gas-liquid chromatography-mass spectrometry-selected ion monitoring, *J Biochem* 101(6) (1987) 1429-36.
- [79] T. Okishio, P.P. Nair, M. Gordon, Studies on bile acids: The microquantitative separation of cellular bile acids by gas-liquid chromatography, *Biochem J* 102(3) (1967) 654-9.
- [80] P. Eneroth, B. Gordon, R. Ryhage, J. Sjövall, Identification of mono- and dihydroxy bile acids in human feces by gas-liquid chromatography and mass spectrometry, *J Lipid Res* 7(4) (1966) 511-23.
- [81] C.A. Bloch, J.B. Watkins, Determination of conjugated bile acids in human bile and duodenal fluid by reverse-phase high-performance liquid chromatography, *J Lipid Res* 19(4) (1978) 510-3.
- [82] M.J. Armstrong, M.C. Carey, The hydrophobic-hydrophilic balance of bile salts. Inverse correlation between reverse-phase high performance liquid chromatographic mobilities and micellar cholesterol-solubilizing capacities, *J Lipid Res* 23(1) (1982) 70-80.
- [83] S. Onishi, S. Itoh, Y. Ishida, Assay of free and glycine- and taurine-conjugated bile acids in serum by high-pressure liquid chromatography by using post-column reaction after group separation, *Biochem J* 204(1) (1982) 135-9.
- [84] L. Frommherz, A. Bub, E. Hummel, M.J. Rist, A. Roth, B. Watzl, S.E. Kulling, Age-Related Changes of Plasma Bile Acid Concentrations in Healthy Adults--Results from the Cross-Sectional KarMeN Study, *PLoS One* 11(4) (2016) e0153959.
- [85] X. Zhao, W. Zhang, P. Vig, C. Kostrub, K.D.R. Setchell, Serum Bile Acid Profiling and Mixed Model Analysis Reveal Biomarkers Associated with Pruritus Reduction in Maralixibat-Treated Patients with BSEP Deficiency, *Metabolites* 12(10) (2022).
- [86] M. Axelson, A. Aly, J. Sjövall, Levels of 7 alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one in plasma reflect rates of bile acid synthesis in man, *FEBS Lett* 239(2) (1988) 324-8.
- [87] S.S. Rossi, J.L. Converse, A.F. Hofmann, High pressure liquid chromatographic analysis of conjugated bile acids in human bile: simultaneous resolution of sulfated and unsulfated lithocholyl amidates and the common conjugated bile acids, *J Lipid Res* 28(5) (1987) 589-95.
- [88] Y. Liu, Z. Rong, D. Xiang, C. Zhang, D. Liu, Detection technologies and metabolic profiling of bile acids: a comprehensive review, *Lipids Health Dis* 17(1) (2018) 121.
- [89] X. Zhao, Z. Liu, F. Sun, L. Yao, G. Yang, K. Wang, Bile Acid Detection Techniques and Bile Acid-Related Diseases, *Front Physiol* 13 (2022) 826740.

- [90] A. Roda, C. Cerrè, P. Simoni, C. Polimeni, C. Vaccari, A. Pistillo, Determination of free and amidated bile acids by high-performance liquid chromatography with evaporative light-scattering mass detection, *J Lipid Res* 33(9) (1992) 1393-402.
- [91] Y. Shi, J. Xiong, D. Sun, W. Liu, F. Wei, S. Ma, R. Lin, Simultaneous quantification of the major bile acids in artificial Calculus bovis by high-performance liquid chromatography with precolumn derivatization and its application in quality control, *J Sep Sci* 38(16) (2015) 2753-62.
- [92] C. John, P. Werner, A. Worthmann, K. Wegner, K. Tödter, L. Scheja, S. Rohn, J. Heeren, M. Fischer, A liquid chromatography-tandem mass spectrometry-based method for the simultaneous determination of hydroxy sterols and bile acids, *J Chromatogr A* 1371 (2014) 184-95.
- [93] S. Perwaiz, B. Tuchweber, D. Mignault, T. Gilat, I.M. Yousef, Determination of bile acids in biological fluids by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *J Lipid Res* 42(1) (2001) 114-9.
- [94] T. IWATA, K. YAMASAKI, ENZYMATIC DETERMINATION AND THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY OF BILE ACIDS IN BLOOD, *J Biochem* 56 (1964) 424-31.
- [95] X. Qiao, M. Ye, C.F. Liu, W.Z. Yang, W.J. Miao, J. Dong, D.A. Guo, A tandem mass spectrometric study of bile acids: interpretation of fragmentation pathways and differentiation of steroid isomers, *Steroids* 77(3) (2012) 204-11.
- [96] A. Oyane, H.M. Kim, T. Furuya, T. Kokubo, T. Miyazaki, T. Nakamura, Preparation and assessment of revised simulated body fluids, *J Biomed Mater Res A* 65(2) (2003) 188-95.
- [97] R. Bonfiglio, R.C. King, T.V. Olah, K. Merkle, The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds, *Rapid Commun Mass Spectrom* 13(12) (1999) 1175-1185.
- [98] T. Singtoroj, J. Tarning, A. Annerberg, M. Ashton, Y. Bergqvist, N.J. White, N. Lindegardh, N.P. Day, A new approach to evaluate regression models during validation of bioanalytical assays, *J Pharm Biomed Anal* 41(1) (2006) 219-27.
- [99] C. Williamson, V. Geenes, Intrahepatic cholestasis of pregnancy, *Obstet Gynecol* 124(1) (2014) 120-133.
- [100] K. Jemnitz, K. Heredi-Szabo, J. Janossy, E. Ioja, L. Vereczkey, P. Krajcsi, ABCC2/Abcc2: a multispecific transporter with dominant excretory functions, *Drug Metab Rev* 42(3) (2010) 402-36.
- [101] J.G. Douglas, G.J. Beckett, I.W. Percy-Robb, N.D. Finlayson, Bile salt transport in the Dubin-Johnson syndrome, *Gut* 21(10) (1980) 890-3.

- [102] T. Togawa, T. Mizuochi, T. Sugiura, H. Kusano, K. Tanikawa, T. Sasaki, F. Ichinose, S. Kagimoto, T. Tainaka, H. Uchida, S. Saitoh, Clinical, Pathologic, and Genetic Features of Neonatal Dubin-Johnson Syndrome: A Multicenter Study in Japan, *J Pediatr* 196 (2018) 161-167.e1.
- [103] N. Junge, I. Goldschmidt, J. Wiegandt, C. Leiskau, F. Mutschler, T. Laue, J. Ohlendorf, A. Stalke, B. Hartleben, J. Stindt, V. Keitel, U. Baumann, E.D. Pfister, Dubin-Johnson Syndrome as Differential Diagnosis for Neonatal Cholestasis, *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 72(5) (2021) e105-e111.
- [104] S. Sookoian, G. Castaño, A. Burgueño, T.F. Gianotti, C.J. Pirola, Association of the multidrug-resistance-associated protein gene (ABCC2) variants with intrahepatic cholestasis of pregnancy, *J Hepatol* 48(1) (2008) 125-32.
- [105] P.H. Dixon, M. Sambrotta, J. Chambers, P. Taylor-Harris, A. Syngelaki, K. Nicolaides, A.S. Knisely, R.J. Thompson, C. Williamson, An expanded role for heterozygous mutations of ABCB4, ABCB11, ATP8B1, ABCC2 and TJP2 in intrahepatic cholestasis of pregnancy, *Sci Rep* 7(1) (2017) 11823.
- [106] J. Kondrackiene, L. Kupcinskas, Intrahepatic cholestasis of pregnancy-current achievements and unsolved problems, *World J Gastroenterol* 14(38) (2008) 5781-8.
- [107] V. Geenes, A. Lövgren-Sandblom, L. Benthin, D. Lawrance, J. Chambers, V. Gurung, J. Thornton, L. Chappell, E. Khan, P. Dixon, H.U. Marschall, C. Williamson, The reversed fetomaternal bile acid gradient in intrahepatic cholestasis of pregnancy is corrected by ursodeoxycholic acid, *PLoS One* 9(1) (2014) e83828.
- [108] A. Elfituri, A. Ali, H. Shehata, Managing Recurring Obstetric Cholestasis With Metformin, *Obstet Gynecol* 128(6) (2016) 1320-1323.