

ABSTRAKT

Analýza oxidativního poškození DNA volnými radikály

Diplomová práce

Nela Váňová

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické chemie a kontroly léčiv

Volné radikály a reaktivní formy kyslíku (ROS) jsou vysoce reaktivní molekuly schopné modifikovat biomolekuly včetně DNA. 5',8-cyklo-2'-deoxynukleosidy představují skupinu DNA lézí vyznačující se současným poškozením sacharidové složky a nukleové báze stejného purinového nukleosidu a společně s 8-oxo-2'-deoxypuriny patří do hlavní skupiny lézí vznikajících atakem volných radikálů (včetně hydroxylového radikálu).

Kvantifikace oxidativně a volnými radikály způsobených DNA lézí jako biomarkerů oxidačního stresu hraje významnou roli ve studiu jejich vlivu na lidské zdraví a nemoci. Pro kvantifikaci těchto DNA lézí ve vzorcích ozařovaných gamma paprsky bude použito spojení tandemové spojení hmotnostní spektrometrie a vysoce účinné kapalinové chromatografie (LC/MS/MS). Před nástřikem do LC/MS/MS, ozářené vzorky podrobené enzymatickému štěpení za účelem získání volných nukleosidů musí být odsoleny a DNA léze musí být separovány od nepoškozených nukleosidů.

Pro separaci (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoxyadenosinu; (5'R)-5',8-cyklo-2'-deoxyguanosinu; (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoxyadenosinu; (5'S)-5',8-cyklo-2'-deoxyguanosinu; 8-oxo-2'-deoxyguanosinu a 8-oxo-2'-deoxyadenosinu od 2'-deoxyadenosinu; 2'-deoxycytidinu; 2'-deoxyguanosinu a 2'-deoxythymidinu ve vodných roztocích (bez solí) a pro sbírání separovaných DNA lézí byla vyvinuta HPLC/UV metoda. Analyty byly separovány pomocí Phenomenex LUNA C18 (2) [150x4,6 mm; 5 μ m] analytické kolony chráněné Phenomenex LUNA C18 (2) [30 x4,6 mm; 5 μ m] předkolonou s použitím gradientové eluce, acetonitrilu (ACN) a 2 mM mravenčanu sodného jako mobilní fáze. Průtok mobilní fáze byl 1 mL/min. Pro detekci byl použit UV-detektor s detekcí při 260 nm. Separované DNA léze byly sbírány pomocí Gilson FC 203B frakčního kolektoru v daných časových intervalech.

Výtěžnost HPLC byla $100 \pm 2\%$; výtěžnost z následné lyofilizace byla v intervalu od 77% do 103%, nicméně další a přesnější data budou získána z LC/MS/MS analýzy. Tato metoda bude dále aktualizována pro vzorky obsahující soli ve stejné koncentraci jako v reálných vzorcích.