

## Abstrakt a klíčová slova

Ačkoliv mají reaktivní formy kyslíku a dusíku zásadní význam pro fyziologické procesy probíhající v živém organismu, jejich nadměrná produkce vyvolaná působením vnitřních i vnějších vlivů může vést k závažnému narušení redoxní homeostázy, poškození intracelulárních komponent a tím zásadně ovlivnit jejich funkci nebo dokonce indukovat buněčnou smrt. Oxidační stres patří mezi významné mechanismy toxického působení chemických látek včetně léčiv a může tak přispívat k rozvoji jejich závažných nežádoucích účinků. Vzhledem k nízkému počtu studií, zabývajících se sledováním oxidačního stresu po expozici oximovým reaktivátorům acetylcholinesterasy (AChE) *in vitro* a *in vivo*, není vztah mezi toxicitou těchto léčiv a tvorbou specifických markerů oxidativního poškození biomolekul stále zcela objasněn. Pro posouzení antioxidačních/prooxidačních účinků léčiv byla vyvinuta metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostně spektrometrickou detekcí (LC-MS/MS) pro simultánní stanovení dvou biomarkerů oxidačního stresu, malondialdehydu (MDA) a 3-nitrotyrosinu (3-NT), z biologických matric. V rámci validace této LC-MS/MS metody bylo dosaženo přijatelné selektivity, správnosti, krátkodobé i dlouhodobé přesnosti a návratnosti pracovního postupu a nebyly pozorovány žádné významné maticové efekty (odchylky < 15 %). Metodou lze markery v biologickém materiálu stanovovat v rozsahu 0,025 až 4,00 nmol.mg<sup>-1</sup> proteinu pro MDA a 0,0125 – 2,00 nmol.mg<sup>-1</sup> pro 3-NT. Dále byla zavedena a optimalizována chromatografická metoda se spektrofotometrickou detekcí (HPLC-UV/VIS) pro hodnocení thiolové redoxní rovnováhy v podobě volných thiolů (NP-SH) a disulfidů (NP-SS-NP). Metody byly úspěšně aplikovány na biologické vzorky pocházející z *in vitro* experimentu, kde byly buňky HepG2 linie inkubovány s pěti klinicky nejvýznamnějšími reaktivátory AChE: obidoximem (LüH-6), asoximem (HI-6), pralidoximem (2-PAM), trimedoximem (TMB-4) a metoximem (MMB-4) po dobu 1, 4 a 24 hodin. Na základě získaných výsledků byla vyhodnocena schopnost oximů indukovat oxidativní/nitrosativní stres *in vitro* v následujícím pořadí: LüH-6 > TMB-4 > MMB-4 > 2-PAM > HI-6. S ohledem na chemickou strukturu použitých reaktivátorů AChE se jako intenzivnější induktory oxidačního stresu jevíly biskvarterní oximy, obsahující ve své molekule dvě oximové skupiny v poloze 4 pyridiniového jádra (LüH-6, TMB-4 a MMB-4). Zavedené LC-MS/MS a HPLC-UV/VIS metody byly dále použity pro monitorování ukazatelů oxidačního stresu v mozkomíšním moku pacientů s diagnostikovanou Alzheimerovou chorobou. Hodnocen byl vliv memantinu na ukazatele oxidačního stresu ve srovnání s kontrolní skupinou, jež touto terapií léčena nebyla. Podávání

memantinu vedlo k poklesu hladin 3-NT a nárůstu koncentrace NP-SH, přičemž hladiny ostatních markerů nebyly významně ovlivněny.

**Klíčová slova:** oxidační stres, nitrosativní stres, organofosfáty, nervově paralytické látky, oximy, reaktivátory acetylcholin esterázy, malondialdehyd, 3-nitrotyrosin, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie, Alzheimerova choroba, memantin.