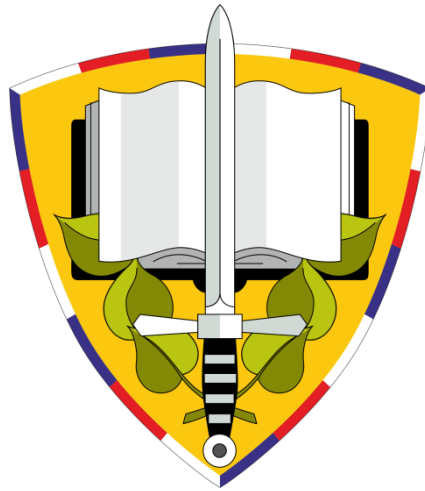


UNIVERZITA OBRANY
FAKULTA VOJENSKÉHO ZDRAVOTNICTVÍ

Doktorský studijní program TOXIKOLOGIE



DISERTAČNÍ PRÁCE

**Název: SLEDOVÁNÍ BIOMARKERŮ OXIDAČNÍHO
STRESU HPLC METODAMI**

Zpracoval: Mgr. Nela Váňová

Školitel: plk. doc. PharmDr. Daniel Jun, Ph.D.

HRADEC KRÁLOVÉ 2019

Písenné zadání disertační práce

Mgr. Nela VÁŇOVÁ

Stanovení tématu disertační práce

Studentka: Mgr. Nela VÁŇOVÁ

Stanovené téma disertační práce: Sledování markerů oxidačního stresu HPLC metodami

Klíčová slova v ČJ (5-10): in vivo, hexanoyl-lysin, HPLC, 4-hydroxynonenal, chromatografie, malondialdehyd, markery, oxidační stres, 8-oxo-2'-deoxyguanosin, toxicita

Klíčová slova v AJ (5-10): chromatography, in vivo, hexanoyl-lysine, HPLC, 4-hydroxynonenal, malondialdehyde, markers, oxidative stress, 8-oxo-2'-deoxyguanosine, toxicity

Stručná anotace disertační práce v ČJ (v rozsahu 5 řádků):

V rámci dizertační práce budou vypracovány metody pro hodnocení vybraných markerů oxidačního stresu (8-oxo-2'-deoxyguanosin, hexanoyl-lysin, 4-hydroxynonenal, malondialdehyd apod.) s využitím HPLC instrumentace. Metody budou použity pro stanovení markerů v biologickém materiálu za účelem hodnocení toxického působení vybraných látek a poškození organismu v průběhu experimentů.

Stručná anotace disertační práce v AJ (v rozsahu 5 řádků):

Within doctoral thesis methods for evaluation of selected oxidative stress markers (8-oxo-2'-deoxyguanosine, hexanoyl-lysine, 4-hydroxynonenal, malondialdehyde etc.) using HPLC instrumentation will be developed. Methods will be used for the determination of markers in biological samples with the aim to evaluate toxicity of selected compounds and organism damage during experiments.

Stanovisko oborové rady:

Souhlasím – ~~nesouhlasím~~*/ se stanoveným tématem disertační práce.

27. 11. 2013
.....
datum

.....
předseda oborové rady

Schvaluji.

3. XII. 2013
.....
datum

přik. doc. MUDr. JIŘÍ PÁRAL, Ph.D.
.....
děkan

*/ nehodící se škrtněte

Poděkování

Děkuji plk. doc. PharmDr. Danielu Junovi, Ph.D. za vedení mé disertační práce a také kolegům z Katedry toxikologie a vojenské farmacie za pomoc v průběhu celého doktorského studia na Fakultě vojenského zdravotnictví.

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto disertační práci vypracovala pod vedením školitele samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále prohlašuji, že tato disertační práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Hradci Králové 25. 3. 2019

Mgr. Nela Váňová

.....

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 antioxidantních/prooxidantních 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 matricové efekty (odchylky < 15 %). Metodou lze markery v biologickém materiálu stanovit v rozsahu 0,025 až 4,00 nmol.mg⁻¹ proteinu pro MDA a 0,0125 – 2,00 nmol.mg⁻¹ 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 jeví 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.

Abstract and keywords

Although reactive oxygen and nitrogen species have a fundamental role in physiological processes occurring in living organisms, their overproduction induced by endogenous and/or exogenous sources may lead to serious imbalance in redox homeostasis, damage to intracellular components and thus, dramatically alter their function or even trigger cell death. Oxidative stress is believed to be very important mechanism of toxicity of xenobiotics, including drugs, and may be responsible for the development of their unwanted side effects. Considering a very low number of studies evaluating oxidative stress after the treatment with oxime reactivators of acetylcholinesterase (AChE) *in vivo* and *in vitro*, the relationship between their toxicity and generation of specific biomarkers of oxidative damage is not still fully understood. In order to monitor antioxidant/prooxidant properties of drugs, high performance liquid chromatography method coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for simultaneous determination of two biomarkers of oxidative stress, malondialdehyde (MDA) and 3-nitrotyrosine (3-NT), in biological matrices was developed. Validation of this LC-MS/MS method demonstrated the acceptable appreciable selectivity, accuracy, intra- and interday precision, and recovery of sample processing (deviations < 15%). The method is applicable for determination of MDA and 3-NT in biological samples in ranges from 0.025 to 4.00 nmol/mg and 0.0125 to 2.00 nmol/mg, respectively. Additionally, chromatographic method with spectrophotometric detection (HPLC-UV/VIS) was established and optimized for the examination of thiol redox state represented by non-protein thiols (NP-SH) and disulfides (NP-SS-NP). Chromatographic methods were subsequently applied on samples obtained from *in vitro* experiment with HepG2 cells exposed to five clinically most relevant AChE reactivators: obidoxime (LüH-6), asoxime (HI-6), pralidoxime (2-PAM), trimedoxime (TMB-4), and metoxime (MMB-4) for 1, 4 and 24 hours. Based on the results, the ability of selected oximes to induce oxidative/nitrosative stress *in vitro* was in the following order: LüH-6 > TMB-4 > MMB-4 > 2-PAM > HI-6. Regarding the chemical structure of these reactivators, bisquarternary oximes bearing two oxime groups at position 4 of pyridinium rings (LüH-6, TMB-4 and MMB-4) appeared to induce more intensive oxidative/nitrosative stress. The LC-MS/MS and HPLC-UV/VIS methods were further used for determination of oxidative stress biomarkers in cerebrospinal fluid collected from patients diagnosed with Alzheimer disease. Oxidative stress biomarkers were evaluated in patients treated with memantine

in comparison to control group without this therapy. Memantine therapy decreased 3-NT and increased NP-SH concentrations in cerebrospinal fluid, whereas levels of the remaining markers were not significantly changed.

Keywords: oxidative stress, nitrosative stress, organophosphates, nerve agents, oximes, reactivators of acetylcholinesterase, malondialdehyde, 3-nitrotyrosine, high performance liquid chromatography, mass spectrometry, Alzheimer disease, memantine.

Obsah

Písenné zadání disertační práce	2
Poděkování.....	3
Čestné prohlášení	4
Abstrakt a klíčová slova.....	5
Abstract and keywords.....	7
Seznam použitých zkratk	13
Seznam obrázků	17
Seznam tabulek	19
1. Úvod.....	21
1.1. Oxidační stres a jeho hodnocení	21
1.1.1. Antioxidační systém na bázi thiolů	23
1.1.2. Oxidativní poškození lipidů	24
1.1.3. Oxidativní poškození proteinů	26
1.1.4. Oxidativní poškození DNA.....	27
1.2. Role oxidačního stresu u otrav organofosfáty.....	28
1.2.1. Mechanismy oxidačního stresu u akutních otrav OP	29
1.2.2. Mechanismy oxidačního stresu u subchronických a chronických otrav OP.....	31
1.3. Oxidační stres a antidotní terapie otrav organofosfáty	32
1.3.1. Atropin	32
1.3.2. Reaktivátory AChE	33
1.3.3. Reaktivátory AChE v terapii otrav organofosfáty	36
1.3.4. Benzodiazepiny	40
1.3.5. Alternativní přístupy v terapii otrav OP.....	40
1.4. Oxidační stres v patofyziologii onemocnění.....	42
1.4.1. Oxidační stres a Alzheimerova choroba	42
2. Cíl práce	44

3.	Materiál a metodika	45
3.1.	Chemikálie a kultivační média.....	45
3.2.	Buněčná kultura	45
3.3.	Sterilní plast a spotřební materiál.....	46
3.4.	Instrumentace	46
3.5.	Vývoj LC-MS/MS metody pro simultánní stanovení MDA a 3-NT z HepG2 buněčné matrice a zavedení metody pro hodnocení thiolové redoxní rovnováhy pomocí HPLC-UV/VIS.....	47
3.5.1.	Kultivace a pasážování buněk.....	47
3.5.2.	Indukce oxidačního stresu.....	47
3.5.3.	Stanovení buněčné viability pomocí MTT testu.....	48
3.5.4.	Zpracování buněčné pelety	48
3.5.5.	Roztoky pro přípravu vzorků k chromatografické analýze.....	49
3.5.6.	Úprava vzorku pro stanovení MDA a 3-NT	50
3.5.7.	LC-MS/MS podmínky pro stanovení MDA a 3-NT.....	50
3.5.8.	Kvantitativní analýza pomocí LC-MS/MS	51
3.5.9.	Validace LC-MS/MS metody pro stanovení MDA a 3-NT	52
3.5.10.	Úprava vzorků pro stanovení NP-SH.....	54
3.5.11.	Úprava vzorků pro stanovení NP-SS-NP	54
3.5.12.	HPLC-UV/VIS podmínky pro stanovení NP-SH a NP-SS-NP	55
3.5.13.	Kvantitativní analýza pomocí HPLC-UV	55
3.5.14.	Stanovení proteinového obsahu	55
3.5.15.	Vyhodnocení a statistická analýza	56
3.6.	<i>In vitro</i> hodnocení oxidačního stresu u oximových reaktivátorů AChE.....	56
3.6.1.	Oximové reaktivátory AChE	56
3.6.2.	Kultivace a pasážování buněk.....	57
3.6.3.	Indukce oxidačního stresu reaktivátory AChE	57
3.6.4.	Stanovení buněčné viability pomocí MTT testu.....	57

3.6.5.	Stanovení proteinového obsahu	58
3.6.6.	Stanovení MDA a 3-NT	58
3.6.7.	Stanovení NP-SH a NP-SS-NP	58
3.6.8.	Vyhodnocení a statistická analýza	58
3.7.	Stanovení BOS z mozkomíšního moku	59
3.7.1.	Odběr vzorků.....	59
3.7.2.	Stanovení MDA, 3-NT, NP-SH a NP-SS-NP	59
3.7.3.	Vyhodnocení a statistická analýza	60
4.	Výsledky	61
4.1.	Vývoj LC-MS/MS metody pro simultánní stanovení MDA a 3-NT z HepG2 buněčné matrice a zavedení metody pro hodnocení thiolové redoxní rovnováhy pomocí HPLC-UV/VIS.....	61
4.1.1.	Úprava vzorků pro stanovení MDA a 3-NT	61
4.1.2.	LC-MS/MS podmínky pro stanovení MDA a 3-NT.....	62
4.1.3.	Kvantitativní analýza pomocí LC-MS/MS	64
4.1.4.	Validace LC-MS/MS metody pro stanovení MDA a 3-NT	65
4.1.5.	Úprava vzorků pro stanovení NP-SH a NP-SS-NP	70
4.1.6.	HPLC podmínky pro stanovení NP-SH a NP-SS-NP	71
4.1.7.	Kvantitativní analýza pomocí HPLC-UV/VIS	71
4.1.8.	MTT test.....	72
4.1.9.	Stanovení proteinového obsahu	72
4.1.10.	Stanovení produktů oxidačního a nitrosativního stresu v HepG2 buněčné matrici po expozici <i>t</i> -BOOH	73
4.2.	<i>In vitro</i> hodnocení oxidačního stresu u oximových reaktivátorů AChE.....	78
4.2.1.	MTT test.....	78
4.2.2.	Stanovení proteinového obsahu	79
4.2.3.	Kvantifikace NP-SH a NP-SS-NP pomocí HPLC-UV/VIS	79
4.2.4.	Stanovení MDA, 3-NT, NP-SH a NP-SS-NP	80

4.3.	Stanovení BOS z mozkomíšního moku	84
4.3.1.	Stanovení BOS z mozkomíšního moku	84
5.	Diskuze.....	86
5.1.	Vývoj metody pro simultánní stanovení MDA a 3-NT z HepG2 buněčné matrice a zavedení metody pro hodnocení thiolové redoxní rovnováhy pomocí HPLC-UV/VIS.....	86
5.1.1.	Vývoj LC-MS/MS metody a úprava biologických vzorků pro stanovení MDA a 3-NT	86
5.1.2.	HPLC-UV/VIS metoda a úprava vzorků pro stanovení NP-SH a NP-SS-NP	88
5.1.3.	Stanovení produktů oxidačního a nitrosativního stresu v HepG2 buněčné matrici po expozici <i>t</i> -BOOH	89
5.2.	In vitro hodnocení oxidačního stresu u oximových reaktivátorů AChE.....	90
5.3.	Stanovení BOS z mozkomíšního moku	94
6.	Přínos práce.....	96
7.	Závěr	97
	Reference	98

Seznam použitých zkratk

[¹³ C ₉]3-NT	3-nitro-L-tyrosin- ¹³ C ₉
2-PAM	pralidoxim
3-NT	3-nitrotyrosin
8o2'dG	8-oxo-2'deoxyguanosin
AA	kyselina octová
ACN	acetonitril
AD	Alzheimerova choroba
ADDL	oligomery amyloidu beta
AGEs	konečné produkty pokročilé glykace
ACh	acetylcholin
AChE	acetylcholinesterasa
A _{IS}	plocha píku vnitřního standardu
AmA	octan amonný
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
A _s	plocha píku standardu
A _{s0}	plocha píku pro endogenní hladinu analytu
A _{sc}	celková plocha píku v kalibračním standardu
Aβ	amyloid beta peptid
BOS	biomarkery oxidačního stresu
BSA	hovězí sérový albumin
Ca ²⁺	vápenaté ionty
CAT	katalasa
CID	kolizní energie
CNS	centrální nervová soustava
CuZnSOD	CuZn-superoxiddismutasa
CV	variační koeficient
DCFH-DA	2,7-dichlordihydrofluorescein-diacetát
DHE	dihydroethidium
DMEM ^a	Dulbecco's Modified Eagle's Medium kultivační medium
DMEM ^b	Dulbecco's Modified Eagle's Medium kultivační medium bez fenolové červeně
DMSO	dimethylsulfoxid

DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
DNTB	kyselina 5,5'-dithiobis(2-nitro-benzoová)
DPPH	1,1-difenyl-2-pikrylhydrazil
ETC	elektron transportní řetězec
EtOH	etanol
FA	kyselina mravenčí
FBS	fetální bovinní sérum
GABA	γ -aminomáselná kyselina
GLA	glutaraldehyd
GPx	glutathion peroxidasa
GR	glutathionreduktasa
GS	gentamicin-sulfát
GSH	redukovaný glutathion
GSSG	oxidovaný glutathion
H ₂ O ₂	peroxid vodíku
HCl	kyselina chlorovodíková
HepG2	buňky lidského hepatocelulárního karcinomu
HI-6	asoxim
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
i.m.	intramuskulární
IMS	intermediální syndrom
i.p.	intraperitoneální
IS	vnitřní standard
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LD ₅₀	střední smrtelná dávka
IC ₅₀	koncentrace látky způsobující 50% inhibici
LMWA	nízkomolekulární antioxidanty
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
LüH-6	obidoxim
MDA	malondialdehyd
MDA-TBA	komplex malondialdehydu s kyselinou thiobarbiturovou
MDA-DNPH	komplex malondialdehydu s 2,4-dinitrofenylhydrazinem

ME	matricové efekty
MeOH	metanol
MF	mobilní fáze
MMB-4	metoxim
MnSOD	Mn-superoxiddismutasa
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyyl-tetrazolium bromid
NaBH ₄	borohydrid sodný
NAC	N-acetylcystein
NaOH	hydroxid sodný
NMDA	N-methyl-D-aspartát
NO	oxid dusný
-NO ₂	nitroskupina
NOS	NO-synthasa
NPL	nervově paralytické látky
NP-SH	neproteinové thioly
NP-SS-NP	proteinové disulfidy
O ₂	kyslík
O ₂ [•]	superoxidový radikál
OH [•]	hydroxylový radikál
ONOO ⁻	peroxynitrit
OP	organofosfáty
OPIDN	organofosfáty indukovaná opožděná neuropatie
PABA	<i>p</i> -aminobenzoová kyselina
PBS	solný fosfátový pufr pro buněčnou kultivaci
PBS*	solný fosfátový pufr ve formě tablet
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPM	otáček za minutu
R-SH+TNB	addukt thiolu a kyseliny 5-thio-2-nitrobenzoové
s.c.	subkutánní
SD	směrodatná odchylka
SOD	superoxiddismutasa
SPE	extrakce na tuhé fázi
SRM	monitorování vybraných reakcí

TBA	kyselina thiobarbiturová
TBARS	substance reagující s kyselinou thiobarbiturovou
<i>t</i> -BOOH	<i>tert</i> -butylhydroperoxid
TCA	trichloroctová kyselina
TD	terapeutická dávka
TMB-4	trimedoxim
TNB	5-thio-2-nitrobenzoová kyselina
TSPO	specifický benzodiazepinový receptor
UV	ultrafialová oblast elektromagnetického záření
VIS	viditelná oblast elektromagnetického záření

Seznam obrázků

- Obrázek č. 1:** Zdroje superoxidového radikálu uvnitř mitochondriálního elektronového transportního řetězce (str. 22)
- Obrázek č. 2:** Princip stanovení thiolů a disulfidů pomocí Ellmanova činidla (str. 24)
- Obrázek č. 3:** Vznik malondialdehydu z polynenasycené mastné kyseliny radikálovou reakcí (str. 25)
- Obrázek č. 4:** Derivatizace malondialdehydu (str. 26)
- Obrázek č. 5:** Vznik 3-nitrotyrosinu působením nitračního činidla na molekulu tyrosinu (str. 27)
- Obrázek č. 6:** Reakce 2'-deoxyguanosinu s hydroxylovým radikálem (str. 28)
- Obrázek č. 7:** Derivatizace malondialdehydu a glutaraldehydu pomocí 2,4-dinitrofenylhydrazinu za vzniku příslušných hydrazonů (str. 63)
- Obrázek č. 8:** Kalibrační křivky pro malondialdehyd a 3-nitrotyrosin (str. 65)
- Obrázek č. 9:** Selektivita LC-MS/MS metody pro stanovení malondialdehydu a 3-nitrotyrosinu z HepG2 buněčné matrice (str. 69)
- Obrázek č. 10:** Buněčná viabilita u HepG2 buněk po 1, 4 a 24 hodinové expozici *t*-BOOH o koncentraci 100, 500 a 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (str. 72)
- Obrázek č. 11:** Vliv *t*-BOOH o koncentraci 100, 500 a 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ na tvorbu malondialdehydu, 3-nitrotyrosinu a intracelulární thiolovou rovnováhu po 1, 4 a 24 hodinách expozice (str. 77)

- Obrázek č. 12:** Buněčná viabilita HepG2 buněk po 1, 4 a 24 hodinách expozice asoximu, metoximu, obidoximu, pralidoximu a trimedoximu v koncentraci odpovídající jejich hodnotě IC_{50} (str. 78)
- Obrázek č. 13:** Hladiny malondialdehydu a 3-nitrotyrosinu nalezené v cytoplazmatickém obsahu HepG2 buněk po 1, 4 a 24 hodinách expozice asoximu, metoximu, obidoximu, pralidoximu a trimedoximu v koncentraci odpovídající jejich hodnotě IC_{50} (str. 82)
- Obrázek č. 14:** Množství neproteinových thiolů a disulfidů nalezené v cytoplazmatickém obsahu HepG2 buněk po 1, 4 a 24 hodinách expozice asoximu, metoximu, obidoximu, pralidoximu a trimedoximu v koncentraci odpovídající jejich hodnotě IC_{50} (str. 84)
- Obrázek č. 15:** Změny v intracelulárních hladinách ROS/RNS měřených fluorescenčními sondami v HepG2 buňkách po 1, 4 a 24 hodinách expozice asoximu, metoximu, obidoximu, pralidoximu a trimedoximu v koncentraci odpovídající jejich hodnotě IC_{50} (str. 92)
- Obrázek č. 16:** Základní struktury monokvarterních a biskvarterních oximových reaktivátorů AChE (str. 93)
- Obrázek č. 17:** Chemické struktury metoximu, asoximu, obidoximu, pralidoximu a trimedoximu (str. 94)

Seznam tabulek

- Tabulka č. 1:** Změny v parametrech oxidačního stresu po podání oximových reaktivátorů AChE v *in vivo* modelech (str. 35)
- Tabulka č. 2:** Změny v parametrech oxidačního stresu u zvířat intoxikovaných organofosfáty a vliv antidotní terapie (str. 38-39)
- Tabulka č. 3:** Příprava kalibračních vzorků malondialdehydu a 3-nitrotyrosinu v buněčném homogenátu (str. 51)
- Tabulka č. 4:** Validační parametry a vzorky potřebné pro provedení validace (str. 52)
- Tabulka č. 5:** Příprava vzorků pro stanovení správnosti, krátkodobé a dlouhodobé přesnosti a návratnosti pracovního postupu (str. 53)
- Tabulka č. 6:** Příprava vzorků pro stanovení návratnosti pracovního postupu, hodnocení matricových efektů a selektivity (str. 53)
- Tabulka č. 7:** Příprava vzorků pro hodnocení matricových efektů (str. 54)
- Tabulka č. 8:** Hodnoty IC₅₀ pro použité oximové reaktivátory AChE (str. 57)
- Tabulka č. 9:** Iontové přechody a hodnoty CID používané při SRM (str. 63)
- Tabulka č. 10:** Metoda vnitřního standardu s využitím kalibrační křivky (str. 64)
- Tabulka č. 11:** Správnost metody vyjádřena jako procentuální bias (str. 66)
- Tabulka č. 12:** Krátkodobá a dlouhodobá přesnost metody vyjádřena jako variační koeficient (str. 66)
- Tabulka č. 13:** Návratnost pracovního postupu vyjádřena jako procentuální množství analytu získaného daným pracovním postupem (str. 67)
- Tabulka č. 14:** Vliv HepG2 buněčné matrice na stanovení malondialdehydu, 3-nitrotyrosinu, glutaraldehydu a izotopově značeného 3-nitrotyrosinu (str. 68)
- Tabulka č. 15:** Stabilita malondialdehyd-DNPH komplexu a 3-nitrotyrosinu v HepG2 buněčném homogenátu po dobu 24, 48 a 168 hodin při 10 °C (str. 70)

- Tabulka č. 16:** Vliv koncentrace kyseliny 5,5'-dithiobis(2-nitro-benzoové) a borohydridu sodného na stanovení neproteinových thiolů a neproteinových disulfidů vyjádřen jako procentuální výtěžnost reakce (str. 71)
- Tabulka č. 17:** Množství proteinu v cytoplasmě HepG2 buněk vystavených působení *t*-BOOH o koncentraci 100, 500 a 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ po dobu 1, 4 a 24 hodin (str. 73)
- Tabulka č. 18:** Množství malondialdehydu a 3-nitrotyrosinu v HepG2 buňkách vystavených působení *t*-BOOH o koncentraci 100, 500 a 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ po dobu 1, 4 a 24 hodin (str. 74)
- Tabulka č. 19:** Množství neproteinových thiolů a neproteinových disulfidů v HepG2 buňkách vystavených působení *t*-BOOH o koncentraci 100, 500 a 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ po dobu 1, 4 a 24 hodin (str. 75)
- Tabulka č. 20:** Množství proteinu v lyzátu HepG2 buněk vystavených působení asoximu, metoximu, obidoximu, pralidoximu a trimedoximu o koncentraci odpovídající jejich IC_{50} po dobu 1, 4 a 24 hodin (str. 79)
- Tabulka č. 21:** Množství malondialdehydu a 3-nitrotyrosinu v HepG2 buňkách vystavených působení asoximu, metoximu, obidoximu, pralidoximu a trimedoximu o koncentraci odpovídající jejich IC_{50} po dobu 1, 4 a 24 hodin (str. 81)
- Tabulka č. 22:** Množství proteinových thiolů a neproteinových disulfidů v HepG2 buňkách vystavených působení asoximu, metoximu, obidoximu, pralidoximu a trimedoximu o koncentraci odpovídající jejich IC_{50} po dobu 1, 4 a 24 hodin (str. 83)
- Tabulka č. 23:** Koncentrace biomarkerů oxidačního stresu v mozkomíšním moku u kontrolní skupiny pacientů ($n = 15$) a pacientů léčených memantinem ($n = 22$; str. 85)

1. Úvod

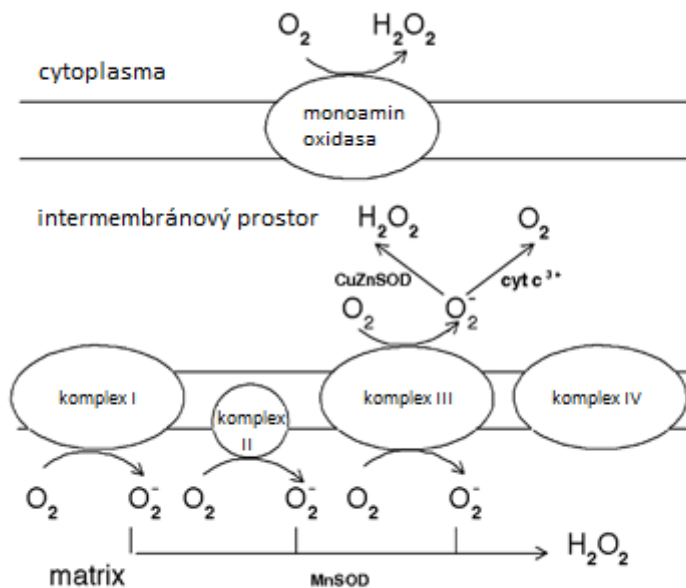
Tématem předkládané disertační práce je sledování biomarkerů oxidačního stresu metodami HPLC. Oxidační stres patří mezi významné mechanismy toxického působení chemických látek včetně léčiv a může tak přispívat k rozvoji jejich nežádoucích účinků. Vztah mezi toxicitou léčiv a tvorbou specifických ukazatelů oxidativního poškození biomolekul však zůstává do značné míry neznámý. Je proto kladen důraz na vývoj a optimalizaci spolehlivých metod sloužících k identifikaci a kvantifikaci biomarkerů oxidačního stresu nejen ve fázi vývoje léčiv, ale i v průběhu jejich klinického hodnocení. Zároveň je monitorování těchto markerů užitečným nástrojem při hodnocení účinnosti terapie u onemocnění nebo intoxikací, jejichž patofyziologie je spojovaná s oxidačním stresem. Bylo prokázáno, že oxidační stres hraje významnou roli v rozvoji neurodegenerativních onemocnění, jakým je například Alzheimerova choroba. Proto je prevence vzniku a snižování jeho dopadu součástí léčebné strategie. V oblasti vojenské toxikologie je oxidační stres spojován s otravou organofosfáty, kde je považován za jeden z vedlejších mechanismů toxicity. Vliv jednotlivých složek antidotní terapie na hladinu oxidačního stresu však není stále zcela objasněn.

Chromatografické metody, zejména ve spojení s hmotnostně spektrometrickou detekcí, patří mezi metody vysoce selektivní a citlivé. Tyto metody jsou rovněž kompatibilní s celou řadou biologických matric a s jejich využitím lze monitorovat i větší počet analytů současně.

1.1. Oxidační stres a jeho hodnocení

Oxidační stres je definován jako významná nerovnováha mezi nadměrnou tvorbou reaktivních forem kyslíku/dusíku (ROS/RNS) a schopností antioxidantní obrany organismu tyto reaktivní meziprodukty odbourávat (Halliwell, 2007). Za fyziologických podmínek je však přítomnost určitého množství ROS/RNS nezbytná, protože se tyto molekuly podílí na buněčné signalizaci a regulují též buněčnou proliferaci (Ray et al., 2012). ROS/RNS mohou být uvnitř buněk generovány v důsledku působení vnitřních i vnějších faktorů jako jsou xenobiotika, záření nebo patologické procesy (Fang et al., 2002). Hlavním endogenním zdrojem ROS/RNS je dýchací řetězec (ETC) umístěný na vnitřní membráně mitochondrií. ETC se skládá ze čtyř integrálních proteinů označovaných jako komplex I – IV (Thannickal & Fanburg, 2000). V průběhu buněčného dýchání dochází mezi jednotlivými komplexy k přesunu a úniku elektronů za vzniku

superoxidového radikálu (O_2^{\bullet}), který může být dále konvertován na peroxid vodíku (H_2O_2) a kyslík (O_2 ; obrázek č. 1). Vysoká koncentrace O_2^{\bullet} způsobuje redukcí přechodných kovů, které reagují s H_2O_2 za vzniku hydroxylového radikálu (OH^{\bullet}). Dále může O_2^{\bullet} reagovat s oxidem dusným (NO) a vytvořit peroxynitrit ($ONOO^-$), který společně s OH^{\bullet} patří mezi velmi silné oxidanty schopné poškozovat intracelulární biomolekuly (Turrens & Julio, 2004). V případě xenobiotik mohou ROS vznikat jak v důsledku jejich interference s ETC, tak jako produkty metabolizace enzymy cytochromů P450 nebo jinými enzymy jako jsou lipogenasa, cyklooxygenasa nebo xantinoxidasa (Deavall et al., 2012; Banerjee et al., 2016).



Obrázek č. 1: Zdroj superoxidového radikálu uvnitř mitochondriálního elektronového transportního řetězce (převzato z Thannickal & Fanburg, 2000).

O_2 – kyslík, O_2^{\bullet} – superoxidový radikál, H_2O_2 – peroxid vodíku, CuZnSOD – CuZn-superoxiddismutasa, MnSOD – Mn-superoxiddismutasa, $cyt\ c^{3+}$ - oxidovaná forma cytochromu *c*

Živé organismy dokáží díky antioxidační obraně nadměrnou tvorbu ROS do určité míry neutralizovat. Existují dva základní typy antioxidačních systémů: enzymatické a neenzymatické (Valko et al., 2006). Mezi nejvýznamnější enzymatické antioxidy, které pomáhají rozkládat ROS na méně reaktivní sloučeniny, patří superoxiddismutasa (SOD), katalasa (CAT) a glutathion peroxidasa (GPx). Neenzymatické nízkomolekulární

antioxidanty (LMWA), mezi které řadíme karotenoidy, tokoferoly, kyselinu askorbovou či glutathion (GSH), přímo reagují s ROS a tím je neutralizují (Birben et al., 2012).

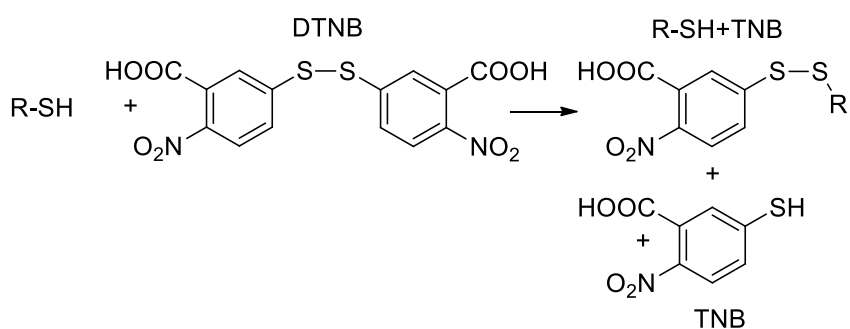
Pokud je produkce ROS/RNS natolik zvýšená, že překračuje kapacitu antioxidantních systémů, dochází k buněčnému poškození. Biologické membrány, strukturní a funkční bílkoviny nebo molekuly DNA jsou struktury vůči oxidačnímu stresu velmi citlivé a jejich modifikace mohou mít pro buňku fatální následky (Valko et al., 2007). Pro produkty oxidace biomolekul se používá souhrnné označení biomarkery oxidačního stresu (BOS). V současnosti je většina metod používaných k monitorování oxidačního stresu založená na měření BOS (zejména u *in vivo* modelů), protože ROS/RNS jsou velmi nestabilní a jejich zvýšené hladiny nemusí nutně odrážet skutečný rozsah oxidativního poškození. Tyto metody představují užitečný nástroj při hodnocení následků oxidačního stresu v široké škále biologických matric a napomáhají při objasňování jeho role v patogenezi nemocí nebo mechanismu toxicity léčiv (Halliwell & Whiteman, 2004). Optimální analytické metody pro sledování BOS musí být dostatečně selektivní, citlivé, dosahovat vysoké přesnosti a správnosti měření a poskytnout dostatečně nízké limity detekce a kvantifikace. Na rozdíl od spektrofotometrických a imunochemických metod, které jsou pro stanovení BOS hojně rozšířené, chromatografické metody lépe splňují tyto nároky. Navíc je možné díky přítomnosti separačního kroku analyzovat i několik BOS současně a tím poskytnou komplexnější obraz o následcích oxidačního stresu v organismu (Winnik & Kitchin, 2008).

1.1.1. Antioxidační systém na bázi thiolů

Thiolový antioxidační systém, zahrnující redukované a oxidované formy thiolů, je nejvýznamnější neenzymatickou složkou antioxidační obrany organismu. Kromě nejdůležitějšího zástupce GSH a jeho oxidované formy (GSSG) čítá celou řadu proteinově i neproteinově vázaných sloučenin (např. cystein, homocystein, γ -glutamylcystein a jejich odpovídající disulfidy; Patsoukis & Georgiou, 2004). Thioly mají schopnost přímo vychytávat ROS/RNS, slouží jako kofaktory antioxidantních enzymů (GPx, glutathiontransferasa) a mají také schopnost regenerovat další antioxidanty (vitamin C a E). Thioly oxidací přechází na příslušné disulfidy a jejich poměr slouží jako významný ukazatel redoxní rovnováhy uvnitř živého organismu (Valko et al., 2007; Balcerzyk & Bartosz, 2003). V reakci na zvýšený oxidační stres může docházet jak k depleci, tak v případě nízkých dávek xenobiotik také k přechodnému zvýšení

koncentrace thiolů. K tomuto kompenzačnímu nárůstu dochází 6 až 24 hodin po expozici stresoru (Deneke, 2000).

Mezi metodami sloužícími ke stanovení thiolů/disulfidů převládají metody využívající spektrofluorometrické (Pulella et al., 2006; Wright & Viola, 1998, Chen et al., 2016) a spektrofotometrické detekce, které stanovují produkty reakcí s thiol-specifickými činidly, jako jsou kyselina 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová) (DTNB, Ellmanovo činidlo; Chen et al., 2008; Riener et al., 2002; Patsoukis & Georgiou, 2004), 4,4'-dithiopyridin (Patsoukis & Georgiou, 2004) nebo kyselina n-oktyldithiobenzoová (Faulstich et al., 1993). Při reakci s Ellmanovým činidlem (obrázek č. 2) dochází ke vzniku aduktu mezi thiolem a kyselinou 5-thio-2-nitrobenzoovou (R-SH+TNB) za současného uvolnění ekvimolárního množství TNB. Kromě specifických aduktů (R-SH+TNB) lze pomocí uvolněného TNB stanovit také celkové množství thiolů. Po redukcí disulfidové vazby vhodným redukčním činidlem lze stejnou reakcí stanovit také celkové množství disulfidů (Chen et al., 2008).



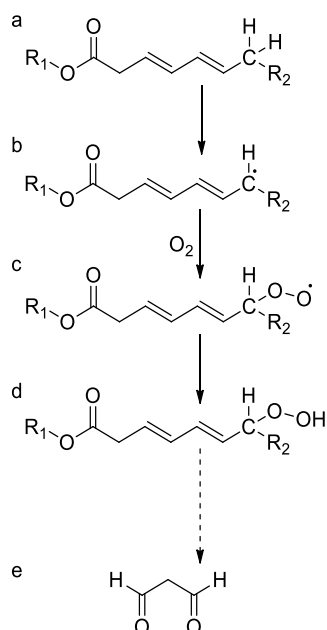
Obrázek č. 2: Princip stanovení thiolů pomocí Ellmanova činidla (převzato z Chen et al., 2008).

DTNB – Ellmanovo činidlo, TNB – kyselina 5-thio-2-nitrobenzoová, R-SH+TNB – adukt thiolu a TNB

1.1.2. Oxidativní poškození lipidů

Lipidy, zejména estery s polynenasycenými mastnými kyselinami, jsou ve velkém množství obsaženy v buněčných membránách. Jejich oxidace způsobuje poruchy membránové fluidity a může vést až k destrukci biomembrány a následnému uvolnění intracelulárního obsahu do okolí buňky (Niki, 2014; Repetto et al., 2012). Nenasycené mastné kyseliny obsahují ve své molekule systém dvojných vazeb poskytující lehce odštěpitelné atomy vodíku (obrázek č. 3). Při reakci s ROS dochází ke vzniku nestabilního radikálu mastné kyseliny, který reaguje s O₂ a vytváří vysoce reaktivní peroxylový radikál. Následnou radikálovou řetězovou reakcí, označovanou jako peroxidace lipidů, vzniká celá řada reaktivních produktů a meziproduktů. Reakce

peroxylového radikálu a mastné kyseliny vede ke vzniku hydroperoxidu, který je nestabilní a rozkládá se na výsledné produkty, např. aldehydy a izoprostany (Grotto et al., 2009). Malondialdehyd (MDA) je jeden z nejvýznamnějších a nejlépe prostudovaných konečných produktů peroxidace lipidů vyznačující se vysokou reaktivitou a toxicitou. Je schopný vytvářet adukty s proteiny a nukleovými kyselinami, čímž zesiluje celkový dopad oxidačního stresu na biomolekuly (Del Rio et al., 2005).

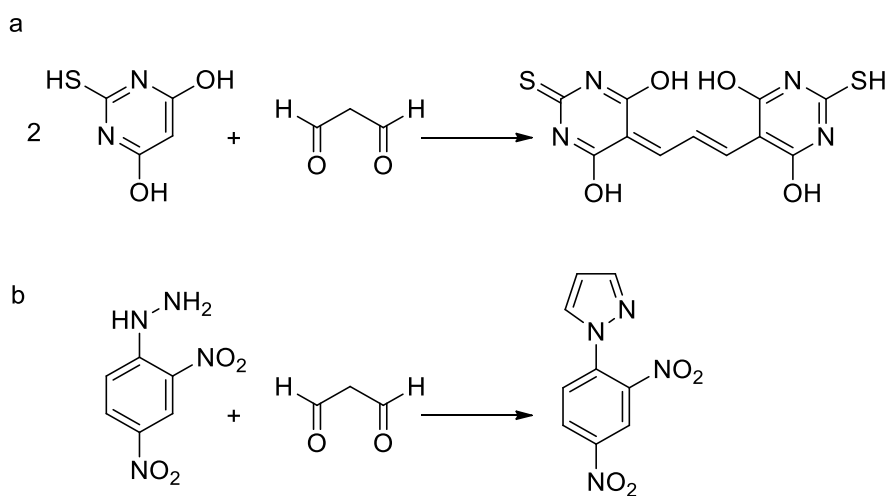


Obrázek č. 3: Vznik malondialdehydu (MDA) z polynenasycené mastné kyseliny radikálovou reakcí (převzato z Grotto et al., 2009).

a – nenasycená mastná kyselina, b – radikál mastné kyseliny, c – peroxylový radikál,
d – hydroperoxid, e – MDA

Pro stanovení MDA se nejčastěji používá metoda založená na spektrofotometrické detekci barevných produktů vzniklých jeho reakcí s kyselinou thiobarbiturovou (TBA; obrázek č. 4a). Nevýhodou této metody je její nízká selektivita, protože TBA reaguje kromě MDA i s dalšími látkami vznikajícími v průběhu peroxidace lipidů, tzv. substancemi reagujícími s kyselinou barbiturovou (TBARS). Dále může TBA v biologických matricích reagovat i s jinými endogenními látkami, v plasmě např. s bilirubinem (Knight et al., 1988; Korchazina et al., 2003; Lykkesfeldt, 2007). Selektivitu a citlivost stanovení MDA-TBA aduktu lze zvýšit zařazením chromatografické separace před vlastní spektrofotometrickou (Grotto et al., 2007; Konieczka et al., 2014) nebo fluorescenční detekcí (Agarwal & Chase, 2002; Lärstad et al., 2002; Lykkesfeldt, 2001; Mao et al., 2006). I přes to je v současnosti pro svou vyšší specifitu upřednostňována

derivatizace MDA 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH), jejímž výsledkem je příslušný hydrazon (obrázek č. 4b). U tohoto postupu snižují mírnější reakční podmínky derivatizace DNPH (25-37 °C) v porovnání s TBA (95-100 °C) riziko vzniku umělého interferujících produktů (Mateos et al., 2004; Pilz et al., 2000; Sim et al., 2003). Selektivita stanovení MDA je dále zvýšena použitím kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Tento postup umožňuje specificky detekovat přímo MDA-DNPH komplex (Andreaoli et al., 2003; Chen et al., 2011; Giera et al., 2012).



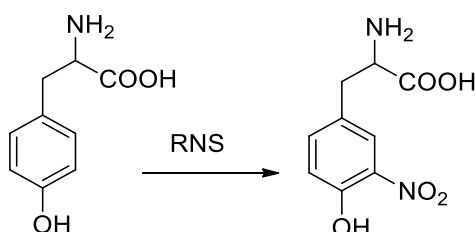
Obrázek č. 4: Derivatizace malondialdehydu (MDA)

a – kyseliny thiobarbiturová (TBA), **b** – 2,4-dinitrofenylhydrazin (DNPH)

1.1.3. Oxidativní poškození proteinů

U proteinů se oxidační stres projevuje hlavně jejich strukturálními a funkčními změnami, urychlením nebo naopak zablokováním jejich degradace. Mezi nejrozšířenější způsoby modifikace patří tzv. karbonylace proteinů, ke které může docházet buď v důsledku přímé oxidace aminokyselin prostřednictvím ROS/RNS nebo neoxidativními reakcemi s karbonyl-obstahujícími produkty oxidace lipidů. Zvláště citlivé vůči oxidaci jsou kromě peptidické vazby i postranní řetězce aminokyselin (Levine, 2002; Gryszyńska et al., 2017). Spektrofotometrická a imunochemická stanovení obsahu karbonylovaných proteinů patří mezi nejrozšířenější metody hodnocení oxidativního poškození proteinů zejména pro svou nenáročnost (Winterbourn & Buss, 1999; Luo & Wehr, 2009). Protože ke zvýšení hladiny karbonylovaných proteinů nemusí docházet pouze v důsledku oxidačního stresu, je v současné době kladen důraz na vývoj metod schopných identifikovat oxidativní poškození proteinů způsobené konkrétními

ROS/RNS (Suzuki et al., 2010; Dalle-Donne et al., 2003). Příkladem takové specifické modifikace je nitrace tyrosinu. Tyrosin je aromatická aminokyselina přítomná téměř ve všech proteinech a díky hojnému zastoupení na povrchu molekuly proteinu je snadno přístupná oxidačnímu ataku. V přítomnosti některých RNS dochází k navázání nitroskupiny ($-\text{NO}_2$) do polohy *ortho*-romatického jádra molekuly tyrosinu za vzniku stabilního produktu, 3-nitrotyrosinu (3-NT; obrázek č. 5). Nitrací tyrosinu dochází ke změnám konformace proteinů a k ovlivnění biologické aktivity. Zvýšené množství 3-NT v molekule proteinu blokuje reverzibilní fosforylaci tyrosinu, což vede k poruchám přenosu informace v mnoha buněčných signálních drahách (Cruz & Fardilha, 2016; Hnízdová et al., 2009).



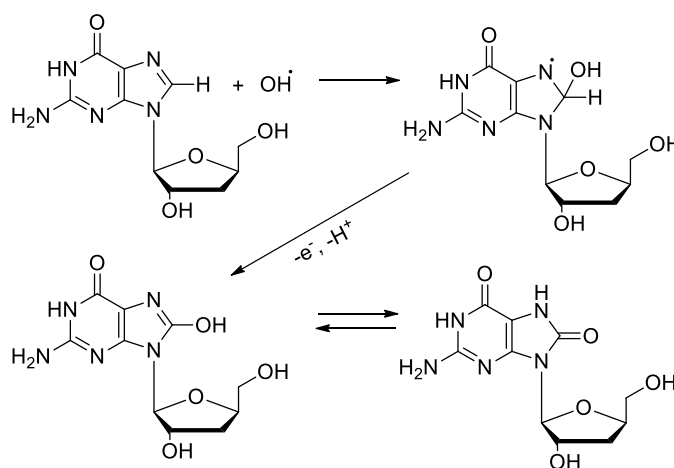
Obrázek č. 5: Vznik 3-nitrotyrosinu (3-NT) působením nitračního činidla (RNS) na molekulu tyrosinu.

U metod pro stanovení 3-NT, který je v biologických vzorcích často přítomný i ve velmi malém množství, je důležité dosáhnout nízkých limitů detekce (Duncan, 2003). Nejpoužívanější jsou metody imunochemické, často kritizované pro nízkou úroveň validace a chromatografické, které zahrnují plynovou i kapalinovou chromatografii (Ishii et al., 2006; Ryberg & Caidahl, 2007; Tsikas et al., 2012; Radi, 2013).

1.1.4. Oxidativní poškození DNA

Oxidativní modifikace jaderné i mitochondriální DNA patří mezi nejrozšířenější a nejzávažnější poškození biomolekul. Zahrnují oxidaci purinového, pyrimidinového jádra (báze) i cukerné složky molekuly nukleosidu, ztrátu báze, intramolekulární cyklizaci mezi bází a cukrem (cyklopurinové léze), jednoduché či dvojitě zlomy dvoušroubovice DNA a vznik intermolekulárních můstků (Cooke et al., 2003). Často jsou všechny tyto typy modifikací přítomny současně. Pokud nejsou tato poškození dostatečně reparována, dávají vzniknout četným mutacím, které ovlivňují replikaci a transkripci DNA, což může vést k buněčné smrti nebo naopak k nekontrolovanému buněčnému dělení (Evans et al., 2004; Marmiy & Esipov, 2015). Nejprostudovanějším

a nejpoužívanějším BOS oxidativního poškození DNA je 8-oxo-2'-deoxyguanosin (8o2'dG). Adicí OH^\bullet na C_8 purinového jádra molekuly guanosinu vzniká hydroxy-guanosinový radikál, jenž se redukuje na 7-hydro-8-hydroxy-2'-deoxyguanosin. Tato sloučenina se vyskytuje ve dvou izomerních formách, přednostně však ve formě 8o2'dG (obrázek č. 6; Valavanidis et al., 2009; Kryston et al., 2011). Podobně jako u lipidů a proteinů, i v případě analytického stanovení 8o2'dG dominují chromatografické metody (Dizdaroglu et al., 2001; Lam et al., 2012; Boysen et al., 2010; Mangal et al., 2009). K přímé detekci řetězových zlomů lze například použít tzv. kometový test, který je založen na rozdílné elektroforetické pohyblivosti různě dlouhých fragmentů DNA v agarózovém gelu (Olive & Banáth, 2006).



Obrázek č. 6: Reakce 2'-deoxyguanosinu s hydroxylovým radikálem (OH^\bullet); převzato z Valavanidis et al., 2009).

a – 2'-deoxyguanosin, **b** – 8-hydroxy-guanosinový radikál,
c – 7-hydro-8-hydroxy-2'-deoxyguanosin, **d** – 8-oxo-2'-deoxyguanosin

1.2. Role oxidačního stresu u otrav organofosfáty

Organofosfáty (OP) představují širokou skupinu vysoce toxických chemických látek. Strukturně se jedná o estery nebo thioly odvozené od kyseliny fosforečné, fosfonové nebo fosfinové. Jejich hlavní toxický efekt je zprostředkován ireverzibilní inhibicí esterasy v centrálním nervovém systému (CNS; Čolović et al., 2013). Každoročně dochází podle Světové zdravotnické organizace celosvětově řádově k miliónům intoxikací v důsledku jak náhodné expozice OP, tak úmyslného požití. V současnosti dochází k otravám OP pesticidy zejména v rozvojových zemích, kde jsou používány pro jejich nízkou cenu a vysokou efektivitu. Další kategorii OP představují bojové otravné látky označované

jako nervově paralytické látky (NPL). Ačkoliv jsou NPL zakázány mezinárodní Úmluvou o zákazu chemických zbraní, riziko útoku s jejich použitím nelze stále zcela vyloučit (Ray & Richards, 2001; Shaik, 2011; Worek et al., 2016; Yang & Deng, 2007). Ačkoliv je mechanismus toxicity zprostředkovaný inhibicí enzymu acetylcholinesterasa (AChE) dlouhodobě a dobře známý, tak některé chronické zdravotní komplikace naznačují, že existují i jiné mechanismy podílející se na celkové toxicitě OP (Čolović et al., 2013). K rozvoji těchto stavů dochází dokonce i v případech, kdy nejsou přítomné klinické známky otravy OP. Příkladem je vznik OP indukované opožděné neuropatie (OPIDN) způsobené inhibicí enzymu neuropatická esterasa (Glynn, 2006; Pope et al., 2005). Mezi nejvýznamnější vedlejší mechanismy toxicity patří oxidační stres (Lukaszewicz-Hussain, 2010). Nárůst oxidačního stresu *in vivo* (tj. zvýšená koncentrace markerů oxidace lipidů, změny v hladinách antioxidantů a scavengerů) byl zaznamenán po akutní expozici jak pesticidům, tak NPL; jmenovitě fenthionu (Büyükkuroğlu et al., 2008), malathionu (Banerjee et al., 1999; Da Silva et al., 2008; Fortunato et al., 2006; John et al., 2001; Possamai et al., 2007), methidathionu (Altuntas et al., 2002), chlorpyrifosu (Mansour & Mossa, 2009; Ojha et al., 2011), dichlorvosu (Cankayali et al., 2005), paraoxonu (Jafari et al., 2012), somanu (Pazdernik et al., 2001) a tabunu (Pohanka et al., 2009; Pohanka et al., 2011a).

1.2.1. Mechanismy oxidačního stresu u akutních otrav OP

V průběhu otrav vysokými dávkami OP dochází v důsledku inhibice AChE a následné akumulace acetylcholinu (ACh) v synaptické štěrbině k hyperstimulaci cholinergních receptorů autonomního nervového systému, CNS a na nervosvalové ploténce. To se projevuje souborem příznaků označovaných jako cholinergní syndrom (Eddleston et al., 2008). Krátce po intoxikaci se dostavují symptomy jako zvýšená salivace a lakrimace, mióza, křeče v gastrointestinálním traktu, zvracení, úzkost, bradykardie, hypotenze, bronchospasmus, svalová slabost, fascikulace, svalová paralýza, konvulze a útlum dýchání (Peter et al., 2014). Závažnost těchto symptomů závisí kromě typu a dávky OP také na bráně jeho vstupu do organismu a časové prodlevě mezi intoxikací a zahájením odpovídající terapie. Ve fatálních případech otravy nastává smrt v důsledku hypoxie vzniklé kombinací zvýšené bronchiální sekrece, paralýzy periferních dýchacích svalů a centrální apnoe (Carey et al., 2013; Hulse et al., 2014).

Mozek a svalstvo, jakožto cílové orgány působení OP, jsou citlivé vůči oxidačnímu stresu. Oba orgány se vyznačují vysokou energetickou náročností a spotřebou kyslíku.

Mozková tkáň navíc hojně využívá ROS/RNS jako signálních molekul, rovněž disponuje poměrně omezeným množstvím antioxidantů, reparačních systémů a obsahuje vysoký podíl polynenasycených mastných kyselin náchylných k peroxidaci (Mariani et al., 2005; Vale, 1998; Wang & Michaelis, 2010). Mechanismy, které se podílejí na zvýšené produkci ROS a RNS v průběhu otravy OP nejsou plně známy, ale významnou roli v případě mozkové tkáně hraje excitotoxicita způsobená zesílenou cholinergní a glutamatergní neurotransmisí. Excitotoxicita může vést až ke smrti neuronálních buněk, degeneraci axonálních výběžků neuronů a úbytku nervové tkáně. Výsledkem jsou závažné neurologické a neuropsychické změny postihující kognitivní i psychomotorické funkce (Chen, 2012). S excitotoxicitou je spojen i oxidační stres. Masivní stimulace ACh receptorů a následná aktivace N-methyl-D-aspartát (NMDA) glutamatergních receptorů vede k excesivnímu influxu vápenatých iontů (Ca^{2+}) do postsynaptických neuronů. Zvýšená intracelulární koncentrace Ca^{2+} pak spouští Ca^{2+} -dependentní signální kaskády vedoucí k narušení oxidativní fosforylace (syntézy vysokoenergetických molekul adenosintrifosfátu), mitochondriální dysfunkci spojené s nadměrnou produkcí ROS/RNS (Milatovic et al., 2006). Kromě toho Ca^{2+} iniciuje konverzi enzymu xantin dehydrogenasy na xantin oxidasu, který skrz oxidaci molekuly hypoxantinu (metabolit adenosindifosfátu) generuje ROS/RNS (Walker, 1991). Dalším mechanismem, kterým lze spojit excitotoxicitu s oxidačním stresem, je přímá aktivace NMDA receptorů stimulující syntézu NO. NO reaguje s ostatními ROS (zejména O_2^{\bullet}) za vzniku ONOO⁻ a dalších RNS (Pearson & Patel, 2016). Experimentálně bylo prokázáno, že použití antagonisty NMDA receptorů memantinu vedlo k významnému snížení produkce ROS/RNS u potkanů vystavených působení diisopropylfosforofluoridátu (Zaja-Milatovic et al., 2009). Výsledný nárůst koncentrace ROS/RNS uvnitř nervových buněk způsobí nadměrný vstup Ca^{2+} do mitochondrií. Oxidativní poškození mitochondriální DNA vede ke snížení exprese proteinů kódujících mitochondriální DNA, jež zajišťují správnou funkci ETC. Tato pozitivní zpětná vazba mezi Ca^{2+} , ROS/RNS a poškozením mitochondriální DNA tak může vysvětlit zvýšený oxidační stres i v případě, kdy už se nejedná o přímý důsledek cholinergní stimulace (Feissner et al., 2009; Peng & Jou, 2010; Patel, 2004).

Oxidační stress se také významně podílí na vzniku poškození svalové tkáně označované jako tzv. intermediální syndrom (IMS). K rozvoji IMS dochází 24 – 96 hodin po intoxikaci OP, a to i v případech, kdy došlo ke zjevnému zotavení z akutní cholinergní

krize. IMS významně přispívá k mortalitě otrav OP. Projevuje se významnou slabostí dýchacího svalstva, svalů horních končetin a svalů inervovaných motorickými hlavovými nervy. Jeho patogeneze souvisí s excesivní stimulací postsynaptických ACh nikotinových receptorů v nervosvalové ploténce vedoucí k masivnímu influxu Ca^{2+} do sarkoplazmy svalových buněk, aktivaci NO-syntasy (NOS) a zvýšené produkci ROS/RNS. Vzniklé nekrotické poškození svalové tkáně pak způsobuje akutní myopatii projevující se svalovou slabostí a bolestí (Karalliedde et al., 2006; Abdolahi & Karami-Mohajeri, 2012; Yang & Deng, 2007). Na základě *in vitro* a *in vivo* experimentů bylo zjištěno, že antagonisté nikotinových receptorů (d-tubokurarin), inhibitory NOS a absence Ca^{2+} v kultivačním médiu (v tomto případě pouze *in vitro* modely) mírní vznik nekrózy a svalového poškození způsobený inhibicí AChE (Ariëns et al., 1969; Jeyarasasingam et al., 2000; Leonard & Salpeter, 1979).

Extraneuronálním mechanismem, který se podílí na redoxní nerovnováze při intoxikacích OP, je také hyperglykémie. Zvýšená koncentrace glukózy aktivuje neenzymatickou glykaci proteinů a produkuje strukturně i funkčně modifikované konečné produkty pokročilé glykace (AGEs). AGEs reagují se specifickými membránovými receptory a tím přímo stimulují produkci ROS/RNS (Abdollahi et al., 2004; Tan et al., 2007).

1.2.2. Mechanismy oxidačního stresu u subchronických a chronických otrav OP

Patofyziologické mechanismy, které se mohou podílet na vzniku oxidačního stresu *in vivo* u subchronických a chronických otrav OP, nejsou dosud plně objasněny (De Silva et al., 2006). V případě dlouhodobé expozice (4 – 12 týdnů) velmi nízkým dávkám OP pesticidům (jednotky % LD_{50}) byly nalezeny zvýšené hladiny oxidačního stresu i u zvířat, u kterých nebyly pozorovány žádné klinické známky intoxikace spojené s nadměrnou cholinergní stimulací. V těchto experimentech byl použit např. malathion (Abdollahi et al., 2004, Delgado et al., 2006; Possamai et al., 2007), chlorpyrifos (Elsharkawy et al., 2013) nebo dichlorvos (Binukumar et al., 2010; Kaur et al., 2007; Verma et al., 2009) a jejich zjištění naznačují, že se na vzniklém oxidačním stresu mohou podílet i mechanismy přímo nesouvisející s inhibicí AChE.

Podobných výsledků bylo dosaženo i u některých *in vitro* experimentů. U neuronální buněčné linie PC12 exponované chlorpyrifosu byla naměřena snížená viabilita buněk a

zároveň nalezeny zvýšené hladiny produktů peroxidace lipidů a oxidované formy glutathionu indikující zvýšený oxidační stress. K vzniku BOS došlo i v přítomnosti antagonistů muskarinových (atropin) a nikotinových (mecamylamin) receptorů. Naopak při použití Ca^{2+} chelatačního činidla (BAPTA-AM) nastala redukce oxidačního stresu (Giordano et al., 2007). Podobná korelace mezi nárůstem ROS/RNS a poklesem buněčné viability (nezávislé na stupni inhibici AChE) byla nalezena také u izolovaných granulárních buněk mozečkové kůry, které byly vystaveny působení chlorpyrifosu (Amani et al., 2016). Mechanismy, jakým OP indukují ROS/RNS v těchto modelech, nejsou známy. OP se váží přímo na proteiny prostřednictvím kovalentních vazeb. Hypoteticky tak mohou fosforylovat antioxidantní či jiné enzymy udržující intracelulární redoxní rovnováhu a vytvořit tak nerovnováhu směrem k oxidačnímu stresu (Lockridge & Schopfer, 2010; Marsillach et al., 2013). Další možností je přímá vazba na molekuly DNA (Želježić et al., 2016). Poškození DNA aktivuje reparační mechanismy zahrnující p53, NF- κ B a MAPK signální dráhy, které regulují expresi genů ovlivňujících metabolismus ROS/RNS, Ca^{2+} homeostázu a apoptózu (Bonora et al., 2015; Lee et al., 2014; Li & Karin, 1999; Pejchal et al., 2009; RamaRao & Bhattacharya, 2012).

1.3. Oxidační stres a antidotní terapie otrav organofosfáty

V případě otrav OP jsou základními podávanými antidoty atropin, reaktivátory AChE a diazepam (Eddleston & Chowdhury, 2016). Vzhledem k mechanismu jejich účinky by měla být tato léčiva schopná (individuálně i v kombinaci) redukovat oxidační stres vzniklý zvýšenou cholinergní aktivitou způsobenou inhibicí AChE.

1.3.1. Atropin

Atropin je kompetitivním antagonistou na centrálních i periferních muskarinových receptorech. U akutních intoxikací OP je léčivem volby, podávaným za účelem obnovení kardiopulmonálních funkcí. V závislosti na svém mechanismu účinku by podání atropinu mělo vést ke snížení úrovně hladiny oxidačního stresu navozeného nadměrnou cholinergní stimulací (Thiermann et al., 2013).

Na základě výsledků z dostupných *in vivo* experimentů však nelze toto tvrzení jednoznačně potvrdit (Vanova et al., 2018a). V případě otravy OP pesticidem malathionem (Da Silva et al., 2008; dos Santos et al., 2011), dichlorvošem (Kose et al., 2010) a NPL tabunem (Pohanka et al., 2009; Pohanka et al., 2011a) nevedlo

ani profylaktické, ani terapeutické podání atropinu k žádným významným změnám u vybraných parametrů oxidačního stresu (TBARS, LMWA nebo aktivita antioxidačních enzymů). V jednom případě byl dokonce ve skupině potkanů, kterým byl profylakticky aplikován pouze atropin, pozorován nárůst hladiny LMWA (v porovnání s kontrolní skupinou) a zároveň byla koncentrace LMWA u těchto zvířat srovnatelná se skupinou, která byla po podání atropinu intoxikována tabunem (Pohanka et al., 2011a). U jiného experimentu na potkanech došlo naopak k poklesu koncentrace TBARS, a to jak v případě otravy tabunem, tak separátní aplikace atropinu (Berend et al., 2012). Vzhledem k malému počtu a nízké rozmanitosti sledovaných parametrů oxidačního stresu nelze tedy s dostatečnou jistotou určit výsledný vliv atropinu a/nebo tabunu na redoxní rovnováhu organismu. Na druhou stranu jednou z možností, kterou by šlo zřejmě minimální vliv atropinu na oxidační stres navozený OP vysvětlit, by mohla představovat jeho selektivita vůči muskarinovým receptorům. Z tohoto hlediska není atropin mechanisticky schopen dostatečně redukovat oxidační stres vyvolaný nadměrnou stimulací nikotinových receptorů. Přidání oximového reaktivátoru AChE do terapie, použití přímého antagonisty nikotinových receptorů (např. rocuronium) nebo suplementace antioxidanty by proto mohlo představovat určité řešení (Thiermann et al., 2011; ClinicalTrials.gov, 2014-2016).

1.3.2. Reaktivátory AChE

Oximové reaktivátory AChE jsou léčiva vytěšňující OP z vazby na enzym a uvolňují tak aktivní molekulu enzymu schopnou degradovat ACh. Reaktivační účinnost daného oximu závisí kromě jeho chemické struktury také na typu OP, kterým je AChE inhibována (Worek & Theirmann, 2013). Ačkoliv bylo v uplynulých letech připraveno velké množství oximových reaktivátorů, žádný z nich neprokázal dostatečnou účinnost vůči širší škále OP a v současnosti jsou tak klinicky používané pouze pralidoxim (2-PAM), obidoxim (LüH-6), asoxim (HI-6), metoxim (MMB-4) a trimedoxim (TMB-4; Worek et al., 2016). Vzhledem k tomu, že tyto oximy obsahují ve své struktuře kvarterní dusík, prostupují skrz hematoencefalickou bariéru pouze omezeně a spíše převažuje jejich efekt v periferních tkáních (Chambers et al., 2016).

Schopnost konvenčních reaktivátorů i nově syntetizovaných látek ze skupiny K-oximů vyvolávat/potlačovat oxidační stres, spojovaný s hepatotoxicitou, nefrotoxicitou, kardiotoxicitou a neurotoxicitou, byla popsána v několika *in vivo* studiích (tabulka č. 1). V rámci těchto studií byl rovněž zkoumán vztah mezi oxidačním stresem

a dávkou, případně strukturou oximu (Bartošová et al., 2006; Jokanović & Stojiljković, 2006; Pejchal et al., 2008).

Z hlediska oxidačního stresu je nevíce prostudovaným oximovým reaktivátorem HI-6. Při intramuskulárním podání HI-6 v množství odpovídajícím terapeutické dávce ($1 \times \text{TD}$; $11,4 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a jejímu 10 násobku ($10 \times \text{TD}$; $114 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) byly v plazmě a krevních elementech psů pozorovány změny v hladinách LMWA a TBARS. V plazmě byly naměřené zvýšené hladiny LMWA u $1 \times \text{TD}$ po 120 minutách a u $10 \times \text{TD}$ 120-240 minut od podání HI-6. Po podání terapeutické dávky byla u krevních elementů naměřena zvýšená hodnota TBARS po 30 minutách a vyšší dávka indukovala oxidační stres ve všech časových intervalech (tabulka č. 1). Ani zvýšená hladina nízkomolekulárních antioxidantů v plasmě tak pravděpodobně nestačila k potlačení oxidačního stresu indukovaného látkou HI-6, který se projevil na krevních elementech (Pohanka et al., 2011b). Rozdílné výsledky byly naměřeny v mozkové a jaterní tkáni po podání HI-6 hlodavcům. Podání HI-6 myším a potkanům vedlo k významné redukci hladin LMWA a TBARS, což může být způsobeno útlumem bazálního metabolismu, který je úzce spojen s fyziologickou produkcí ROS. U myši byly tyto ukazatele sníženy rovněž v ledvinách, pravděpodobně díky zvýšené eliminaci produktů oxidace moči (Pohanka et al., 2011c; Pohanka et al., 2011d). U morčat způsobila aplikace HI-6 depleci LMWA v játrech, slezině, ledvinách a mozečku. V játrech a mozku došlo zároveň i k nárůstu TBARS, což může být v případě mozkové tkáně způsobeno celkově nižší koncentrací antioxidantů a její vyšší náchylnosti k oxidačnímu stresu (Drtinová & Pohanka, 2013).

LüH-6 byl u hlodavců obecně slabším induktorem oxidačního stresu (Pohanka et al., 2011d; Drtinová & Pohanka, 2013). Rovněž reaktivátory ze skupiny K-oximů, K048 a K203, vyvolávaly nízký oxidační stres (Karasová et al., 2012; Žunec et al., 2014).

Tabulka č. 1: Změny v parametrech oxidačního stresu po podání oximových reaktivátorů AChE v *in vivo* modelech

OXIM	dávka	časový interval (min)	<i>in vivo</i> model	tkáň	oxidační stres*
HI-6^a	1 × TD, i.m. 11,4 mg.kg ⁻¹	30 120	pes (beagle)	krevní elementy	↑ TBARS 1xTD (30 min) 10xTD (30 + 120 + 240 min) ~ LMWA ~GSH ~GR ~T-SH
	10 × TD, i.m. 114 mg.kg ⁻¹	240		plazma	↑ LMWA 1xTD (120 min) 10xTD (120+240 min) ~TBARS ~GSH ~GR ~T-SH
HI-6^b	0,2 % LD ₅₀ , s.c. 1,56 mg.kg ⁻¹ 2 % LD ₅₀ , s.c. 15,6 mg.kg ⁻¹ 20 % LD ₅₀ , s.c. 156 mg.kg ⁻¹	120	myš	krev	~ LMWA ~ GSH ~GR ~TBARS
				mozek	↓TBARS (0,2; 2; 20% LD ₅₀) ~ LMWA ~GSH ~GR
				ledviny	↓LMWA (2; 20% LD ₅₀)↑GSH(20% LD ₅₀) ~GR ~TBARS
				játra	↓TBARS (2, 20% LD ₅₀) ~LMWA ~GSH ~GR
LüH-6^c HI-6	25 % LD ₅₀ , i.m. LüH-6 210 mg.kg ⁻¹ HI-6 780 mg.kg ⁻¹	40	potkan	mozek	↓LMWA (HI-6) ↑GSH (HI-6, LüH-6) ~TBARS ~ GR
				játra	↓LMWA (HI-6, LüH-6), ↓GSH (LüH-6) ↓TBARS (HI-6, LüH-6) ~GR
LüH-6^d HI-6	5 % LD ₅₀ , i.m. LüH-6 4,15 mg.kg ⁻¹ HI-6 45,1 mg.kg ⁻¹	15 30 60 120 240	morče	játra	↓LMWA (HI-6 15, 30, 60, 120, 240 min) ↑TBARS (HI-6 30 min) ↑GR (LüH-6 15, 30, 60, 120, 240 min)
				slezina	↓LMWA (LüH-6 60, 120 min; HI-6 15, 30, 60, 120, 240 min) ~TBARS ↑GR (HI-630, 60, 240 min)
				ledviny	↓LMWA (HI-6 30, 60, 120 min) ↓TBARS (HI-6 30, 60, 120, 240 min) ↑GR (LüH-6 120 min; HI-6 30, 60, 120, 240 min)
				mozeček	↓LMWA (HI-6 240 min) ↓TBARS (LüH-6 15, 30, 60, 120, 240 min) ↑TBARS (HI-6 15, 30, 60, 120 min) ~GR
				čelní mozkový lalok	↓LMWA (LüH-6 15, 30, 60, 120, 240 min) ↓TBARS (LüH-6 15, 30, 60, 120, 240 min) ↑TBARS (HI-6 15, 30, 60, 120, 240 min) ↑GR (LüH-6 240 min)
K048^e	25 % LD ₅₀ , i.p. 59,6 mg.kg ⁻¹	60 360 24 hodin	potkan	plazma	~TBARS ~SOD
K203^f	TD, i.m. 23 mg.kg ⁻¹	3 - 180	potkan	plazma	↑LMWA (180 min) ~TBARS

* výsledky v porovnání s kontrolní skupinou; ↑nárůst, ↓pokles, ~ nezměněný

GR – aktivita glutathion reduktasy, **GSH** – redukovaný glutathion, **i.m.** – intramuskulární, **i.p.** – intraperitoneální, **LMWA** – nízkomolekulární antioxidanty, **s.c.** - subkutánní, **SOD** – aktivita superoxidodismutasy, **TBARS** – substance reagující s kyselinou thiobarbiturovou, **TD** – terapeutická dávka, **T-SH** – celkové množství thiolů

^aPohanka et al., 2011b; ^bPohanka et al., 2011c; ^cPohanka et al., 2011d;

^dDrtinova & Pohanka, 2013; ^eŽunec et al., 2014; ^fKarasová et al., 2012

1.3.3. Reaktivátory AChE v terapii otrav organofosfáty

V předchozí části práce byl popsán vliv oximových reaktivátorů AChE na redoxní rovnováhu *in vivo*. Protože jsou OP považovány za významné induktory oxidačního stresu, byla rovněž zkoumána schopnost oximů mírnit takto vyvolaný oxidační stres či dokonce plně zabránit jeho vzniku (tabulka č. 2).

Malathion patří ve světě mezi nejvíce používané pesticidy. Oxidační stres vzniklý působením malathionu postihuje řadu orgánových systémů včetně centrální nervové soustavy, jater, ledvin, plic a krevních elementů. V současnosti však není známá přímá korelace mezi dávkou malathionu nebo stupněm inhibice AChE a výsledným oxidativním poškozením (Abdollahi et al., 2004; Akhgari et al., 2003; Fortunato et al., 2006; Possamai et al., 2007). Intraperitoneální podání 1 mg.kg⁻¹malathionu (odpovídá 25 % LD₅₀) vedlo po 24 hodinách od intoxikace k výraznému nárůstu koncentrace TBARS v prefrontálním kortexu myšního mozku. Zatímco dávka 1,25 mg.kg⁻¹ podaná intramuskulárně nevyvolala v myším kortexu a hipokampu žádnou změnu u pozorovaných parametrů oxidačního (Da Silva et al., 2008; dos Santos et al., 2011). V prvním případě vedla okamžitá administrace oximu K027 (v kombinaci s 20 mg.kg⁻¹ atropinu) ke snížení hladin TBARS, což naznačuje preventivní účinnost oximu vůči oxidačnímu stresu navozenému malathionem. Ve stejné studii byl použit také oxim K048. Jeho podání ale nemělo na oxidační stres žádný účinek. Tento výsledek koreluje s nižší reaktivační účinností oximu K048 vůči AChE inhibované malathionem (Da Silva et al., 2008). V další studii byla antidotní terapie v podobě 2-PAM a oximu K074 podána myším až 6 hodin po otravě malathionem. Ani jeden z těchto oximů nevykázal žádnou významnou schopnost reaktivovat AChE v kortikální a hipokampální oblasti mozku a zároveň nebyl pozorován žádný vliv na oxidační stres. Pokud byla terapie oximy kombinována s atropinem (20 mg.kg⁻¹) byla nalezena zvýšená aktivita antioxidantních enzymů glutathionreduktasy (GR), GPx a CAT, ale žádný vliv na hladiny oxidovaných lipidů (dos Santos et al., 2011).

Profylaktický účinek 2-PAM vůči oxidativnímu poškození byl zkoumán také v případě otravy dichlorvošem. Tento OP v souvislosti s oxidačním stresem vykazuje významnou kardiotoxicitu a neurotoxicitu (Wani et al., 2011; Kose et al., 2010). Kose et al. (2010) podávali 2-PAM potkanům 5 minut před intoxikací dichlorvošem (30 mg.kg⁻¹). V potkaním séru a srdeční tkáni odebraných 6 hodin po expozici nebyly nalezeny žádné známky oxidačního stresu, a to ani v případě pre-expozičního podání

2-PAM. Pokud byl zároveň s profylakticky podaným 2-PAM podáván také atropin ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), došlo stejně jako v případě malathionu k nárůstu oxidačního stresu. Je tedy otázkou, zda neexistuje negativní synergický vztah mezi inhibicí AChE, antagonismem na muskarinových receptorech a indukcí oxidačního stresu.

V dalším experimentu byly potkanům bezprostředně po intoxikaci dichlorvošem podány reaktivátory K027, K203, LüH-6, TMB-4, 2-PAM a HI-6 v dávce odpovídající 5 % jejich LD_{50} . Po 60 minutách od intoxikace byly nalezeny zvýšené hladiny ukazatelů oxidačního stresu (TBARS a aktivity antioxidantních enzymů) jak v plasmě, tak v mozkové tkáni. Obecně terapie LüH-6, TMB-4, 2-PAM, HI-6 a oximem K027 vedla v plasmě ke zvýšení aktivity antioxidantních enzymů nebo ke snížení hladin markerů oxidace lipidů a proteinů, což značí protektivní účinek těchto reaktivátorů AChE vůči oxidačnímu stresu. U všech použitých oximů, vyjma obidoximu, došlo zároveň k poklesu TBARS i v mozkové tkáni (Antonijevic et al., 2018).

Reaktivální účinnost konvenčně používaných reaktivátorů vůči AChE inhibované tabunem je zejména v centrálním nervovém systému velmi nízká. LüH-6 a TMB-4 vykazují reaktivální účinnost hlavně v periferních tkáních, avšak jejich schopnost penetrovat skrz hematoencefalickou bariéru je značně omezená. Schopnost oximu HI-6 reaktivovat AChE inhibovanou tabunem je nízká v obou kompartmentech (Cabal et al., 2004; Kassa et al., 2008). Schopnost tabunu ovlivnit redoxní homeostázu je ve velké míře závislá na jeho dávce a délce expozice. Lze ale říci, že intoxikace tabunem vede k nárůstu oxidačního stresu. Profylaktické podání LüH-6, TMB-4, HI-6, oximu K203 a KR-22836 ($60 \mu\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$), které proběhlo 5 minut před intoxikací tabunem, vedlo ke snížení hladin LMWA v plasmě, což naznačuje jejich schopnost redukovat oxidační stres. Nebyla však nalezena žádná přímá korelace mezi reaktivální účinností a protektivními vlastnostmi vůči oxidačnímu stresu (Pohanka et al., 2011a). V jiném experimentu, kdy byly reaktivátory HI-6, LüH-6, TMB-4, K347 a K628 podávány profylakticky v dávce odpovídající 5 % LD_{50} , naopak nedošlo k významnému ovlivnění ukazatelů oxidačního stresu (Pohanka et al., 2009). Ve studii Berendové et al. (2012) vedlo bezprostřední podání oximu K203 v dávce odpovídající 5 a 25 % LD_{50} v některých případech dokonce k nárůstu enzymové aktivity SOD a zvýšení koncentrace TBARS. Použití reaktivátoru HLö-7 vedlo u potkanů intoxikovaných tabunem k výraznému poklesu hladin 3-NT (v porovnání se zvířaty bez antidotní terapie), a to jak v srdci, tak v ledvinách (Dimov et al., 2015).

Tabulka č. 2: Změny v parametrech oxidačního stresu u zvířat intoxikovaných organofosfáty a vliv antidotní terapie

OXIM	ORGANOFOSFÁT	dávka	časový interval	zvíře	tkáň	expoziční OP	vliv OXIMU
2-PAM^a K074	malathion 1,25 g.kg⁻¹, s.c.	25 % LD₅₀, i.m. 2-PAM 66 mg.kg⁻¹ K074 5,8 mg.kg⁻¹ podány 6 hodin po expozici malathionu samostatně/v kombinaci s atropinem (20 mg.kg ⁻¹)	24 hodin po aplikaci malathionu	myš	prefrontální kortex	~ GR ~ GPx ~CAT~TBARS	↑GR, ↑GPx (K074, 2-PAM) + atropin* ↑CAT (2-PAM) + atropin* ~TBARS*
					hipokampus	~ GR ~ GPx ~CAT~TBARS	↑GR (K074, 2-PAM) + atropin* ↑GPx, ↑CAT (2-PAM) + atropin* ~TBARS*
K027^b K048	malathion 1,0 mg.kg⁻¹, s.c.	25 % LD₅₀, i.p. K027 150 mg.kg⁻¹ K048 180 mg.kg⁻¹ podány bezprostředně po expozici malathionu v kombinaci s atropinem (20 mg.kg ⁻¹)	3 a 24 hodin po aplikaci malathionu	myš	prefrontální kortex	↑ TBARS (24 h)* ~ GPx ~ GR ~GSH	↓TBARS (K027, 24 h) + atropin** ~GPx ~GR ~GSH
2-PAM^c	dichlorvos 30 mg.kg⁻¹, i.p.	40 mg.kg podán 5 minut před aplikací dichlorvosu samostatně/v kombinaci s atropinem (10 mg.kg ⁻¹)	6 hodin po aplikaci dichlorvosu	myš	sérum	~T-SH ~TBARS ~CAT	↑T-SH (2-PAM)* ~ TBARS, ~CAT
					srdce	~SH ~TBARS ~CAT	~T-SH, ~TBARS, ~CAT
K027^d K203 LüH-6 TMB-4 2-PAM HI-6	dichlorvos 6,7 mg.kg⁻¹, s.c.	5 % LD₅₀, i.m. K027 56,3 mg.kg⁻¹ K203 16,3 mg.kg⁻¹ LüH-6 8,7 mg.kg⁻¹ TMB-4 11,4 mg.kg⁻¹ 2-PAM 14,4 mg.kg⁻¹ HI-6 39,9 mg.kg⁻¹ podány bezprostředně po expozici dichlorvosu	60 minut po aplikaci dichlorvosu		plazma	↓ SOD* ↓ PON* ↑ T-SH* ↑ TBARS* ~AOPP	~SOD, ~T-SH ↑PON (LüH-6, TMB-4, 2-PAM) ↓ TBARS (LüH-6) ↓AOPP (K027, 2-PAM, HI-6)
					mozek	~SOD ~T-SH ↑ TBARS* ~AOPP	~SOD, ~T-SH, ~ AOPP ↓TBARS (K027, K203, LüH-6, TMB-4, 2-PAM, HI-6)
HI-6^e LüH-6 TMB-4 K347 K628	tabun LD₅₀ 170 µg.kg⁻¹, i.m.	5 % LD₅₀, i.m. HI-6 39,0 mg.kg⁻¹ LüH-6 10,5 mg.kg⁻¹ TMB-4 7,5 mg.kg⁻¹ K347 29,3 mg.kg⁻¹ K628 1,0 mg.kg⁻¹ podány 5 minut před aplikací tabunu v kombinaci s atropinem (21 mg.kg ⁻¹)	30 min po aplikaci tabunu	potkan	plazma	~LMWA (tabun + atropin)	↑LMWA (HI-6, K628) + atropin*
					mozek	~LMWA (tabun + atropin)	~ LMWA

HI-6^f LüH-6 TMB-4 K203 KR-22836	tabun 180 µg.kg⁻¹, i.m.	60 µmol.kg⁻¹, i.m. HI-6, LüH-6, TMB-4, K203, KR-22836 aplikovány 5 minut před intoxikací tabunem v kombinaci s atropinem (21 mg.kg ⁻¹)	1 hodina po aplikaci tabunu	potkan	plazma	↑LMWA (tabun + atropin)*	↑ LMWA (HI-6, LüH-6) + atropin* ↓ LMWA (HI-6, LüH-6, TMB-4, K203, KR-22836) + atropin**
K203^g	tabun 75 % LD₅₀ 238 µg.kg⁻¹, s.c.	5 a 25 % LD₅₀, i.p. podán 1 minutu po aplikaci tabunu samostatně/v kombinaci s atropinem (10 mg.kg ⁻¹)	0,5, 1, 6 a 24 hodin po aplikaci K203	potkan	plazma	↓TBARS (0,5, 1 h)* ↑SOD (0,5, 1, 6 h)*	↑TBARS 0,5 h: 5 % LD₅₀ K203 + atropin 25 % LD₅₀ K203 + atropin 1h: 5 % LD₅₀ K203 25 % LD₅₀ K203, 5 % LD₅₀ K203 + atropin 25 % LD₅₀ K203 + atropin 6 h: 5 % LD₅₀ K203 24 h: 5 % LD₅₀ K203 + atropin 25 % LD₅₀ K203 + atropin** ↓SOD 0,5 h, 1 h, 6h: 5 % LD₅₀ K203 25 % LD₅₀ K203 5 % LD₅₀ K203 + atropin 25 % LD₅₀ K203 + atropin 24 h: 5 % LD₅₀ K203 + atropin 25 % LD₅₀ K203 + atropin**
HLö-7^h	tabun 50 % LD₅₀ 140 µg.kg⁻¹, i.m.	16.7 mg.kg⁻¹, i.m. podán 1 minutu po aplikaci tabunu samostatně/v kombinaci s atropinem (10 mg.kg ⁻¹)	24 hodin po aplikaci tabunu	potkan	srdce	↑3-NT*	↓3-NT**
					ledviny	↑3-NT*	~3-NT**

* výsledky v porovnání s kontrolní skupinou, ** výsledky v porovnání se skupinou, které byl aplikován OP, ↑nárůst, ↓ pokles, ~ nezměněný

3-NT – 3-nitrotyrosin, **AOPP** – produkty pokročilé oxidace proteinů, **CAT** – aktivita katalasy, **GPx** – aktivita glutathion peroxidasy, **GR** – aktivita glutathion reductasy, **i.m.** – intramuskulární, **i.p.** – intraperitoneální, **LMWA** – nízkomolekulární antioxidanty, **PON** – aktivita paraoxonasy, **s.c.** - subkutánní, **SOD** – aktivita superoxid-dismutasy, **TBARS** – substance reagující s kyselinou thiobarbiturovou, **T-SH** – celkové množství thiolů,

^ados Santos et al., 2011; ^bda Silva et al., 2008; ^cKose et al., 2010; ^dAntonijevic et al., 2018; ^ePohanka et al., 2009; ^fPohanka et al., 2011a;

^gBerend et al., 2012; ^hDimov et al., 2015

1.3.4. Benzodiazepiny

Diazepam patří společně s atropinem a oximovými reaktivátory AChE mezi základní léčiva v terapii otrav OP. Jedná se o antikonvulzivní látku podávanou za účelem prevence poškození mozku způsobeného nadměrnou epileptickou aktivitou a ke zmírnění úzkosti doprovázející intoxikaci OP. Diazepam se používá převážně v terapii otrav NPL, kde je výskyt svalových křečí a konvulzí daleko častější, než je tomu u otrav pesticidy (Eddleston & Chowdhury, 2016; Yang & Deng, 2007). Dalším léčivem ze skupiny benzodiazepinů, které je alternativně testováno v terapii otrav OP, je midazolam (Reddy & Reddy, 2015).

V současnosti není známa *in vivo/in vitro* studie, která by prokázala vliv benzodiazepinů na oxidační stres indukovaný OP. Jednorázové podání diazepamu potkanům však vedlo k výraznému poklesu hladin TBARS a aktivity SOD v mozkové kůře, mozečku a mozkovém kmeni, kde byly tyto změny nejvýraznější (Musavi & Kakkar, 1998). Existuje několik možných mechanismů, jakými může diazepam ovlivňovat redoxní homeostázu v organismu. Diazepam, jako pozitivní alosterický modulátor receptorů γ -aminomáselné kyseliny typu A ($GABA_A$), zesiluje inhibiční účinek tohoto neuromediátoru a tím mírní následky excitotoxicity a oxidačního stresu vyvolaného OP. Významnou roli hraje také specifický periferní benzodiazepinový receptor/translokační protein (TSPO), který se vyskytuje na vnější mitochondriální membráně. Jeho stimulace vede ke zvýšené oxidaci kardiolipinu, následnému uvolnění cytochromu *c* z dýchacího řetězce do cytosolu a buněčné smrti. Aktivace TSPO také pravděpodobně zesiluje $GABA_A$ ergní neurotransmisí skrz $GABA_A$ receptor a tím tlumí procesy spojené se zvýšenou tvorbou ROS/RNS (Sarnowska et al., 2009). Zároveň také diazepam snižuje aktivitu neuronální NOS. Po podání diazepamu byly nalezeny snížené hladiny NO a produktů peroxidace lipidů ve frontálním kortexu, hipokampu a středním mozku potkanů (Rajasekaran, 2005).

1.3.5. Alternativní přístupy v terapii otrav OP

Kromě konvenčního postupu při antidotní profylaxi/terapii otrav OP v podobě atropinu, oximových reaktivátorů AChE a benzodiazepinů existuje řada alternativních přístupů testovaných za účelem snížení negativních dopadů otrav OP, včetně oxidačního stresu (Masson, 2011). V profylaxi se uplatňují např. reverzibilní inhibitory AChE

karbamátového typu (pyridostigmin), které ochraňují enzym před nevratnou inhibicí způsobenou OP. Jejich účinek je ještě posílen kombinací s centrálně účinkujícími anticholinergními léčivy (benaktyzin, trihexyfenidyl; Kuča et al., 2013). Pokud byl potkanům podán samotný pyridostigmin, nedošlo k žádné významné indukci oxidačního stresu. Pokud byl však pyridostigmin podáván při intoxikaci sarinem, došlo k negativnímu ovlivnění redoxní rovnováhy (Abu-Quare & Abou-Donia, 2001; Husain & Somani, 2004). Nárůst oxidačního stresu byl ještě intenzivnější v přítomnosti zvýšené fyzické aktivity a za hypotermických podmínek (Halдар et al., 2014; Husain & Somani, 2004). Oxidační stres vyvolaný touto kombinací pyridostigminu, OP a vnějšího stresu je považován za možný patofyziologický podklad syndromu války v Perském zálivu, který se projevuje svalovou únavou a bolestí, poruchami kognitivních funkcí a úzkostně-depresivními stavy (Parihal et al., 2013; Abdel-Rahman et al., 2004).

Antioxidanty jsou další skupinou látek, které byly testovány v profylaxi a terapii otrav OP. Jejich výhodou (při podání v terapeutické dávce) je relativně vysoká efektivita a zároveň minimum nežádoucích účinků. Vitamin C a vitamin E jsou antioxidanty schopné vylučovat ROS/RNS. U zvířat exponovaných OP pesticidům, chlorpyrifosu a fenthionu, způsobily významný pokles hladin markerů oxidačního stresu (Cemek et al., 2010; Yu et al., 2008). N-acetylcystein (NAC) má schopnost jak přímé reakce s ROS, tak zároveň slouží jako prekurzor GSH. Na druhou stranu u potkanů vystavených působením paraoxonu nemělo podání NAC, GSH, ani vitaminu C žádný protektivní účinek (Nurulain et al., 2013). Naopak antioxidační efekt vykázaly nově připravené oximy, 3-(fenyldiazono)-butan-2-on a butan-2,3-dionthio-semikarbazon. Nicméně pro posouzení jejich celkového přínosu je potřeba získat data o jejich reaktivační účinnosti (Puntel et al., 2008; Puntel et al., 2009). Aby se však celkově prokázal skutečný přínos antioxidantů v rámci antidotní terapie intoxikací OP, bude nezbytné další preklinické testování.

Vztah k oxidačnímu stresu byl také hodnocen u konjugátu atropinu a oximu, atropin-4-pyridinaldoximu. Tato látka dosáhla dobré reaktivační účinnosti, nezpůsobovala oxidační stres, ale nevykazovala žádnou významnou anticholinergní aktivitu a její akutní toxicita byla vysoká (Lovrić et al., 2011). Kombinovaný anticholinergní a antiglutamatergní účinek vykazují tzv. multifunkční neuroprotektanty, mezi které patří benaktyzin a procyklidin. Antagonismus na NMDA a muskarinových receptorech pomáhá snižovat aktivitu NOS a s tím spojenou produkci ROS/RNS po intoxikaci OP

(Myhrer et al., 2008; Weissman & Raveh, 2011). Nicméně i zde bude pro zhodnocení jejich účinku nezbytné další testování.

1.4. Oxidační stres v patofyziologii onemocnění

Oxidační stres je také považován za jeden z mechanismů vzniku a rozvoje řady onemocnění. Zvýšená tvorba ROS/RNS v průběhu zánětlivé odpovědi může způsobit poškození okolní tkáně. Tento stav je často spojován s chronickými zánětlivými onemocněními, např. revmatoidní artritidou. Zánět společně se zvýšenou koncentrací oxidované formy lipoproteinu o nízké hustotě přispívá také ke vzniku aterosklerotických plátů (Valko et al., 2007). Oxidační stres vyvolaný hyperglykemií vede ke glykaci/lipoxidaci enzymů a strukturních proteinů a tím se podílí na rozvoji diabetu (Giustarini et al, 2009). Oxidativní poškození DNA, následované poruchami replikace, transkripce a narušení genomové stability mají významnou roli v procesu karcinogeneze (Halliwell, 2007). Protože jsou neuronální buňky velmi citlivé na změny v redoxní homeostáze, zaujímá oxidační stres významnou roli také v patogenezi neurodegenerativních onemocnění. Oxidativní poškození neuronů, které se navíc kumuluje s věkem, přispívá v různých oblastech CNS ke vzniku onemocnění jako jsou Alzheimerova nebo Parkinsonova choroba (Chen et al, 2012).

1.4.1. Oxidační stres a Alzheimerova choroba

Alzheimerova choroba (AD) patří mezi nejrozšířenější formy demence postihující převážně seniorskou populaci. Onemocnění je charakterizováno poklesem kognitivních funkcí způsobeným narušením cholinergního systému, ztrátou funkčních neuronů a vznikem mozkových lézí. K těmto neurodegenerativními změnám dochází v důsledku hyperfosforylace tau proteinu, který tak ztrácí svou stabilizační funkci pro mikrotubuly nervových buněk, a formováním nedegradovatelných neurotoxických amyloidních plaků v mozkové tkáni (Chmátalová & Skoumalová, 2014). Významnou roli u těchto patofyziologických procesů sehraává oxidační stres. Akumulace amyloid beta peptidu (A β), hlavní složky senilních plaků, vede v přítomnosti iontů přechodných kovů k produkci ROS/RNS (Huang et al., 2016; Zhao & Zhao, 2013; Cheignon et al., 2017). Jeden z možných mechanismů, kterým A β spouští zvýšenou tvorbu ROS/RNS, je jejich vliv na NMDA receptory. Jejich aktivací dochází k masivnímu influxu Ca²⁺ do postsynaptických nervových buněk, což způsobuje poruchy mitochondriálních funkcí a zvýšenou aktivitu NOS (Milatovic et al., 2006). Zvýšené hladiny ROS byly nalezeny

v mozkomíšním moku pacientů s AD. Jednalo se např. o oxidované/nitrované proteiny (Tohgi et al., 1999; Aoyama et al., 2000; Ahmed et al., 2005), produkty peroxidace lipidů (Montine et al., 1998; Praticò et al., 2000; Lovell et al., 1997), oxidativní poškození DNA (Lovell & Markesbery, 2001; Abe et al., 2002) nebo alterace v antioxidačním systému (Jiménez-Jiménez et al., 1997; Gumusyayla et al., 2016).

Memantin je nekompetitivní antagonist NMDA receptorů a patří společně s reverzibilními inhibitory AChE (např. donepezil a rivastigmin) do skupiny léčiv užívaných v terapii AD (Parsons et al., 2013). Blokáda NMDA receptorů vede ke snížení fosforylace tau proteinu a brání nadměrné akumulaci A β , což se pozitivně projevuje i v oblasti oxidačního stresu (Mondragon-Rodriguez et al., 2012; Song et al., 2008).

2. Cíl práce

Cílem předkládané disertační práce bylo zavedení, vývoj, optimalizace a validace HPLC metod pro stanovení biomarkerů oxidačního stresu, které budou kompatibilní s různými biologickými matricemi.

Dílčím cílem bylo tyto metody otestovat pro klinicky zavedená antidota proti NPL ze skupiny oximových reaktivátorů AChE za účelem vytvoření standardizovaného postupu pro hodnocení oxidačního stresu *in vitro* v rámci posuzování toxicity nových potenciálních léčiv, vyvíjených na Katedře toxikologie a vojenské farmacie Fakulty vojenského zdravotnictví.

V poslední řadě, bylo cílem optimalizovat zavedené chromatografické metody pro stanovení markerů oxidativního poškození v mozkomíšním moku.

3. Materiál a metodika

3.1. Chemikálie a kultivační média

Kultivační médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) se zvýšeným obsahem glukosy ($4,5 \text{ g.l}^{-1}$) a L-glutaminem ($62,6 \text{ mg.l}^{-1}$), fetální bovinní sérum (FBS), trypsin (0,25 %; EDTA/HBSS pufr) a gentamicin-sulfát (GS; 50 mg.ml^{-1}) byly zakoupeny u Biosera (Nuaille, Francie).

Kultivační médium Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM^b) bez fenolové červeni, se zvýšeným obsahem glukosy ($4,5 \text{ g.l}^{-1}$) a L-glutaminem ($4,0 \text{ mmol.dm}^{-3}$) a solný fosfátový pufr pro buněčnou kultivaci (PBS; $0,0067 \text{ M}$) byly zakoupeny u GE Healthcare Life Sciences (South Logan, TX, USA).

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl-tetrazolium bromid (MTT), 3-nitro-L-tyrosin (3-NT), 3-nitro-L-tyrosin- $^{13}\text{C}_9$ ($^{13}\text{C}_9$ 3-NT), acetonitril pro LC-MS (ACN), borohydrid sodný (NaBH_4), činidlo pro stanovení proteinového obsahu dle Bradfordové (Coomassie brilantní modř G-250), dimethylsulfoxid (DMSO), DNPH, Dragendorffovo činidlo, glutaraldehyd (GLA), hovězí sérový albumin (BSA), hydroxid sodný (NaOH), kyselina 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoová) (DTNB), kyselina mravenčí (FA), kyselina octová (AA), kyselina trichloroctová (TCA), MDA-tetrabutylamonná sůl, metanol pro LC-MS (MeOH), octan amonný (AmA), oxidovaná forma L-glutathionu (GSSG), *p*-aminobenzoová kyselina (PABA), PBS ve formě tablet (PBS*), redukovaná forma L-glutathionu (GSH) a *tert*-butylhydroperoxid (*t*-BOOH), byly zakoupeny u Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Etanol (EtOH) byl zakoupen u Lach-Ner (Neratovice, Česká republika).

Kyselina chlorovodíková (HCl) byla zakoupena u Penta (Praha, Česká republika).

3.2. Buněčná kultura

HepG2 buněčná linie byla zakoupena u American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) a před provedením experimentů uchovávaná při $-150 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.3. Sterilní plast a spotřební materiál

Kultivační lahve (25, 75 a 150 cm²), sérologické pipety (1, 2, 5, 10 a 25 ml), buněčné škrabky, centrifugační zkumavky (15 ml), číré polystyrenové 96jamkové mikrotitrační destičky byly zakoupeny u Techno Plastic Products (Trasadingen, Švýcarsko).

Centrifugační mikrozkušavky (1,5, 2 a 5 ml) byly zakoupeny u Eppendorf (Hamburk, Německo).

Phenomenex Strata C-18-E (55 μm, 70 Å) 100 mg, 3 kolonka pro extrakci na tuhé fázi (SPE) byla pořízena u Phenomenex (Torrance, CA, USA).

3.4. Instrumentace

Inkubátor CO₂ CB 160 (Binder, Tuttlingen, Německo)

Centrifuga Hettich UNIVERSAL 320 / 320 R (Hettich, Tuttlingen, Německo)

Výrobník utračisté vody (H₂O) na bázi reverzní osmózy typ 06 (AquaOsmotic, Tišnov, Česká republika)

pH metr 3510 pH Meter (Jenway, Staffordshire, Velká Británie)

Ultrazvukový homogenizátor UP50H Compact Lab Homogenizer (Hielscher Ultrasonics, Teltow, Německo)

Blokový termostat MBT-250 Metal Block Thermostat (Kleinfeld Labortechnik, Gerden, Německo)

Třepačka s chlazením a ohřevem MTC-100 Thermo Shaker Incubator (Hangzhou MIU Instruments, Hanzghou, Čína)

Vakuová odsávací souprava pro extrakci na tuhé fázi Visiprep 24 DL (Supelco, Belfonte, PA, USA)

Vakuový koncentrátor Univapo 100 ECH (UNIEQUIP, Planegg, Německo)

HPLC sestava (Thermo Finnigan Surveyor Plus) tvořená kvartérní pumpou s integrovanou odplyňovací jednotkou (Surveyor MS Pump Plus), automatickým dávkovačem vzorků (Surveyor Autosampler Plus) a UV-VIS spektrofotometrickým detektorem s diodovým polem (Surveyor PDA Plus) ve spojení s hmotnostním detektorem Thermo Scientific LTQ XL vybaveným lineární iontovou pastí; software Xcalibur verze 2.5.0 (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA)

Chromatografická separační kolona Phenomenex LUNA C18(2) (150 × 3,0 mm, 3 μm, 100 Å) vybavená předkolonou SecurityGuard Cartridge C18 (4 × 2 mm; Phenomenex)

HPLC sestava (Agilent 1260 Infinity) tvořená kvartérní pumpou, odplyňovací jednotkou, automatickým dávkovačem vzorků a UV-VIS detektorem; software Agilent ChemStation for LC 3D systems (Agilent, Palo Alto, CA, USA)

Chromatografická separační kolona Phenomenex KINETEX C18 (150 × 2,1 mm, 2,6 μm, 100 Å) vybavená předkolonou SecurityGuard Ultra Cartridge C18 (4 × 2 mm; Phenomenex)

Multifunkční destičkovým reader Paradigm Detection Platform (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)

3.5. Vývoj LC-MS/MS metody pro simultánní stanovení MDA a 3-NT z HepG2 buněčné matrice a zavedení metody pro hodnocení thiolové redoxní rovnováhy pomocí HPLC-UV/VIS

3.5.1. Kultivace a pasážování buněk

Po rozmražení byla HepG2 buněčná suspenze přidána k 10 ml DMEM kultivačního média v 15 ml zkumavce a odstředěna při 220 × g a 21 °C po dobu 5 minut. Po odstranění média byla buněčná peleta resuspendována v 1 ml DMEM obohaceného o 10% FBS a 0,1% GS (dále DMEM^a), přenesena do 25 cm² kultivační lahve s DMEM^a (celkový objem 5 ml) a dále byly buňky kultivovány při 37 °C a atmosféře s 5 % CO₂ a relativní vlhkostí 95 %. Při dosažení konfluence cca 90 % byly buňky pasážovány zpravidla v poměru 1:3. Buňky byly z povrchu kultivační lahve uvolněny působením trypsinu a postupně přenášeny do 75 a 150 cm² kultivačních lahví.

3.5.2. Indukce oxidačního stresu

Roztoky peroxidu určené pro indukci oxidačního stresu byly připraveny v DMEM^b kultivačním médiu ve třech koncentračních hladinách *t*-BOOH: 100, 500 a 1000 μmol.dm⁻³. Samotné DMEM^b médium sloužilo jako negativní kontrola. V den experimentu bylo ze 150 cm² kultivačních lahví odstraněno DMEM^a a HepG2 buňky byly propláchnuty 10 ml PBS. Poté bylo k buňkám přidáno 20 ml DMEM^b/roztoku *t*-

BOOH a buňky byly inkubovány 1, 4 a 24 hodin (37 °C, 5 % CO₂). Po uplynutí doby expozice bylo kontrolní/experimentální médium odstraněno. Buňky byly dvakrát propláchnuty 10 ml PBS a z povrchu buněčné lahve odstraněny pomocí buněčné škrabky. Vzniklá buněčná suspenze byla odstředěna při 220 × g a 21 °C po dobu 5 minut a výsledná buněčná peleta byla uchována v -80 °C až 1 měsíc. Experiment probíhal pro každou koncentrační hladinu v daném časovém intervalu v triplikátu.

3.5.3. Stanovení buněčné viability pomocí MTT testu

Buněčná viabilita byla stanovena metodou dle Múčkové et al. (2018). HepG2 buňky resuspendované v DMEM^a byly nasazené do 96jamkové mikrotitrační destičky (100 µl) v hustotě 15 × 10³ buněk na jamku a přes noc ponechány v inkubátoru (37 °C, 5% CO₂). Po odsátí média byly k buňkám přidány roztoky *t*-BOOH o koncentraci 100, 500 a 1000 µmol.dm⁻³ připravené v DMEM^b. Samotné DMEM^b sloužilo jako negativní kontrola. Buňky byly poté inkubovány 1, 4 a 24 hodin. Po uplynutí inkubační doby bylo kontrolní/experimentální médium odsáto a nahrazeno 100 µl čerstvě připraveného roztoku MTT v DMEM^b o koncentraci 0,5 mg.ml⁻¹. Buňky byly následně inkubovány po dobu 45 minut a poté bylo médium obsahující MTT odsáto. Vzniklé fialové krystaly formazanu kumulující se ve viabilních buňkách byly rozpuštěny ve 100 µl DMSO. Po 5 minutovém promíchání byla změřena optická hustota pomocí multifunkčního destičkového readeru při vlnové délce 570 nm. Experiment probíhal pro každou koncentrační hladinu v daném časovém intervalu v triplikátu.

3.5.4. Zpracování buněčné pelety

Po rozmrazení za pokojové teploty byla buněčná peleta resuspendována v 1 ml PBS a intracelulární obsah HepG2 buněk byl uvolněn za použití ultrazvukového homogenizátoru (amplituda 100 %, 8 minut). Po odstředění při 3500 × g a 4 °C po dobu 10 minut byl vzniklý supernatant rozdělen na 4 části: pro LC-MS/MS stanovení MDA a 3-NT, pro HPLC-UV/VIS stanovení NP-SH, pro HPLC-UV/VIS stanovení NP-SS-NP a pro spektrofotometrické stanovení intracelulárního obsahu proteinu.

3.5.5. Roztoky pro přípravu vzorků k chromatografické analýze

Roztok NaOH o koncentraci $6 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ určený k alkalické hydrolyze proteinově vázaných MDA a 3-NT byl připraven rozpuštěním 2,40 g NaOH v 10 ml H₂O.

10 ml zásobního roztoku GLA ($1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) bylo připraveno zředěním komerčně dostupného 25% vodného roztoku GLA (w/w). Roztok byl uchováván při teplotě $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Zásobí roztok [¹³C₉]3-NT ($1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) byl připraven rozpuštěním 2,35 mg [¹³C₉]3-NT ve 2 ml H₂O. Roztok byl uchováván při teplotě $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Směsný pracovní roztok vnitřních standardů (IS) GLA ($8 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a [¹³C₉]3-NT ($4 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) byl připraven zředěním jejich zásobních roztoků o koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ H₂O.

Zásobní roztok MDA ($1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) byl připraven rozpuštěním 3,14 mg MDA (terabutylamonná sůl) v 10 ml H₂O. Roztok byl uchováván při teplotě $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Zásobí roztok 3-NT ($1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) byl připraven rozpuštěním 2,26 mg 3-NT v 10 ml H₂O. Roztok byl uchováván při teplotě $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Směsný pracovní roztok standardů MDA ($10 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a 3-NT ($5 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$) byl připraven zředěním jejich zásobních roztoků o koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ H₂O/buněčným homogenátem.

Precipitační roztok 35% TCA (w/w) byl připraven rozpuštěním 3,50 g TCA v 6,50 g H₂O.

Derivatizační roztok DNPH o koncentraci $5 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ byl připraven rozpuštěním 9,90 mg DNPH v 10 ml ACN:FA (98:2, v/v).

1 l octanového pufru složený z AmA ($10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$) a AA (0,1%); pH 4,5 byl připraven rozpuštěním 770,81 mg AmA v H₂O a přidáním 1 ml AA.

Roztok PBS o koncentraci $0,15 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (pH 7,5) byl připravený rozpuštěním tablety PBS* v příslušném množství H₂O a pH bylo upraveno pomocí NaOH.

Roztok PBS o koncentraci $0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ (pH 7,5) byl připravený rozpuštěním tablety PBS* v příslušném množství H₂O a pH bylo upraveno pomocí NaOH.

Roztok PBS o koncentraci $0,5 \text{ mol.dm}^{-3}$ (pH 10) byl připravený rozpuštěním tablety PBS* v příslušném množství H_2O a pH bylo upraveno pomocí NaOH.

Derivatizační roztok DTNB (10 mg.ml^{-1}) byl připraven rozpuštěním 100 mg DTNB v 10 ml roztoku PBS ($0,15 \text{ mol.dm}^{-3}$).

Roztok NaBH_4 (100 mg.ml^{-1}) určený k redukci disulfidické vazby byl připraven rozpuštěním 1000 mg NaBH_4 v 10 ml roztoku PBS ($0,15 \text{ mol.dm}^{-3}$).

3.5.6. Úprava vzorku pro stanovení MDA a 3-NT

Ke 250 μl buněčného homogenátu v centrifugační mikrozkuhavce bylo přidáno 50 μl NaOH (6 mol dm^{-3}) a směs byla inkubována v blokovém termostatu při $60 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 3 hodin. Následně byl vzorek zchlazen na ledu a bylo k němu přidáno 50 μl směšného roztoku IS. Směs byla precipitována přidáním 150 μl 35% TCA a odstředěna při $2800 \times g$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 minut. Poté bylo 450 μl supernatantu přeneseno do nové centrifugační mikrozkuhavky obsahující 50 μl derivatizačního roztoku DNPH (5 mmol.dm^{-3}). Derivatizace probíhala v termotřepače při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a 300 otáček za minutu (RPM) bez přístupu světla. Derivatizované vzorky byly přečištěny pomocí SPE. Kolonka pro SPE byla prekonkondicionována pomocí 3 ml MeOH a promyta 3 ml H_2O . Poté bylo nanášeno 500 μl vzorku a kolonka byla propláchnuta 500 μl octanového pufru. Analyty byly z SPE kolonky eluovány 1 ml směsí octanový pufr:MeOH (4:96, v/v) do centrifugační mikrozkuhavky. Poté byly vzorky odpařeny dosucha ve vakuovém koncentrátoru a rekonstruovány přidáním 450 μl octanového pufru. Vzorek byl přenesen do skleněné vialky a analyzován pomocí LC-MS/MS.

3.5.7. LC-MS/MS podmínky pro stanovení MDA a 3-NT

Separace jednotlivých analytů byla prováděna pomocí HPLC sestavy (Thermo Finnigan Surveyor Plus) na chromatografické koloně Phenomenex LUNA C18(2). Mobilní fáze (MF) byla tvořena vodnou složkou A (octanový pufr) a organickou složkou B (MeOH). Chromatografická separace byla prováděna při konstantním průtoku MF $450 \mu\text{l.min}^{-1}$ v režimu gradientové eluce za následujících podmínek (A:B): 0-1,0 min (90:10), 1,1-2,0 min (10:90), 2,0-3,0 min (10:90), 3,1-8,0 min (4:96), 8,1 min (90:10), 8,1-10,0 min (90:10). Na chromatografické koloně uložené v termostatu byla udržována teplota $37 \text{ }^\circ\text{C}$ a teplota autosampleru byla nastavena na $10 \text{ }^\circ\text{C}$. Objem nastříkovaného vzorku byl 20 μl . Pro hmotnostně spektrometrickou detekci analytů pomocí lineární

iontové pasti (Thermo Scientific LTQ XL) byla aplikována chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) v pozitivním módu. APCI parametry byly následující: teplota iontového zdroje 400 °C, výbojová elektroda (jehla) 5 µA, teplota kapiláry 275 °C, průtok sušícího plynu 60 arb a průtok zamlžujícího plynu 5 arb. Analýza probíhala v režimu monitorování vybraných reakcí (SRM) při jejich kolizi indukované disociaci (CID): m/z 227 $[M+H^+] \rightarrow m/z$ 181 pro 3-NT (CID = 26 eV), m/z 236 $[M+H^+] \rightarrow m/z$ 189 pro $[^{13}C_9]3\text{-NT}$ (CID = 35 eV), m/z 235 $[M+H^+] \rightarrow m/z$ 159 + 189 pro MDA (CID = 15 eV), m/z 478 $[M+NH_4^+] \rightarrow m/z$ 263 + 461 pro GLA (CID = 35 eV).

3.5.8. Kvantitativní analýza pomocí LC-MS/MS

Vzorčky standardů pro sestavení kalibračních křivek byly připraveny přidáním příslušného množství směšného pracovního roztoku MDA a 3-NT k buněčnému homogenátu. Buněčný homogenát, získaný ultrazvukovou homogenizací neovlivněné HepG2 buněčné pelety (viz kapitola 3.5.4.), byl zředěn pomocí PBS tak, aby výsledná koncentrace intracelulárního proteinu byla 1 mg.ml⁻¹. Kalibrační vzorky (250 µl) byly dále zpracovány postupem popsaným v kapitole 3.5.6. a výsledná přidaná koncentrace standardů pokrývala rozsah 0,025 - 4,00 nmol.ml⁻¹ (nmol.mg⁻¹ proteinu) pro MDA a 0,0125 - 2,00 nmol.ml⁻¹ (mg⁻¹ proteinu) pro 3-NT (tabulka č. 3).

Tabulka č. 3: Příprava kalibračních vzorků malondialdehydu (MDA) a 3-nitrotyrosinu (3-NT) v buněčném homogenátu (n = 5).

pracovní roztok standardů [µl]	buněčný homogenát [µl]	výsledná koncentrace MDA [nmol.ml ⁻¹]	výsledná koncentrace 3-NT [nmol.ml ⁻¹]
0	250	0	0
1,25	248,75	0,025	0,0125
2,5	247,5	0,05	0,025
5	245	0,10	0,05
10	240	0,20	0,10
20	230	0,40	0,20
40	210	0,80	0,40
60	190	1,20	0,60
80	170	1,60	0,80
100	150	2,00	1,00
200	50	4,00	2,00

Za účelem stanovení endogenního obsahu MDA a 3-NT byl postupem uvedeným v kapitole 3.5.6. připraven také slepý vzorek (tj. vzorek bez přidaného MDA a 3-NT).

3.5.9. Validace LC-MS/MS metody pro stanovení MDA a 3-NT

Za účelem validace LC-MS/MS metody pro simultánní stanovení MDA a 3-NT z HepG2 buněčné matrice bylo provedeno stanovení správnosti, krátkodobé a dlouhodobé přesnosti, matricových efektů, návratnosti pracovního postupu, selektivity, stability MDA-DNPH komplexu a 3-NT ve zpracovaném vzorku a dlouhodobé stability MDA a 3-NT v buněčném homogenátu. Jednotlivé typy vzorků potřebných pro praktické provedení validace jsou schematicky uvedeny v tabulce č. 4.

Tabulka č. 4: Validací parametry a vzorky potřebné pro provedení validace

validační parametr	standarty MDA a 3-NT přidané k buněčnému homogenátu před úpravou vzorku (tabulka č. 5)	přečištěný buněčný homogenát s přidanými standarty MDA-DNPH a 3-NT (tabulka č. 6)	roztoky standardů MDA a 3-NT (tabulka č. 7)
Správnost	*		
Krátkodobá přesnost	*		
Dlouhodobá přesnost	*		
Matricové efekty		*	*
Návratnost	*	*	
Selektivita		*	
Stabilita 24 hodin	*		
Stabilita 48 hodin	*		
Stabilita 168 hodin	*		

Vzorky pro stanovení správnosti, krátkodobé přesnosti, dlouhodobé přesnosti, návratnosti pracovního postupu a stability MDA-DNPH komplexu a 3-NT ve zpracovaném vzorku byly připraveny přidáním příslušného množství směšného pracovního roztoku MDA a 3-NT k buněčnému homogenátu tak, aby výsledné množství přidaných standardů dosahovalo nízké, střední a vysoké koncentrace: 0,05, 0,40 a 4,00 nmol.mg⁻¹ proteinu pro MDA a 0,025, 0,20 a 2,00 nmol.mg⁻¹ proteinu

pro 3-NT (tabulka č. 5). Tyto vzorky byly zpracovány postupem uvedeným v kapitole 3.5.6. a bezprostředně analyzovány dle kapitoly 3.5.7. V případě stanovení stability MDA-DNPH komplexu a 3-NT ve zpracovaném vzorku byla příprava vzorku dle kapitoly 3.5.6. zastavena po dokončení derivatizačního kroku a v této fázi byly vzorky uskladněny a uchovávány při 10 °C. Po uplynutí 24, 48 a 168 hodin byla příprava vzorku dokončena. Stejným postupem byl připraven slepý vzorek.

Tabulka č. 5: Příprava vzorků pro stanovení správnosti, krátkodobé a dlouhodobé přesnosti a návratnosti pracovního postupu (n = 5).

pracovní roztok standardů [μl]	buněčný homogenát [μl]	výsledná koncentrace MDA / 3-NT [nmol.mg ⁻¹]
0*	250	
2,5	247,5	0,05 / 0,025
40	210	0,40 / 0,20
200	50	4,00 / 2,00

*slepý vzorek

Pro stanovení návratnosti pracovního postupu, hodnocení matricových efektů a selektivity metody byly navíc vzorky připraveny zpracováním 250 μl prostého buněčného homogenátu (tj. homogenátu bez přidaného MDA a 3-NT) zpracováním postupem uvedeným v kapitole 3.5.6. (bez přidání IS) a ukončeným provedením SPE. Stejným způsobem byly separátně připraveny vodné roztoky standardů MDA a 3-NT (včetně IS) vedoucí ke vzniku MDA-DNPH (GLA-DNPH) komplexu. Vzorky vzniklé smísením příslušných eluentů byly poté odpařeny a po rekonstrukci analyzovány pomocí LC-MS/MS. Výsledné množství MDA a 3-NT dosahovalo nízké, střední a vysoké koncentrace (tabulka č. 6).

Tabulka č. 6: Příprava vzorků pro stanovení návratnosti pracovního postupu, hodnocení matricových efektů a selektivity (n = 5).

buněčný homogenát [μl]	roztok standardů/H ₂ O* [μl]	původní koncentrace MDA / 3-NT v roztoku před derivatizací DNPH [nmol.mg ⁻¹]	výsledná koncentrace MDA / 3-NT ve vzorku [nmol.mg ⁻¹]
		-	-
250	250	0,10 / 0,05	0,05 / 0,025
		0,80 / 0,40	0,40 / 0,20
		8,00 / 4,00	4,00 / 2,00

*slepý vzorek

Pro hodnocení matricových efektů byly vzorky připraveny za použití vodných roztoků MDA a 3-NT tak, aby výsledné množství přidávaných standardů dosahovalo nízké, střední a vysoké koncentrace (tabulka č. 7).

Vzorky pro stanovení dlouhodobé stability MDA a 3-NT v buněčném homogenátu byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 3.5.6. Buněčný homogenát byl uchováván při -80 °C po dobu 1 měsíce.

Tabulka č. 7: Příprava vzorků pro hodnocení matricových efektů (n = 5)

pracovní roztok standardů [μl]	H ₂ O [μl]	výsledná koncentrace MDA / 3-NT [nmol.mg ⁻¹]
0*	250	
2,5	247,5	0,05 / 0,025
40	210	0,40 / 0,20
200	50	4,00 / 2,00

*slepý vzorek

3.5.10. Úprava vzorků pro stanovení NP-SH

Pro stanovení NP-SH byla použita metoda dle Chen et al. (2008), která byla optimalizována pro HepG2 buněčnou matrici; 100 μl buněčného homogenátu v centrifugační mikrozkuhavce bylo zředěno přidáním 1000 μl roztoku PBS (0,15 mol.dm⁻³; pH 7,5) a smícháno se 70 μl derivatizačního roztoku DTNB. Po 10 minutách reakce byl vzorek precipitován přidáním 50 μl 35% HCl a odstředěn při 6800 × g a 4 °C po dobu 5 minut. Supernatant byl poté přenesen do skleněné vialky a analyzován pomocí HPLC-UV/VIS.

3.5.11. Úprava vzorků pro stanovení NP-SS-NP

Pro stanovení NP-SH-NP byla použita metoda dle Chen et al. (2008), která byla optimalizována pro HepG2 buněčnou matrici; 100 μl buněčného homogenátu v mikrozkuhavce bylo zředěno přidáním 200 μl roztoku PBS (0,15 mol.dm⁻³; pH 7,5) a smícháno se 100 μl roztoku NaBH₄. Aby bylo zabráněno nadměrnému pění v průběhu redukční reakce, bylo přidáno 50 μl EtOH. Směs byla poté inkubována v blokovém termostatu při 60 °C po dobu 30 minut. Dále byl vzorek schlazen na ledu a bylo k němu přidáno 40 μL 18% HCl za účelem odstranění nezreagovaného NaBH₄. Směs byla poté neutralizována přidáním 610 μl roztoku PBS (0,5 mol.dm⁻³; pH 10) a bylo přidáno 70 μl derivatizačního roztoku DTNB. Po 20 minutách reakce byl vzorek

precipitován přidáním 50 μl 35% HCl a odstředěn při $6800 \times g$ a $4\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 5 minut. Supernatant byl poté přenesen do skleněné vialky a analyzován pomocí HPLC-UV/VIS.

3.5.12. HPLC-UV/VIS podmínky pro stanovení NP-SH a NP-SS-NP

Separace jednotlivých analytů byla prováděna pomocí HPLC sestavy (Agilent 1260 Infinity) na chromatografické koloně Phenomenex KINETEX C18. MF byla tvořena vodnou složkou A (0,9% FA) a organickou složkou B (ACN). Chromatografická separace byla prováděna při konstantním průtoku MF $300\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ v režimu gradientové eluce za následujících podmínek (A:B): 0-1,0 min (88:12), 1,1-2,0 min (20:80), 2,0-5,0 min (20:80), 5,1 min (88:12), 5,1-4,0 min (88:12). Na chromatografické koloně uložené v termostatu byla udržována teplota $25\text{ }^\circ\text{C}$. Objem nastříkovaného vzorku byl 20 μl . UV/VIS detekce byla prováděna při vlnové délce 326 nm.

3.5.13. Kvantitativní analýza pomocí HPLC-UV

Zásobní roztoky GSH (ekvivalent NP-SH) a GSSG (ekvivalent NP-SS-NP) o koncentraci $1\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ byly připraveny rozpuštěním 10 mg příslušného standardu v 10 ml H_2O . Za účelem sestrojení kalibračních křivek byly tyto zásobní roztoky dále zředěny 0,15M PBS (pH 7,5) tak, aby koncentrace standardů GSH a GSSG pokrývala rozsah $3,90\text{-}500\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Pro kvantifikaci NP-SH bylo 100 μl kalibračního standardu GSH zpracováno postupem uvedeným v kapitole 3.5.10. Stejným způsobem byla připravena kalibrační přímka pro kvantifikaci NP-SS-NP za použití kalibračních roztoků GSSG zpracovaných postupem uvedeným v kapitole 3.5.11. Výsledná koncentrace GSH/GSSH v kalibračních roztocích pak byla v rozsahu $0,32\text{-}40,96\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

3.5.14. Stanovení proteinového obsahu

Intracelulární proteinový obsah byl stanoven spektrofotometrickou metodou dle Bradfordové (Bradford, 1976); 25 μl buněčného homogenátu bylo zředěno přidáním 37,5 μl H_2O a odebraných 50 μl bylo smícháno s 950 μl činidla pro stanovení proteinového obsahu. Poté bylo 200 μl roztoku napipetováno v triplicátu do 96jamkové mikrotitrační destičky a pomocí multifunkčního destičkového readeru byla změřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Jako standard byl použit BSA v koncentračním rozmezí 0,1 až $1,4\ \text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$.

3.5.15. Vyhodnocení a statistická analýza

Data získaná LC-MS/MS analýzou byla vyhodnocena pomocí programu Xcalibur verze 2.5.0. Data získaná HPLC-UV/VIS analýzou byla vyhodnocena pomocí programu Agilent ChemStation for LC 3D systems.

Koncentrace MDA a 3-NT ve vzorcích byla vyjádřena v $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ celkového proteinu a NP-SH a NP-SS-NP v $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ celkového proteinu. Výsledky jsou vyjádřeny jako hodnota průměru z 3 a více stanovení \pm směrodatná odchylka (SD).

Jednotlivé skupiny byly mezi sebou porovnány pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (one-way ANOVA) následované Dunnettovým *post hoc* testem (Dunnett's multiple comparison test). Za statisticky signifikantní byly považovány rozdíly na hladině významnosti $p \leq 0,05$. Pro statistickou analýzu byl použit software GraphPad Prism 5 verze 5.04 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3.6. *In vitro* hodnocení oxidačního stresu u oximových reaktivátorů AChE

3.6.1. Oximové reaktivátory AChE

Všechny testované oximy, HI-6, MMB-4, LüH-6, 2-PAM a TMB-4, byly syntetizovány na Katedře toxikologie a vojenské farmacie (Fakulta vojenského zdravotnictví, Univerzita obrany, Hradec Králové, Česká republika). Čistota oximových reaktivátorů (96–98 %) byla potvrzena pomocí tenkovrstvé chromatografie; stacionární fáze DC-Alufolien Cellulose F, mobilní fáze n-butanol:AA:H₂O (5:1:2) a detekce Dragendorffovým činidlem. Struktury oximových reaktivátorů byly potvrzeny použitím nukleární magnetické rezonance Gemini 300 (Varian, Palo Alto, CA, USA).

Roztoky oximových reaktivátorů o koncentraci odpovídající jejich inhibiční koncentraci (IC_{50} ; tabulka č. 8) používané v jednotlivých experimentech byly připraveny v DMEM^b kultivačním médiu.

Tabulka č. 8: Hodnoty IC₅₀ pro použité oximové reaktivátory AChE dle Muckova et al. (2018).

Oxim	IC ₅₀ [μmol.dm ⁻³]
MMB-4	2,51
HI-6	2,62
LüH-6	5,16
TMB-4	17,69
2-PAM	18,70

3.6.2. Kultivace a pasážování buněk

Před provedením experimentu byly HepG2 buněčné linie kultivovány a pasážovány způsobem uvedeným v kapitole 3.5.1.

Za účelem hodnocení buněčné viability pomocí MTT testu byly HepG2 buňky kultivovány v 96jamkových destičkách v objemu 100 μl a hustotě 15 × 10³ na jamku.

Pro stanovení MDA, 3-NT, NP-SH a NP-SS-NP byly HepG2 buněčné kultury kultivovány v 75 cm² kultivačních lahvích.

3.6.3. Indukce oxidačního stresu reaktivátory AChE

Indukce oxidačního stresu oximovými reaktivátory AChE za účelem stanovení MDA, 3-NT, NP-SH a NP-SS-NP byla prováděna postupem uvedeným v kapitole 3.5.2. K HepG2 buňkám v 75 cm² kultivačních lahvích byly přidány pracovní roztoky oximů o koncentraci odpovídající jejich IC₅₀ (5 ml) a buňky byly inkubovány po dobu 1, 4 a 24 hodin. Buňky, ke kterým bylo přidáno pouze DMEM^b, sloužily jako negativní kontrola. Experiment probíhal pro každý oxim v daném časovém intervalu v triplicátu.

3.6.4. Stanovení buněčné viability pomocí MTT testu

Buněčná viabilita byla stanovena postupem uvedeným v kapitole 3.5.3. K HepG2 buňkám v čiré 96jamkové destičce byly přidány roztoky oximů o koncentraci odpovídající jejich IC₅₀ (100 μl). Buňky byly poté inkubovány po dobu 1, 4 a 24 hodin. Buňky, ke kterým bylo přidáno pouze DMEM^b médium, sloužily jako negativní kontrola. Experiment probíhal pro každý oxim v daném časovém intervalu v triplicátu a ve třech nezávislých měřeních.

3.6.5. Stanovení proteinového obsahu

Intracelulární proteinový obsah byl stanoven postupem popsáním v kapitole 3.5.14.

3.6.6. Stanovení MDA a 3-NT

Získaná buněčná peleta byla zpracována postupem uvedeným v kapitole 3.5.4. a vzniklý buněčný homogenát byl upraven podle kapitoly 3.5.6. Podmínky LC-MS/MS odpovídaly podmínkám uvedeným v kapitole 3.5.7.

3.6.7. Stanovení NP-SH a NP-SS-NP

Získaná buněčná peleta byla zpracována postupem uvedeným v kapitole 3.5.4. Postupy pro zpracování buněčné matrice za účelem stanovení NP-SH a NP-SS-NP byly upraveny následujícím způsobem: ke 100 μl buněčného homogenátu bylo přidáno 20 μl roztoku PABA (IS; 10 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ v PBS o koncentraci 0,15 $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$), homogenát byl dále zpracován postupem uvedeným v kapitole 3.5.10. (stanovení NP-SH) a 3.5.11. (stanovení NP-SS-NP). Stejným způsobem byly dle kapitoly 3.5.13. připraveny kalibrační roztoky tak, aby výsledná koncentrace GSH (ekvivalent NP-SH) a GSSG (ekvivalent NP-SS-NP) byla v rozsahu 0,32-0,96 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Podmínky HPLC-UV/VIS odpovídaly podmínkám uvedeným v kapitole 3.5.12.

3.6.8. Vyhodnocení a statistická analýza

Data získaná LC-MS/MS analýzou byla vyhodnocena pomocí programu Xcalibur verze 2.5.0. Data získaná HPLC-UV/VIS analýzou byla vyhodnocena pomocí programu Agilent ChemStation for LC 3D systems.

Koncentrace MDA a 3-NT ve vzorcích byla vyjádřena v $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu a NP-SH a NP-SS-NP v $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ proteinu. Výsledky jsou vyjádřeny jako hodnota průměru z 3 a více stanovení \pm směrodatná odchylka (SD).

Jednotlivé skupiny byly mezi sebou porovnány pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (one-way ANOVA) následované Dunnettovým *post hoc* testem (Dunnett's multiple comparison test). Za statisticky signifikantní byly považovány rozdíly na hladině významnosti $p \leq 0,05$. Pro statistickou analýzu byl použit software GraphPad Prism 5 verze 5.04.

3.7. Stanovení BOS z mozkomíšního moku

3.7.1. Odběr vzorků

Vzorky mozkomíšního moku byly získány od 22 pacientů, kterým byl memantin podáván perorálně v dávce 20 mg jednou denně po dobu nejméně 3 měsíců před odběrem (Neurologická klinika Fakultní nemocnice v Hradci Králové). Za účelem stanovení koncentrace memantinu a vybraných BOS v mozkomíšním moku byli pacienti rozděleni do skupin na základě časové prodlevy mezi posledním podáním memantinu a odběrem mozkomíšního moku: $6 \pm 0,25$ hodin ($n = 5$; 2 muži a 3 ženy; věk $75,20 \pm 1,51$ let), $12 \pm 0,25$ hodin ($n = 5$; 3 muži a 2 ženy; věk $70,50 \pm 2,95$ let), $18 \pm 0,25$ hodin ($n = 6$; 3 muži a 3 ženy; věk $72,33 \pm 3,09$ let) a $24 \pm 0,25$ hodin ($n = 6$; 2 muži a 4 ženy; věk $69,50 \pm 2,68$ let). Kontrolní skupinu tvořili pacienti s diagnózou Alzheimerovy choroby, jež nebyli léčeni memantinem ($n = 15$). Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas s lumbální punkcí. Mozkomíšní mok byl odebrán standardní lumbální punkcí za použití jednorázové jehly pro lumbální punkci. Studie byla povolena Etickou komisí Fakultní nemocnice v Hradci Králové (No. 201704 D01M) a schválena a dozorována Státním ústavem pro kontrolu léčiv v České republice (No. Eudra CT 2016-004097-17, SÚKL s300364/2016 CRM:0009060). Alzheimerova choroba byla diagnostikována dle národních a mezinárodních pokynů (Resner et al., 2008; Hort et al., 2010). U všech účastněných pacientů byla rovněž splněna kritéria pro pravděpodobnou přítomnost AD dle Asociace pro Alzheimerovu chorobu a související poruchy (NINCDS-ADRDA; McKhann et al., 1984). Syndrom demence byl stanoven klinickým a neuropsychologickým vyšetřením dle Diagnostického a statistického manuálu duševních poruch (DSM-IV, 4 vydání) vytvořeného Americkou psychiatrickou asociací (American Psychiatric Association 1994).

3.7.2. Stanovení MDA, 3-NT, NP-SH a NP-SS-NP

Vzorek mozkomíšního moku byl před chromatografickým stanovením MDA, 3-NT, NP-SH a NP-SS-SS pětkrát naředěn a dále zpracován příslušným pracovním postupem: MDA a 3-NT bylo stanoveno zpracováním 250 μ l zředěného mozkomíšního moku dle kapitoly 3.5.6. za podmínek uvedených v kapitole 3.5.7. Kalibrační křivky pro stanovení MDA a 3-NT v mozkomíšním moku byly připraveny postupem uvedeným v kapitole 3.5.8. v rozsahu 0,40 až 4,00 nmol.ml^{-1} pro MDA a 0,0125 až 0,60 nmol.ml^{-1} pro 3-NT.

Pro stanovení NP-SH a NP-SS-NP byly pro 100 μ l zředěného mozkomíšního moku použity pracovní postupy uvedené v kapitole 3.5.10. a 3.5.11. a chromatografické podmínky odpovídaly podmínkám v kapitole 3.5.12.

3.7.3. Vyhodnocení a statistická analýza

Data získaná LC-MS/MS analýzou byla vyhodnocena pomocí programu Xcalibur verze 2.5.0. Data získaná HPLC-UV/VIS analýzou byla vyhodnocena pomocí programu Agilent ChemStation for LC 3D systems.

Koncentrace MDA a 3-NT ve vzorcích byla vyjádřena v nmol.mg^{-1} a množství NP-SH a NP-SS-NP v $\mu\text{g.ml}^{-1}$ mozkomíšního moku. Výsledky jsou vyjádřeny jako hodnota průměru z 3 a více stanovení \pm směrodatná odchylka (SD). Jednotlivé skupiny byly mezi sebou porovnány pomocí neparametrického statistického testu (Mann-Whitney U test). Za statisticky signifikantní byly považovány rozdíly na hladině významnosti $p \leq 0,05$. Pro statistickou analýzu byl použit software GraphPad Prism 5 verze 5.04.

4. Výsledky

4.1. Vývoj LC-MS/MS metody pro simultánní stanovení MDA a 3-NT z HepG2 buněčné matrice a zavedení metody pro hodnocení thiolové redoxní rovnováhy pomocí HPLC-UV/VIS

Za účelem simultánního stanovení MDA a 3-NT z HepG2 buněčné matrice byla vyvinuta, optimalizována a validována LC-MS/MS metoda včetně metody pro zpracování vzorku. Pro hodnocení thiolové redoxní rovnováhy byla zavedena a optimalizována HPLC-UV/VIS metoda pro stanovení NP-SH a NP-SS-NP. Tyto chromatografické metody byly aplikovány na HepG2 buňky ovlivněné *t*-BOOH, který sloužil jako modelová látka pro indukci oxidačního stresu.

4.1.1. Úprava vzorků pro stanovení MDA a 3-NT

Za účelem stanovení MDA a 3-NT byly vyvinuty a optimalizovány jednotlivé kroky zpracování buněčného homogenátu zahrnující alkalickou hydrolyzu, precipitaci proteinů, derivatizaci a přečištění vzorku pomocí SPE.

Poté, co byl pomocí ultrazvukové homogenizace uvolněn intracelulární obsah HepG2 buněk, byla provedena alkalická hydrolyza proteinově vázaného MDA a 3-NT. Vzorky buněčného homogenátu byly inkubovány v blokovém termostatu s 6M NaOH při 60 °C po dobu 0,5; 1, 2, 3, 4, 8 a 16 hodin. Výsledná doba trvání hydrolytické reakce byla nastavena na 3 hodiny. Další prodloužení doby trvání hydrolytické reakce nevedlo v případě 3-NT k významně vyšší výtěžnosti reakce, ale docházelo k poklesu koncentrace MDA. Přidání 150 μ l 35% TCA (w/w) způsobilo jak neutralizaci nespotřebovaného NaOH, tak vyvolalo dostatečnou precipitaci proteinů.

Kompletní derivatizace MDA a GLA byla zajištěna při dosažení koncentrace DNPH 0,5 mmol.dm⁻³ ve výsledném vzorku. Reakce probíhala v termotřepačce při 37 °C po dobu 1 hodiny za konstantního třepání (300 RPM) a za nepřístupu světla. Prodloužení reakční doby ani použití koncentrovanějšího DNPH nevedlo k vyšší výtěžnosti derivatizační reakce. Tyto derivatizační podmínky neměly na souběžné stanovování 3-NT a [¹³C₉]3-NT žádný vliv.

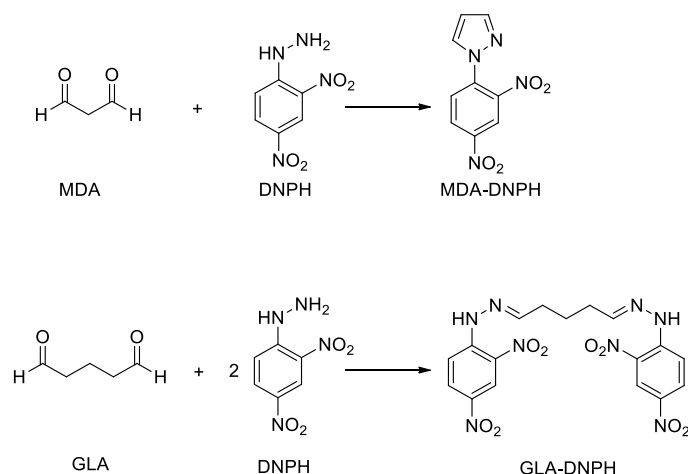
Možné interferující látky obsažené v buněčné matrici, nespotřebované reagentie a balastní látky pocházející ze zpracování buněčné matrice byly odstraněny pomocí SPE.

Po nanesení zderivatizovaného vzorku na SPE kolonku Phenomenex Strata C-18-E (prekondiciace 3 ml MeOH a H₂O) byl vzorek propláchnut octanovým pufrem (500 µl) a analyty byly eluovány 500 µl směsí octanového pufru:MeOH (4:96, v/v). Za těchto podmínek bylo dosaženo velmi dobré retence všech sledovaných analytů a výtěžnost SPE se pohybovala v rozmezí 91,3 až 113,9 % pro MDA a 95,3 až 102,4 % pro 3-NT. Vzorky byly poté odpařeny ve vakuovém koncentrátoru a rekonstruovány 450 µl směsí octanového pufru:MeOH (96:4, v/v), což je složení odpovídající počátečnímu složení mobilní fáze používané při LC-MS/MS analýze.

4.1.2. LC-MS/MS podmínky pro stanovení MDA a 3-NT

Separace jednotlivých analytů bylo dosaženo na chromatografické koloně Phenomenex LUNA C18(2) při teplotě 37 °C za konstantního průtoku (450 µl.min⁻¹) mobilní fáze složené z octanového pufru a MeOH. Separací v režimu gradientové eluce (viz kapitola 3.5.7.) bylo dosaženo potřebného rozlišení ($R_s > 1,5$) a nedocházelo tak k překryvu mezi sousedními píky. Přítomnost AmAc ve vodné složce MF je nezbytná pro vytvoření amonného prekurzorového iontu GLA (tabulka č. 9). Za těchto chromatografických podmínek byly analyty eluovány v následujícím pořadí (a retenčními časy; t_R): 3-NT ($t_R = 4,50$ min), [¹³C₉]3-NT ($t_R = 4,50$ min), MDA ($t_R = 5,75$ min) a GLA ($t_R = 7,05$ min). Celkový čas analýzy, který zahrnoval i dobu nutnou pro ekvilibraci kolony, byl 10 minut. Za daných podmínek separace nebyl u analýzy slepého vzorku (H₂O), která proběhla bezprostředně po analýze vzorků standardů MDA a 3-NT (včetně IS), pozorován tzv. carry-over efekt, ke kterému dochází v případě přenosu analytů mezi jednotlivými nástríky v důsledku jejich nekompletní eluce z chromatografické kolony.

K identifikaci a kvantifikaci analytů byla použita hmotnostně-spektrometrická detekce s APCI ionizační technikou pracující v pozitivním módu. Pro zajištění vyšší selektivity a citlivosti stanovení MDA (a GLA jako jeho IS) byla provedena derivatizace pomocí DNPH vedoucí ke vzniku stabilních hydrazonů. MDA reaguje s DNPH v ekvimolárním poměru za vzniku 1-(2,4-dinitrofenyl)pyrazolu (MDA-DNPH komplex; $M_w = 234,17$ g.mol⁻¹) a GLA reaguje s DNPH v molárním poměru 1:2 za vzniku 1,5-bis(2(2,4-dinitrofenyl)hydrazono)pentanu (GLA-DNPH komplex; $M_w = 460,11$ g.mol⁻¹; obrázek č. 7).



Obrázek č. 7. Derivatizace malondialdehydu (MDA) a glutaraldehydu (GLA) pomocí 2,4-dinitrofenylhydrazinu (DNPH) za vzniku příslušných hydrazonů.

Na základě základního MS skenu v rozsahu m/z 50-500 provedeného na roztocích standardů jednotlivých analytů byly nalezeny jejich prekurzorové ionty. V případě 3-NT, [$^{13}\text{C}_9$]3-NTa MDA se jednalo o jejich protonované molekuly $[\text{M}+\text{H}]^+$ a v případě GLA o jeho amonný adukt $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$. Na základě skenu produktových iontů, který obsahuje pouze iontové fragmenty selektivně vybraných prekurzorových iontů, byly pro jednotlivé analyty vybrány charakteristické iontové přechody. Ty poté sloužily k identifikaci a následné kvantifikaci jednotlivých analytů prováděné v režimu monitorování vybraných reakcí (SRM; tabulka č. 9). Pro zajištění co nejvyšší odezvy detektoru byly optimalizovány parametry iontového zdroje, viz kapitola 3.5.7. Fragmentací prekurzorového iontu MDA byly získány produktové ionty o m/z 159 (kvalitativní) a m/z 189 (kvantitativní) a fragmentací prekurzorového iontu GLA byly získány produktové ionty o m/z 263 (kvalitativní) a m/z 461 (kvantitativní). U 3-NT a [$^{13}\text{C}_9$]3-NT byl sledován pouze jeden iontový přechod, m/z 227 \rightarrow 181 pro 3-NT a m/z 236 \rightarrow 189 pro [$^{13}\text{C}_9$]3-NT, protože další ionty vznikající v průběhu fragmentační reakce nedosahovaly dostatečné intenzity.

Tabulka č. 9: Iontové přechody a hodnoty CID používané při SRM.

Analyt	Prekurzorový ion m/z	CID (eV)	Produktový ion m/z
3-NT	227	26	181
[$^{13}\text{C}_9$]3-NT	236	35	189
MDA	235	15	159, 189
GLA	478	35	263, 461

4.1.3. Kvantitativní analýza pomocí LC-MS/MS

Vzorky určené k sestrojení kalibračních přímků byly připraveny přidáním známého množství standardů MDA a 3-NT k buněčnému homogenátu a zpracovány postupem uvedeným v kapitole 3.5.6. tak, aby se výsledná koncentrace standardů pohybovala v rozmezí 0,025 až 4,00 nmol.mg⁻¹ celkového proteinu pro MDA a 0,0125 až 2,00 nmol.mg⁻¹ celkového proteinu pro 3-NT. Pro kvantifikaci MDA a 3-NT byla použita metoda vnitřního standardu. Plocha pod píkem standardu (A_s), odpovídající koncentraci přidaného standardu MDA a 3-NT, byla získána odečtením plochy pod píkem odpovídající endogenní koncentraci MDA a 3-NT (A_{s0}) od celkové plochy píku naměřené v kalibračním standardu (A_{sc}) viz vzorec (1). Hodnota A_{s0} byla získána analýzou slepého vzorku bez přidaných standardů MDA a 3-NT.

$$A_s = A_{sc} - A_{s0} \quad (1)$$

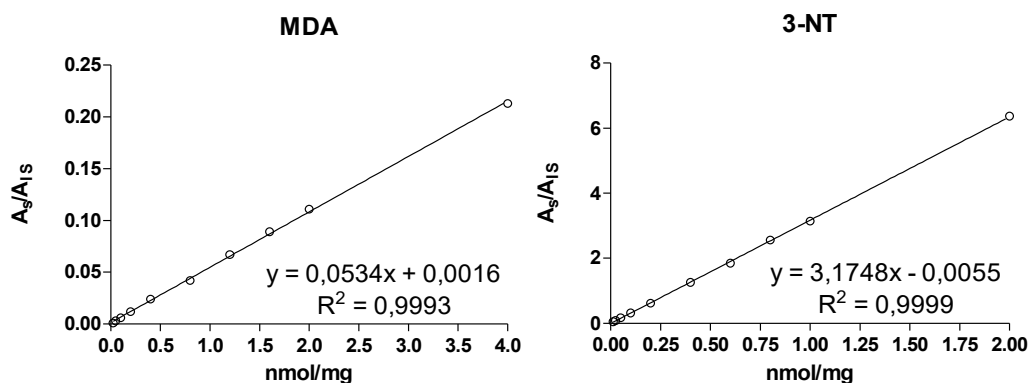
Kalibrační křivka byla sestrojena jako závislost koncentrace standardu na poměru A_s a plochy píku příslušného IS (A_{IS}), jehož koncentrace je ve všech kalibračních roztocích konstantní: 0,72 nmol.mg⁻¹ celkového proteinu pro GLA a 0,36 nmol.mg⁻¹ celkového proteinu pro [¹³C₉]3-NT (tabulka č. 10). Metoda byla lineární v rozsahu koncentrací 0,025 až 4,00 nmol.mg⁻¹ pro MDA ($r^2 = 0,9993$) a 0,0125 až 2,00 nmol.mg⁻¹ pro 3-NT ($r^2 = 0,9999$) viz obrázek č. 8.

Tabulka č. 10: Metoda vnitřního standardu s využitím kalibrační křivky

c MDA [nmol.mg ⁻¹]	A_s/A_{IS}	c 3-NT [nmol.mg ⁻¹]	A_s/A_{IS}
0,05	0,003	0,025	0,086
0,10	0,006	0,05	0,168
0,20	0,012	0,10	0,320
0,40	0,024	0,20	0,618
0,80	0,042	0,40	1,260
1,20	0,067	0,60	1,852
1,60	0,089	0,80	2,562
2,00	0,111	1,00	3,140
4,00	0,213	2,00	6,369

Limity kvantifikace (LOQ) pro MDA a 3-NT byly určeny jako nejnižší koncentrace analytu, pro které bylo dosaženo odpovídající správnosti a přesnosti ($\leq 20\%$). Hodnoty LOQ odpovídají nejnižším bodům kalibrační křivky, tj. 0,025 nmol.mg⁻¹ pro MDA

a $0,0125 \text{ nmol.mg}^{-1}$ pro 3-NT. Limity detekce (LOD) odpovídají koncentracím $0,0084 \text{ nmol.mg}^{-1}$ pro MDA a $0,0042 \text{ nmol.mg}^{-1}$ pro 3-NT.



Obrázek č. 8: Kalibrační křivky pro malondialdehyd (MDA) a 3-nitrotyrosin (3-NT)

4.1.4. Validace LC-MS/MS metody pro stanovení MDA a 3-NT

Validace LC-MS/MS metody pro simultánní stanovení MDA a 3-NT z HepG2 buněčné matrice byla provedena za podmínek uvedených v kapitole 3.5.9. Za tímto účelem byla stanovena správnost metody, krátkodobá i dlouhodobá přesnost metody, návratnost metody, matricové efekty, selektivita, stabilita MDA-DNPH komplexu a 3-NT v derivatizovaných vzorcích a dlouhodobá stabilita MDA a 3-NT v buněčném homogenátu. Poměr mezi A_s a A_{IS} a výsledná koncentrace jednotlivých analytů ve vzorku byly získány odečtením hodnoty plochy pod píkem u slepého vzorku (endogenní koncentrace MDA a 3-NT) od plochy pod píkem u vzorku a dosazením do příslušné rovnice kalibrační křivky.

Správnost metody je definována jako těsnost shody mezi naměřenou a přijatou referenční hodnotou a je vyjádřena jako odchylka (bias) tj. rozdíl mezi získanou a skutečnou hodnotou (Nováková & Douša, 2013). Správnost metody byla určena na základě hodnot získaných analýzou vzorků obsahující standardy MDA a 3-NT přidané k buněčnému homogenátu tak, aby jejich výsledná koncentrace dosahovala nízké, střední a vysoké hladiny: $0,05$, $0,40$ a $4,00 \text{ nmol.mg}^{-1}$ celkového proteinu pro MDA a $0,025$; $0,20$ a $2,00 \text{ nmol.mg}^{-1}$ celkového proteinu pro 3-NT. Jako referenční koncentrace MDA a 3-NT sloužily hodnoty kalibračních křivek (viz kapitola 4.1.3). Za daných podmínek bylo dosaženo přijatelné správnosti (bias < 15 %); odchylka se pohybovala v rozmezí 1,2 – 8,42 % pro MDA a 0,52 – 4,23 % pro 3-NT (tabulka č. 11).

Tabulka č. 11: Správnost metody vyjádřená jako procentuální bias. Koncentrace analytu je vyjádřena jako nmol.mg⁻¹ celkového proteinu ± SD (n = 5).

referenční koncentrace MDA (nmol.mg ⁻¹)	koncentrace MDA ^a ve vzorku (nmol.mg ⁻¹)	správnost (%)	referenční koncentrace 3-NT (nmol.mg ⁻¹)	koncentrace 3-NT ^b ve vzorku (nmol.mg ⁻¹)	správnost (%)
0,050	0,046 ± 0,007	-8,4	0,025	0,026 ± 0,001	4,2
0,400	0,420 ± 0,007	5,1	0,200	0,197 ± 0,001	-1,6
4,000	3,950 ± 0,055	-1,2	2,000	2,010 ± 0,039	0,5

^aendogenní koncentrace MDA 1,018 nmol.mg⁻¹ celkového proteinu

^bendogenní koncentrace 3-NT 0,019 nmol.mg⁻¹ celkového proteinu

Přesnost metody je definována jako míra těsnosti shody mezi vzájemně nezávislými výsledky měření a vyjádřená jako směrodatná odchylka/variační koeficient (CV; Nováková & Douša, 2013). Přesnost metody byla vyhodnocena na základě opakovaných měření vzorků obsahujících standardy MDA a 3-NT o nízké, střední a vysoké koncentraci přidané k buněčnému homogenátu. Krátkodobá přesnost byla vyhodnocena z dat získaných analýzou 5 vzorků téže koncentrační hladiny provedené v ten samý den. Dlouhodobá přesnost byla vyhodnocena z dat získaných analýzou 5 vzorků téže koncentrační hladiny, která byla provedena v 5 odlišných dnech v rámci jednoho měsíce. Jako referenční koncentrace MDA a 3-NT sloužily hodnoty kalibračních křivek (viz kapitola 4.1.3.). Přesnost vyjádřená procentuálním CV je pro jednotlivé analyty a koncentrační hladiny uvedena v tabulce č. 12. Dosažená přesnost (CV < 10 %) indukuje, že metoda je za daných podmínek reprodukovatelná.

Tabulka č. 12: Krátkodobá a dlouhodobá přesnost metody vyjádřena jako variační koeficient (CV %). Koncentrace analytu je vyjádřena jako nmol.mg⁻¹ celkového proteinu ± SD (n = 5).

referenční koncentrace MDA (nmol.mg ⁻¹)	krátkodobá přesnost (% CV)	dlouhodobá přesnost (% CV)	referenční koncentrace 3-NT (nmol.mg ⁻¹)	krátkodobá přesnost (% CV)	dlouhodobá přesnost (% CV)
0,050	3,0	3,1	0,025	2,2	3,0
0,400	5,8	5,3	0,200	0,8	2,6
4,000	2,1	4,1	2,000	1,7	2,3

Návratnost metody představuje poměr mezi množstvím analytu získaného danou metodou a přijatou referenční hodnotou (Nováková & Douša, 2013). Návratnost

pracovního postupu pro zpracování buněčné matrice byla vyhodnocena porovnáním naměřených koncentrací MDA a 3-NT ve vzorcích, ke kterým byly standardy analytů přidány před (referenční hodnota) a po přečistění vzorků pomocí SPE. Návratnost vyjádřená jako procentuální množství analytů získaného postupem pro zpracování vzorku (viz kapitola 3.5.6.) je uvedena v tabulce č. 13. Návratnost se pohybovala v rozmezí 91,0 až 99,1 % pro MDA a 87,7 až 94,5 % pro 3-NT.

Tabulka č. 13: Návratnost pracovního postupu vyjádřená jako procentuální množství analytu získaného daným pracovním postupem. Koncentrace analytu je vyjádřena jako nmol.mg^{-1} celkového proteinu \pm SD ($n = 5$).

referenční koncentrace MDA ^a (nmol.mg^{-1})	koncentrace MDA ^b ve vzorku (nmol.mg^{-1})	návratnost (%)	referenční koncentrace 3-NT ^c (nmol.mg^{-1})	koncentrace 3-NT ^d ve vzorku (nmol.mg^{-1})	návratnost (%)
0,061	0,058 \pm 0,007	96,5	0,029	0,025 \pm 0,003	87,7
0,460	0,419 \pm 0,002	91,0	0,205	0,190 \pm 0,007	92,5
3,944	3,908 \pm 0,061	99,1	2,179	2,059 \pm 0,004	94,5

endogenní koncentrace MDA ^a1,11, ^b1,05 nmol.mg^{-1} celkového proteinu

endogenní koncentrace 3-NT ^c0,18, ^d0,021 nmol.mg^{-1} celkového proteinu

Matricové efekty popisují vliv složení matrice na ionizaci analytu a tím na citlivost jeho stanovení (Klapková et al., 2011). Matricové efekty (ME) pro MDA, GLA, 3-NT a [¹³C₉]3-NT byly vyhodnoceny metodou standardního přídatku po extrakci: tj. porovnáním ploch píků získaných analýzou vodných roztoků standardů analytů (referenční koncentrace) a vzorků, ke kterým byly standardy MDA, 3-NT (3 koncentrační úrovně), GLA a [¹³C₉]3-NT (konstantní koncentrace) přidány po přečistění vzorků pomocí SPE (tabulka č. 14). Na základě těchto měření nebyly pozorovány žádné významné matricové efekty (ME < 10 %) na stanovení MDA a 3-NT a odezvu GLA a [¹³C₉]3-NT.

Tabulka č. 14: Vliv HepG2 buněčné matrice na stanovení malondialdehydu (MDA), 3-nitrotyrosinu (3-NT), glutaraldehydu (GLA) a isotopově značeného 3-NT ($[^{13}\text{C}_9]$ 3-NT). Matricový efekt je vyjádřen v % \pm SD (n = 5).

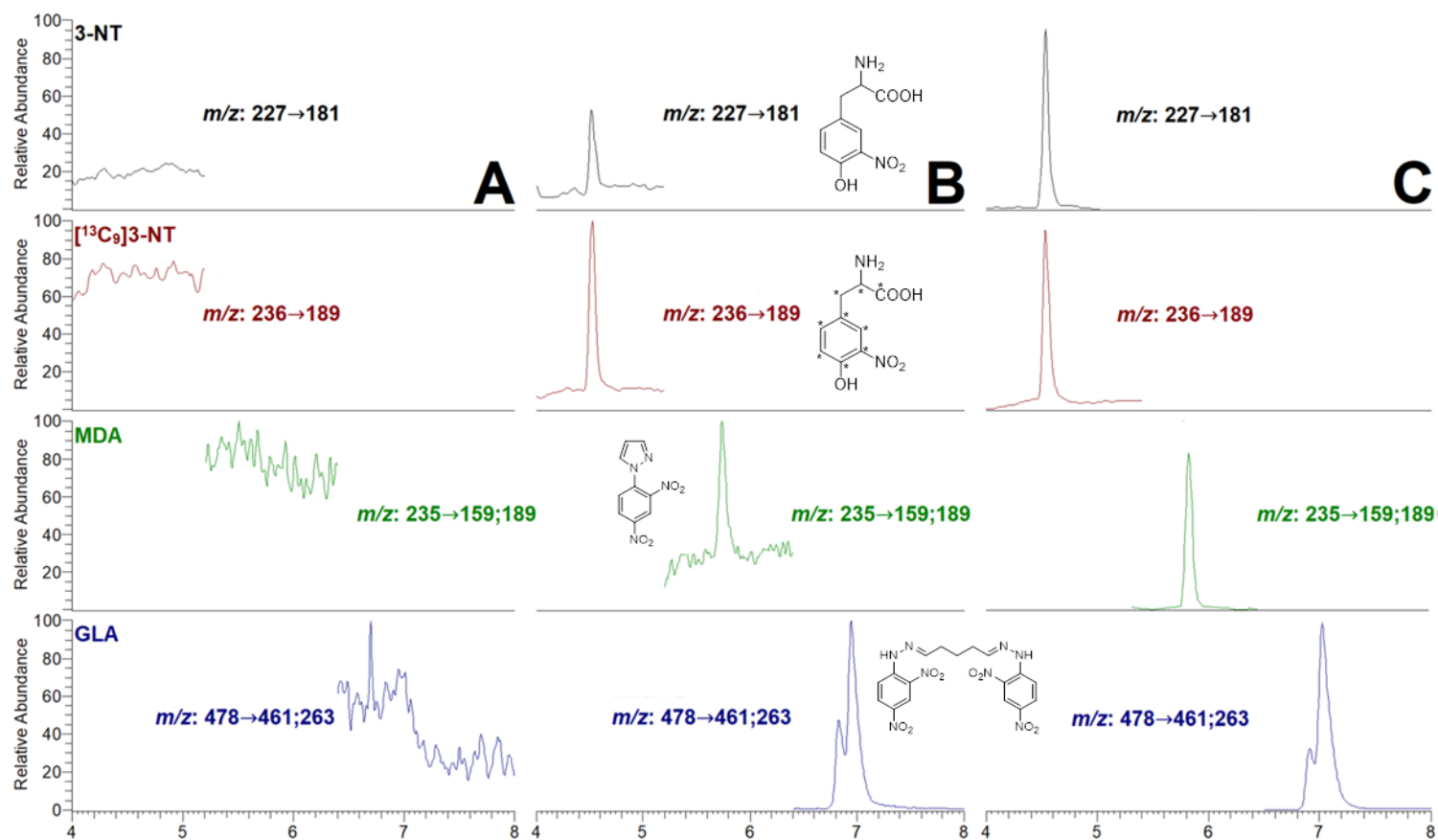
referenční koncentrace MDA (nmol.mg ⁻¹)	MDA ^a	GLA	referenční koncentrace 3-NT (nmol.mg ⁻¹)	3-NT ^b	[¹³ C ₉]3-NT
0,050	96,6 \pm 11,2	94,1 \pm 5,5	0,025	94,1 \pm 13,0	108,0 \pm 5,9
0,400	101,1 \pm 4,9	97,8 \pm 4,8	0,200	104,7 \pm 4,5	107,7 \pm 8,9
4,000	94,0 \pm 4,6	94,0 \pm 5,3	2,000	109,4 \pm 9,2	106,8 \pm 9,5

^aendogenní koncentrace MDA 1,05 nmol.mg⁻¹ celkového proteinu

^benogenní koncentrace 3-NT 0,021 nmol.mg⁻¹ celkového proteinu

Selektivita je definována jako schopnost metody umožňující přesné a správné stanovení analytu ve směsi látek a v přítomnosti interferujících složek pocházejících z matrice (Nováková & Douša, 2013). Selektivita byla vyhodnocena porovnáním chromatogramů získaných analýzou slepého vzorku HepG2 buněčné matrice a vzorku HepG2 buněčné matrice, ke kterému byly standardy MDA a 3-NT přidány až po přečištění buněčného homogenátu pomocí SPE (viz kapitola 3.5.9.). Analýzou vzorku H₂O, zpracovaného stejným postupem jako experimentální vzorky, byla prokázána nepřítomnost všech stanovovaných analytů. Nedochází tak k jejich umělému vzniku vlivem zpracování vzorku (obrázek č. 9).

Dále byla vyhodnocena stabilita MDA-DNPH komplexu a 3-NT v buněčném homogenátu po dobu 24, 48 a 168 hodin za nepřístupu světla při 10 °C, což odpovídá teplotě uchovávání vzorků v autosampleru před vlastní LC-MS/MS analýzou. Sledované analyty byly v průběhu skladování vzorků stabilní (tabulka č. 15).



Obrázek č. 9: Selektivita LC-MS/MS metody pro stanovení malondialdehydu (MDA) a 3-nitrotyrosinu (3-NT) z HepG2 buněčné matrice. Chromatogram slepého vzorku H_2O , který byl zpracován postupem uvedeným v kapitole 3.5.7. (A), slepý vzorek HepG2 buněčné matrice zpracován postupem uvedeným v kapitole 3.5.7. (B), vzorek HepG2 buněčné matrice, ke které byly standardy MDA a 3-NT přidány až po přečištění buněčného homogenátu pomocí SPE (C). Výsledná koncentrace ve vzorcích byla $0,4 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ celkového proteinu pro MDA a $0,2 \text{ nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ celkového proteinu pro 3-NT. Pořadí a retenční časy analytů byly následující: 3-NT ($t_{\text{R}} = 4,50 \text{ min}$), $[^{13}\text{C}_9]$ 3-NT ($t_{\text{R}} = 4,50$), MDA ($t_{\text{R}} = 5,75 \text{ min}$) a GLA ($t_{\text{R}} = 7,05 \text{ min}$).

Tabulka č. 15: Stabilita malondialdehyd-2,4-dinitrofenylhydrazin komplexu (MDA-DNPH) a 3-nitrotyrsinu (3-NT) v HepG2 buněčném homogenátu po dobu 24, 48 a 168 hodin při 10 °C. Stabilita analytů je vyjádřena v % ± SD (n = 5).

referenční koncentrace MDA (nmol.mg ⁻¹)	MDA 24 hod ^a (%)	MDA 48 hod ^b (%)	MDA 168 hod ^c (%)
0,050	88,1 ± 10,1	86,5 ± 6,4	85,5 ± 11,3
0,400	93,9 ± 6,0	88,5 ± 6,5	85,7 ± 3,5
4,000	98,4 ± 3,2	99,2 ± 5,6	99,4 ± 7,3
referenční koncentrace 3-NT (nmol.mg ⁻¹)	3-NT ^d 24 hod (%)	3-NT ^e 48 hod (%)	3-NT ^f 168 hod (%)
0,025	97,0 ± 10,5	93,5 ± 6,7	92,5 ± 9,1
0,200	98,3 ± 8,4	98,9 ± 7,5	98,5 ± 6,6
2,000	99,5 ± 6,6	99,5 ± 7,3	99,4 ± 7,5

endogenní koncentrace MDA ^a0,997, ^b0,971 a ^c0,899 nmol.mg⁻¹ celkového proteinu

endogenní koncentrace 3-NT ^d0,022, ^e0,022 a ^f0,020 nmol.mg⁻¹ celkového proteinu

Při dlouhodobém uchovávání (1 měsíc) buněčného homogenátu při -80 °C dosahovala stabilita MDA 87,4 % a 3-NT 91,4 %.

4.1.5. Úprava vzorků pro stanovení NP-SH a NP-SS-NP

Za účelem hodnocení intracelulární redoxní thiolové rovnováhy byl upraven postup pro zpracování vzorků pro stanovení NP-SH a NP-SS-NP z buněčné matrice dle Chena et al. (2008). Oproti původní metodě byla koncentrace DTNB potřebná pro derivatizaci thiolových skupin upravena z 19,8 na 10,0 mg.ml⁻¹, přičemž výtěžnost reakce zůstala zachována (99,9 %). Rovněž nižší koncentrace NaBH₄ (100 mg.ml⁻¹) byla dostatečná pro redukci disulfidické vazby (93,6 %) v molekule NP-SS-NP (tabulka č. 16).

Tabulka č. 16: Vliv koncentrace kyseliny 5,5'-dithiobis(2-nitro-benzoové) (DTNB) a borohydridu sodného (NaBH₄) na stanovení neproteinových thiolů a neproteinových disulfidů vyjádřen jako procentuální výtěžnost reakce (%). Koncentrace analytu je vyjádřena jako $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1} \pm \text{SD}$ (n = 5).

DTNB (mg.ml ⁻¹)	NP-SH ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	%	NaBH ₄ (mg.ml ⁻¹)	NP-SS-NP ($\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)	%
19,8	49,75 ± 0,17	100,0	283,9	48,31 ± 0,14	100,0
10,0	49,73 ± 0,23	99,9	100,0	45,20 ± 0,29	93,6

4.1.6. HPLC podmínky pro stanovení NP-SH a NP-SS-NP

Za účelem stanovení NP-SH a NP-SS-NP z HepG2 buněčné matrice byla upravena a optimalizována HPLC-UV/VIS metoda dle Chena et al. (2008). Při použití chromatografické kolony Phenomenex KINETEX C18 byly upraveny podmínky gradientové eluce za použití mobilní fáze skládající se z vodného roztoku FA (0,9% v/v) a ACN. Vyšší počáteční obsah organické složky (12 %) a strmější průběh gradientu vedl i při nižším průtoku (300 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$) ke zkrácení celkové doby analýzy z 19 na 14 minut. Čas potřebný pro ekvilibraci kolony probíhající při počátečním složení mobilní fáze byl 8,9 minut. Kratší doba ekvilibrace způsobovala nestabilní retenci TNB ($t_r = 6,6$ minut).

4.1.7. Kvantitativní analýza pomocí HPLC-UV/VIS

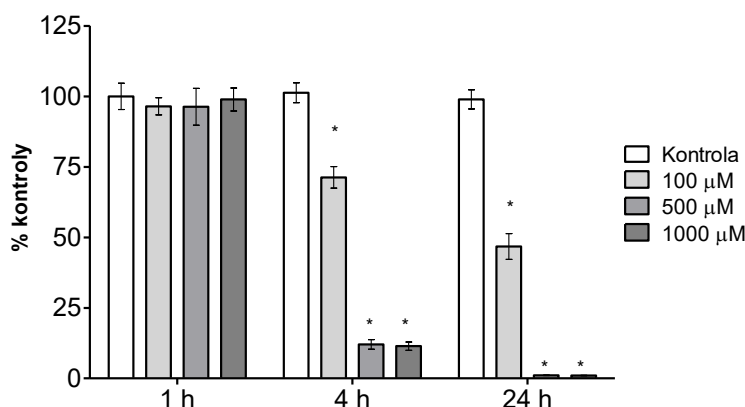
Kvantifikace NP-SH (ekvivalent GSH) byla založena na měření množství TNB vzniklého v průběhu derivatizační reakce pomocí DTNB (obrázek č. 2). Kvantifikace NP-SS-NP (ekvivalent GSSG) byla po jejich převedení na NP-SH pomocí NaBH₄ vypočítána podle následujícího vzorce (2):

$$\frac{(\text{množství TNB po redukci NaBH}_4) - (\text{množství TNB před redukcí NaBH}_4)}{2} \quad (2)$$

Metoda byla lineární v rozsahu koncentrací 0,32 až 40,96 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ jak pro NP-SH ($r^2 = 0,9978$; $y = 48,10x - 17,58$), tak pro NP-SS-SH ($r^2 = 0,9964$; $y = 42,01x - 41,73$). Pro oba analyty byl LOQ 0,32 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a LOD 0,11 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

4.1.8. MTT test

Pomocí MTT testu byla u HepG2 buněk vystavených *t*-BOOH o koncentraci 100, 500 a 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ po dobu 1, 4 a 24 hodin pozorována koncentrační a časová závislost peroxidačního působení na buněčnou viabilitu (obrázek č. 10). Po 1 hodině inkubace nebyly pozorovány změny viability pro žádnou koncentrační hladinu *t*-BOOH. Expozice 4 a 24 hodin vedla k významnému poklesu viability u všech tří koncentrací *t*-BOOH. Po 4 hodinách poklesla buněčná viabilita u *t*-BOOH o koncentraci 100, 500 a 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ o 29 %, 88 % a 89 %. Inkubace s *t*-BOOH o koncentraci 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ po dobu 24 hod vedla k poklesu viability o 53 %. U *t*-BOOH o koncentraci 500 a 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ nebyly po 24 hodinách pozorovány žádné vitální buňky (pokles o 99 %).



Obrázek č. 10: Buněčná viabilita HepG2 buněk po 1, 4 a 24 hodinové expozici *t*-BOOH 100, 500 a 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Výsledky jsou vyjádřeny v % vůči negativní kontrole (neovlivněné buňky). Hodnoty v grafu představují průměr \pm SD ($n = 3$). Statisticky významné výsledky ($p \leq 0,05$) jsou označeny *.

4.1.9. Stanovení proteinového obsahu

Intracelulární koncentrace proteinu u HepG2 buněk vystavených působení *t*-BOOH v daných expozičních intervalech byla stanovena spektrofotometrickou metodou dle Bradfordové (tabulka č. 17).

Tabulka č. 17: Množství proteinu v HepG2 buňkách vystavených působení *t*-BOOH o koncentraci 100, 500 a 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ po dobu 1, 4 a 24 hodin. Koncentrace proteinu je vyjádřena jako $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ buněčného homogenátu \pm SD ($n = 3$).

<i>t</i> -BOOH ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	Proteinový obsah ($\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$)		
	1 h	4 h	24 h
0	1,240	0,973	0,957
	\pm	\pm	\pm
	0,048	0,047	0,071
100	1,367	1,103	1,130
	\pm	\pm	\pm
	0,045	0,066	0,060
500	1,200	1,043	1,107
	\pm	\pm	\pm
	0,017	0,018	0,049
1000	0,923	1,073	1,137
	\pm	\pm	\pm
	0,053	0,088	0,053

4.1.10. Stanovení produktů oxidačního a nitrosativního stresu v HepG2 buněčné matrici po expozici *t*-BOOH

Pomocí LC-MS/MS byly stanoveny intracelulární koncentrace MDA a 3-NT v HepG2 buňkách vystavených působení *t*-BOOH o koncentraci 100, 500 a 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ po dobu 1, 4 a 24 hodin (tabulka č. 18). Zároveň byla u těchto buněk na základě HPLC-UV/VIS stanovení NP-SH a NP-SS-NP zhodnocena thiolová redoxní rovnováha (tabulka č. 19). Změny množství vzniklého MDA, 3-NT, NP-SH a NP-SS v závislosti na koncentraci *t*-BOOH a době expozice jsou uvedeny na obrázku č. 11.

Tabulka č. 18: Množství malondialdehydu (MDA) a 3-nitrotyrosinu (3-NT) v HepG2 buňkách vystavených působení *t*-BOOH o koncentraci 100, 500 a 1000 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ po dobu 1, 4 a 24 hodin. Koncentrace analytu je vyjádřena jako nmol.mg^{-1} celkového proteinu \pm SD (n = 3).

<i>t</i> -BOOH ($\mu\text{mol.dm}^{-3}$)	MDA (nmol.mg^{-1})			3-NT (nmol.mg^{-1})		
	1 h	4 h	24 h	1 h	4 h	24 h
0	1,239	1,026	0,880	0,016	0,018	0,023
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	0,125	0,160	0,053	0,000	0,000	0,003
100	1,404	1,178	1,141	0,014	0,015	0,014
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	0,101	0,056	0,084*	0,001*	0,001*	0,001*
500	1,941	1,327	0,995	0,016	0,016	0,015
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	0,103*	0,118*	0,169	0,001	0,000*	0,001*
1000	2,046	1,408	1,134	0,020	0,019	0,016
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	0,134*	0,071*	0,062*	0,001*	0,001	0,001*

Statisticky signifikantní rozdíly ($p \leq 0,05$) jsou označeny *.

Za daných experimentálních podmínek byla u HepG2 buněk pozorována koncentrační závislost působení *t*-BOOH na množství vzniklého MDA. Inkubace s peroxidem po dobu 1 hodiny vedla při použití *t*-BOOH o koncentraci 500 a 1000 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ k 56% a 65% nárůstu koncentrace MDA v porovnání s negativní kontrolou (obrázek č. 11A). Po 4 hodinách byl při stejných koncentracích *t*-BOOH nárůst MDA o 29 % a 37 % (obrázek č. 11B). Peroxid o koncentraci 100 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ nepůsobil v těchto časových intervalech u buněk signifikantní vzestup koncentrace MDA (obrázek č. 11C).

V případě nitrace proteinů nebyla pozorována koncentrační závislost působení *t*-BOOH na množství vzniklého 3-NT. Lze však pozorovat určitou časovou závislost, kdy koncentrace 3-NT postupně klesá s rostoucí dobou expozice *t*-BOOH (obrázek č. 11). Hodinová inkubace s *t*-BOOH o koncentraci 100 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ vedla k poklesu 3-NT o 12 %. Po čtyřhodinové inkubaci došlo k poklesu 3-NT o 17 % u 100 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ a 11 % u 500 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$ *t*-BOOH. Po 24 hodinách bylo množství 3-NT signifikantně nižší

vůči negativní kontrole u všech tří koncentračních úrovní *t*-BOOH; 39% pokles u 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, 34% u 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a 29% u 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ roztoku *t*-BOOH (obrázek č. 11C). K významnějšímu nárůstu koncentrace 3-NT (o 23 %) došlo pouze po jednodinové inkubaci buněk s *t*-BOOH o koncentraci 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (obrázek č. 11A).

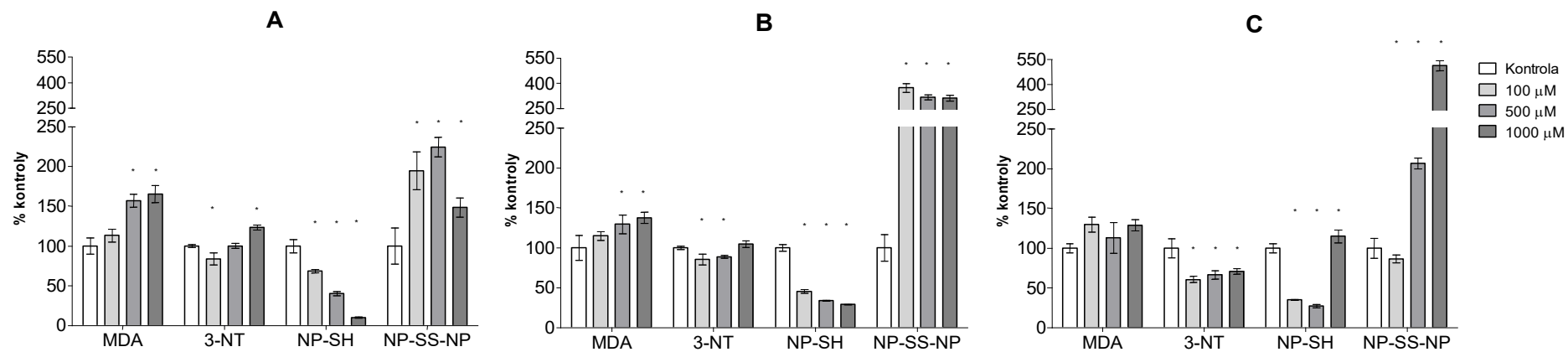
Tabulka č. 19: Množství neproteinových thiolů (NP-SH) a neproteinových disulfidů (NP-SS-NP) v HepG2 buňkách vystavených působení *t*-BOOH o koncentraci 100, 500 a 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ po dobu 1, 4 a 24 hodin. Koncentrace analytu je vyjádřena jako $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ celkového proteinu \pm SD (n = 3).

<i>t</i> -BOOH ($\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$)	NP-SH ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)			NP-SS-NP ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)		
	1 h	4 h	24 h	1 h	4 h	24 h
0	15,32	9,89	6,46	0,39	0,48	1,49
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	1,28	0,41	0,37	0,09	0,37	0,18
100	10,46	4,49	2,27	0,75	1,29	1,27
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	0,35*	0,21*	0,20*	0,09*	0,07*	0,13
500	6,17	3,36	1,76	0,87	1,51	3,08
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	0,40*	0,05*	0,13*	0,05*	0,07*	0,10*
1000	1,56	2,86	7,54	0,50	1,49	7,62
	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm	\pm
	0,09*	0,04*	0,53*	0,05*	0,08*	0,47*

Statisticky signifikantní rozdíly ($p \leq 0,05$) jsou označeny *.

Deplece intracelulárních NP-SH, ač do jisté míry kompenzovaná vznikem NP-SS-NP, korespondovala v prvních dvou časových intervalech s nárůstem koncentrace MDA. Hodinová inkubace vedla u *t*-BOOH o koncentraci 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ k 32%, u 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ k 60% a u 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ k 90% poklesu koncentrace NP-SH vůči negativní kontrole, což bylo doprovázeno 95%, 124% a 49% vzestupem množství NP-SS-NP (obrázek č. 11A). Po 4 hodinách byla deplece NP-SH 55% při použití *t*-BOOH o koncentraci 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, 67% u 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a 71% u 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a nárůst koncentrace NP-SS-NP byl vyšší o 273 % u 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, 217 % u 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a 212 % u 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *t*-BOOH (obrázek č. 11B). Po uplynutí 24

hodin byl při použití *t*-BOOH o koncentraci 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ a 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pozorován 65% a 73% pokles koncentrace NP-SH a naopak 15% nárůst po expozici *t*-BOOH o koncentraci 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Současně byl při expozici *t*-BOOH o koncentraci 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ pozorován mírný (nesignifikantní) pokles koncentrace NP-SS-NP o 13 %, zatímco v případě 500 a 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ *t*-BOOH došlo k nárůstu o 107 a 412 % (obrázek č. 11C).



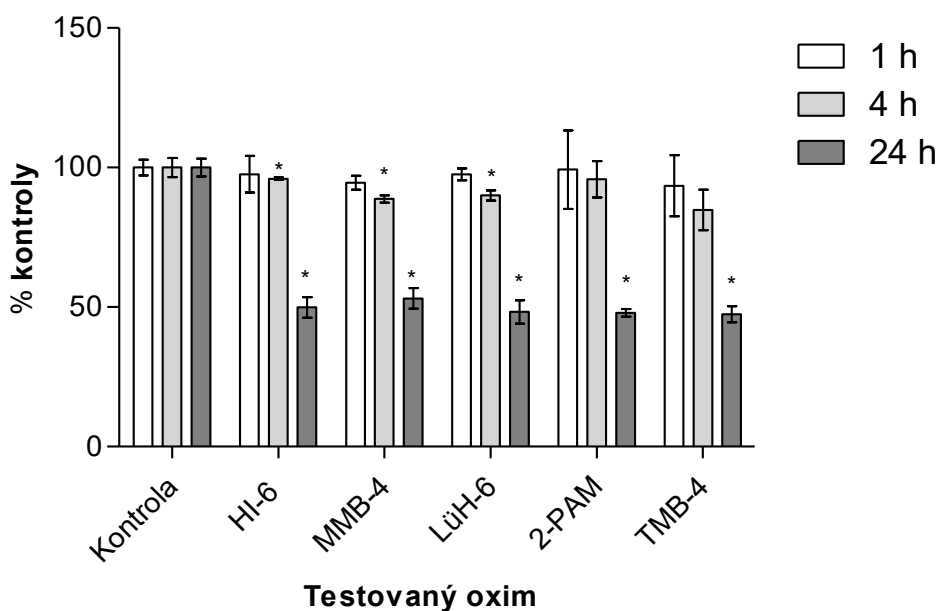
Obrázek č. 11: Vliv 100, 500 a 1000 M *t*-BOOH na tvorbu malondialdehydu (MDA) a 3-nitrotyrosinu (3-NT) a na intracelulární thiolovou rovnováhu zastoupenou neproteinovými thioley (NP-SH) a neproteinovými disulfidy (NP-SS-NP) při expozici po dobu 1 (A), 4 (B) a 24 hodin (C). Výsledky jsou vyjádřeny v % MDA, 3-NT, NP-SH a NP-SS-NP vůči negativní kontrole (neovlivněné buňky). Hodnoty v grafu představují průměr ± SD (n = 3). Statisticky významné výsledky ($p \leq 0,05$) jsou označeny*.

4.2. *In vitro* hodnocení oxidačního stresu u oximových reaktivátorů AChE

Buněčná viabilita byla vyhodnocena pomocí MTT testu. Pro stanovení MDA a 3-NT byla použita metoda LC-MS/MS. Hodnocení thiolové redoxní rovnováhy probíhalo na základě stanovení NP-SH a NP-SS-NP pomocí HPLC-UV/VIS.

4.2.1. MTT test

Buněčná viabilita HepG2 buněk vystavených působení HI-6, MMB-4, LüH-6, 2-PAM a TMB-4 o koncentraci odpovídající jejich IC_{50} po dobu 1, 4 a 24 hodin byla vyhodnocena pomocí kolorimetrického MTT testu. Jako negativní kontrola sloužily neovlivněné buňky. Po 1 hodině nebyly u žádného z použitých oximů pozorovány změny v buněčné viabilitě. Po 4 hodinách došlo k poklesu viability u buněk vystavených HI-6 o 4 %, MMB-4 o 11 % a LüH-6 o 10 %. Po 24 hodinách poklesla viabilita u HI-6 o 50 %, MMB-4 o 47 %, LüH-6 o 52 %, 2-PAM o 52 % a TMB-4 o 53 %. Rozdíly ve viabilitě nebyly po 24 hodinách mezi jednotlivými oximy statisticky významné (obrázek č. 12).



Obrázek č. 12: Buněčná viabilita HepG2 buněk po 1, 4 a 24 hodinách expozice HI-6, MMB-4, LüH-6, 2-PAM a TMB-4 v koncentraci odpovídající jejich hodnotě IC_{50} . Výsledky jsou vyjádřeny v % vůči negativní kontrole (neovlivněné buňky). Hodnoty v grafu představují průměr \pm SD (n = 3).

Statisticky významné výsledky ($p \leq 0,05$) jsou označeny *.

4.2.2. Stanovení proteinového obsahu

Intracelulární koncentrace proteinu HepG2 buněk vystavených působení HI-6, MMB-4, LüH-6, 2-PAM a TMB-4 v daných expozičních intervalech byla stanovena metodou dle Bradfordové postupem uvedeným v kapitole 3.5.14. (tabulka č. 20).

Tabulka č. 20: Množství proteinu v lyzátu HepG2 buněk vystavených působení asoximu (HI-6), metoximu (MMB-4), obidoximu (LüH-6), pralidoximu (2-PAM) a trimedoximu (TMB-4) o koncentraci odpovídající jejich IC₅₀ po dobu 1, 4 a 24 hodin. Koncentrace proteinu je vyjádřena jako mg.ml⁻¹ buněčného homogenátu ± SD (n = 3).

OXIM	Proteinový obsah (mg.ml ⁻¹)		
	1 h	4 h	24 h
kontrola	1,18	0,96	1,20
	±	±	±
	0,02	0,16	0,17
HI-6	1,11	0,97	1,21
	±	±	±
	0,07	0,02	0,11
MMB-4	1,10	1,02	1,04
	±	±	±
	0,06	0,12	0,07
LüH-6	1,03	0,96	1,23
	±	±	±
	0,06	0,17	0,05
kontrola	1,11	1,20	1,03
	±	±	±
	0,06	0,05	0,03
2-PAM	1,19	1,12	0,99
	±	±	±
	0,02	0,10	0,08
TMB-4	1,14	1,13	1,07
	±	±	±
	0,11	0,10	0,08

4.2.3. Kvantifikace NP-SH a NP-SS-NP pomocí HPLC-UV/VIS

Pro kvantifikaci byla použita metoda vnitřního standardu. Jako IS byla použita PABA o výsledné koncentraci $1,61 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ ($t_R = 1,9 \text{ min}$). Kalibrační křivky pro jednotlivé analyty byly sestaveny jako závislost koncentrace standardu na poměru A_s a A_{IS} . Kvantifikace NP-SH byla založena na množství TNB vzniklého v průběhu derivatizační reakce (DTNB) a koncentrace NP-SS-NP byla poté vypočítána podle vzorce (2) uvedeného v kapitole 4.1.7. Metoda byla lineární v rozsahu koncentrací $0,32$ až $40,96 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ jak pro NP-SH ($r^2 = 0,9984$; $y = 0,05x - 0,03$), tak pro NP-SS-NP ($r^2 = 0,9973$; $y = 0,04x - 0,03$). Pro oba analyty byl LOQ $0,32 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ a LOD $0,11 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$.

4.2.4. Stanovení MDA, 3-NT, NP-SH a NP-SS-NP

V cytoplasmatickém obsahu HepG2 buněk vystavených působení oximových reaktivátorů AChE při koncentraci odpovídajících jejich IC_{50} po dobu 1, 4 a 24 hodin byly pomocí LC-MS/MS stanoveny markery oxidačního stresu MDA a 3-NT (tabulka č. 21). Za použití HPLC-UV/VIS byly stanoveny ukazatele thiolové redoxní rovnováhy v podobě NP-SH a NP-SS-NP (tabulka č. 22).

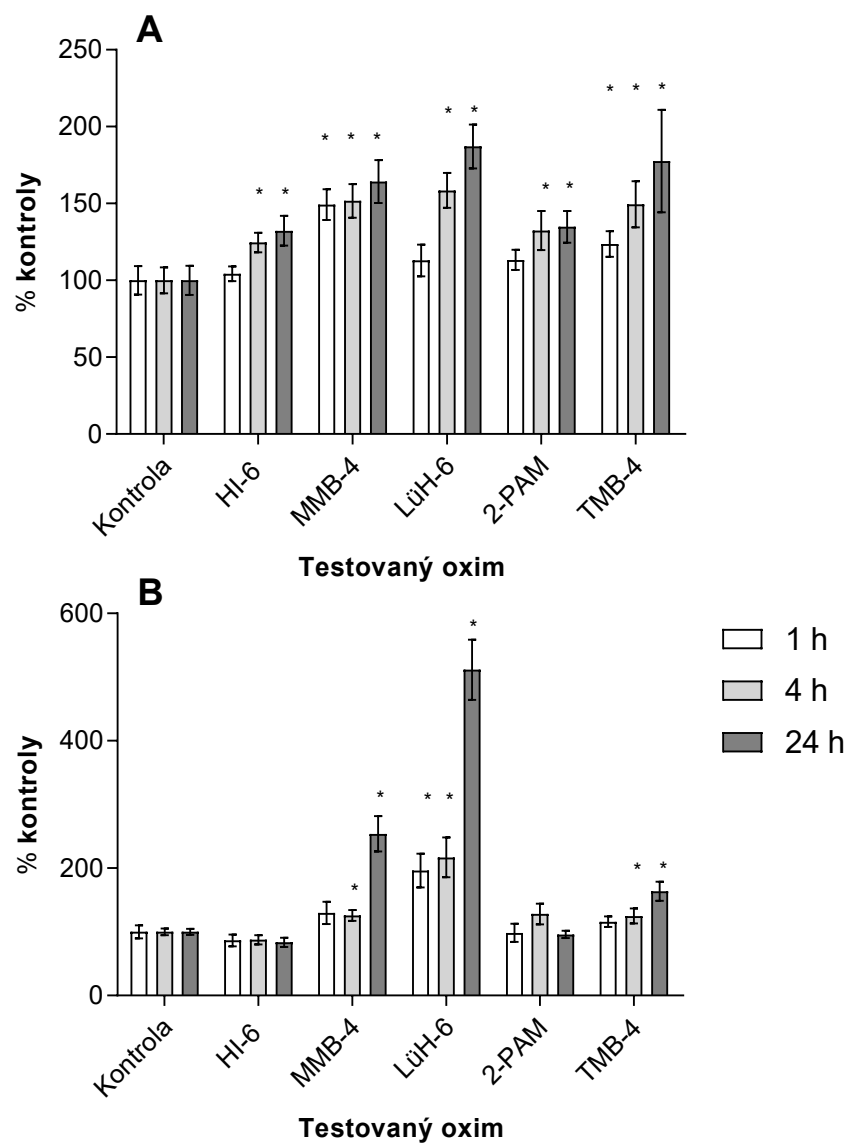
Po 1 hodině inkubace HepG2 buněk s oximy byly nalezeny zvýšené hladiny MDA u MMB-4 o 49 % a TMB-4 o 24 %. Po 4 hodinách byla zvýšená koncentrace MDA nalezena u HI-6 o 25 %, MMB-4 o 52 %, LüH-6 o 59%, 2-PAM o 32 % a TMB-4 o 49 %. Po 24 hodinách byla zvýšená koncentrace MDA nalezena u HI-6 o 32 %, MMB-4 o 64 %, LüH-6 o 87 %, 2-PAM o 35 % a TMB-4 o 78 % (obrázek č. 13A).

Po 1 hodině inkubace HepG2 buněk s oximy byly nalezeny zvýšené hladiny 3-NT pouze u LüH-6 o 96 %. Po 4 hodinách byla zvýšená koncentrace 3-NT nalezena u MMB-4 o 26 %, LüH-6 o 117 % a TMB-4 o 25 %. Po 24 hodinách byla zvýšená koncentrace 3-NT nalezena u MMB-4 o 54 %, LüH-6 o 412 % a TMB-4 o 64 % (obrázek č. 13B).

Tabulka č. 21: Množství malondialdehydu (MDA) a 3-nitrotyrosinu (3-NT) v HepG2 buňkách vystavených působení asoximu (HI-6), metoximu (MMB-4), obidoximu (LüH-6), pralidoximu (2-PAM) a trimedoximu (TMB-4) o koncentraci odpovídající jejich IC₅₀ po dobu 1, 4 a 24 hodin. Koncentrace analytu je vyjádřena jako nmol.mg⁻¹ celkového proteinu ± SD (n = 3).

OXIM	MDA (nmol.mg ⁻¹)				3-NT (nmol.mg ⁻¹)		
	1 h	4 h	24 h		1 h	4 h	24 h
kontrola	0,614	0,585	0,584		0,013	0,016	0,013
	±	±	±		±	±	±
	0,048	0,028	0,057		0,001	0,001	0,001
HI-6	0,640	0,716	0,731		0,011	0,014	0,011
	±	±	±		±	±	±
	0,027	0,032*	0,104*		0,001	0,001	0,001
MMB-4	0,916	0,887	0,960		0,016	0,021	0,033
	±	±	±		±	±	±
	0,054*	0,049*	0,074*		0,002	0,001*	0,004*
LüH-6	0,693	0,927	1,093		0,025	0,036	0,062
	±	±	±		±	±	±
	0,062	0,062*	0,043*		0,004*	0,001*	0,009*
OXIM	1 h	4 h	24 h		1 h	4 h	24 h
kontrola	0,823	0,895	0,924		0,012	0,012	0,012
	±	±	±		±	±	±
	0,068	0,81	0,123		0,002	0,001	0,001
2-PAM	0,933	1,186	1,245		0,015	0,014	0,011
	±	±	±		±	±	±
	0,048	0,082*	0,088*		0,002	0,001	0,001
TMB-4	1,018	1,338	1,641		0,014	0,015	0,019
	±	±	±		±	±	±
	0,073*	0,134*	0,114*		0,001	0,001*	0,002*

Statisticky signifikantní rozdíly ($p \leq 0,05$) jsou označeny *.



Obrázek č. 13: Hladiny MDA (A) a 3-NT (B) nalezené v HepG2 buňkách po 1, 4 a 24 hodinách expozice HI-6, MMB-4, LüH-6, 2-PAM a TMB-4 v koncentraci odpovídající jejich hodnotě IC₅₀. Výsledky jsou vyjádřeny v % vůči negativní kontrole (neovlivněné buňky). Hodnoty v grafu představují průměr ± SD (n = 3). Statisticky významné výsledky (p ≤ 0,05) jsou označeny *.

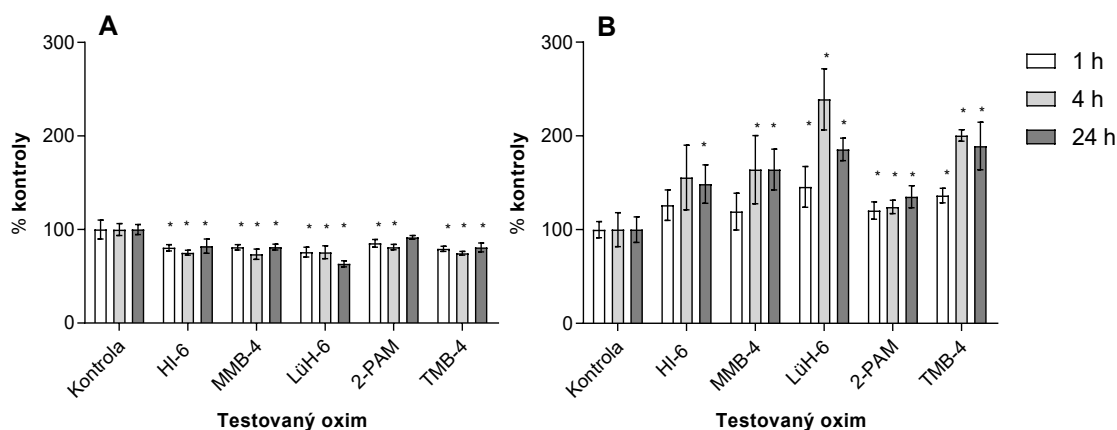
Tabulka č. 22: Množství neproteinových thiolů (NP-SH) a neproteinových disulfidů (NP-SS-NP) v HepG2 buňkách vystavených působení asoximu (HI-6), metoximu (MMB-4), obidoximu (LüH-6), pralidoximu (2-PAM) a trimedoximu (TMB-4) o koncentraci odpovídající jejich IC₅₀ po dobu 1, 4 a 24 hodin. Koncentrace analytu je vyjádřena jako $\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$ celkového proteinu \pm SD (n = 3).

	NP-SH ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)				NP-SS-NP ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}$)		
OXIM	1 h	4 h	24 h		1 h	4 h	24 h
kontrola	17,15	16,06	12,31		1,98	1,09	5,05
	\pm	\pm	\pm		\pm	\pm	\pm
	1,14	1,17	0,78		0,13	0,21	0,79
HI-6	13,82	12,08	10,11		2,50	1,79	7,51
	\pm	\pm	\pm		\pm	\pm	\pm
	0,66*	0,45*	1,08*		0,37	0,40	1,16*
MMB-4	13,91	11,83	10,00		2,36	2,00	8,29
	\pm	\pm	\pm		\pm	\pm	\pm
	0,53*	0,83*	0,42*		0,43	0,28*	1,26*
LüH-6	13,01	12,15	7,80		2,89	2,61	9,37
	\pm	\pm	\pm		\pm	\pm	\pm
	1,05*	1,27*	0,43*		0,49*	0,40*	0,49*
OXIM	1 h	4 h	24 h		1 h	4 h	24 h
kontrola	13,41	14,48	12,26		1,72	1,60	1,82
	\pm	\pm	\pm		\pm	\pm	\pm
	0,69	0,18	0,17		0,24	0,14	0,07
2-PAM	11,43	11,75	11,24		2,07	1,99	2,49
	\pm	\pm	\pm		\pm	\pm	\pm
	0,54*	0,48*	0,24		0,11*	0,08*	0,17*
TMB-4	10,64	10,80	9,92		2,34	3,21	3,45
	\pm	\pm	\pm		\pm	\pm	\pm
	0,25*	0,33*	0,68*		0,10*	0,08*	0,53*

Statisticky signifikantní rozdíly ($p \leq 0,05$) jsou označeny *.

Po 1 hodině inkubace HepG2 buněk s oximy došlo ke snížení koncentrace NP-SH u HI-6 o 19 %, MMB-4 o 19 %, LüH-6 o 23 %, 2-PAM o 15 % a TMB-4 o 21 %. Po 4 hodinách nastal pokles NP-SH u HI-6 o 25 %, MMB-4 o 26 %, LüH-6 o 24 %, 2-PAM o 19 % a TMB-4 o 25 %. Po 24 hodinách byl pokles NP-SH u HI-6 o 18 %, MMB-4 o 19 %, LüH-6 o 37 % a TMB-4 o 19 % (obrázek č. 14A).

Po 1 hodině inkubace HepG2 buněk s oximy byly nalezeny zvýšené hladiny NP-SS-NP u TMB-4 o 36 %, u 2-PAM o 20% a u LüH-6 o 46 %. Po 4 hodinách byla zvýšená koncentrace NP-SS-NP nalezena u MMB-4 o 64 %, LüH-6 o 139 %, 2-PAM o 24 % a TMB-4 o 100 %. Po 24 hodinách byla zvýšená koncentrace NP-SS-NP nalezena u HI-6 o 49 %, MMB-4 o 64 %, LüH-6 o 86 %, 2-PAM o 32 % a TMB-4 o 89 % (obrázek č. 14B).



Obrázek č. 14: Množství NP-SH (A) a NP-SS-NP (B) nalezené v HepG2 buňkách po 1, 4 a 24 hodinách expozice HI-6, MMB-4, LüH-6, 2-PAM a TMB-4 v koncentraci odpovídající jejich hodnotě IC₅₀. Výsledky jsou vyjádřeny v % vůči kontrole (neovlivněné buňky). Hodnoty v grafu představují průměr ± SD (n = 3). Statisticky významné výsledky (p ≤ 0,05) jsou označeny *.

4.3. Stanovení BOS z mozkomíšního moku

Pro stanovení koncentrace MDA a 3-NT v mozkomíšním moku byla použita metoda LC-MS/MS. Hodnocení thiolové redoxní rovnováhy probíhalo na základě stanovení NP-SH a NP-SS-NP pomocí HPLC-UV/VIS.

4.3.1. Stanovení BOS z mozkomíšního moku

Množství MDA, 3-NT, NP-SH a NP-SS-NP v mozkomíšním moku pacientů s AD nalezené v kontrolní skupině (n = 15) a skupině léčené memantinem (n = 20; 20 mg v denní dávce) je uvedeno v tabulce č. 23. Významné rozdíly v množství BOS mezi jednotlivými skupinami byly pozorovány u 3-NT, NP-SH, NP-SS-NP. U pacientů léčených memantinem poklesla hladina 3-NT o 18%, zatímco v případě NP-SH a NP-SS-NP došlo k 55% a 10% nárůstu.

Tabulka č. 23: Koncentrace biomarkerů oxidačního stresu v mozkomíšním moku u kontrolní skupiny pacientů (n = 15) a pacientů léčených memantinem (n = 22). Koncentrace MDA a 3-NT jsou vyjádřeny jako $\text{nmol.ml}^{-1} \pm \text{SD}$ a množství NP-SH a NP-SS-NP jako $\mu\text{g.ml}^{-1}$ mozkomíšního moku $\pm \text{SD}$.

BOS	MDA (nmol.ml^{-1})	3-NT (nmol.ml^{-1})	NP-SH ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)	NP-SS-NP ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)
Kontrolní skupina	9,043	0,092	0,986	3,011
	\pm 3,414	\pm 0,037	\pm 0,099	\pm 4,469
Skupina léčena memantinem	9,349	0,075	1,529	3,326
	\pm 2,020	\pm 0,026*	\pm 0,543*	\pm 1,434*

Průměrná koncentrace memantinu nalezená v mozkomíšním moku pacientů byla $65,33 \pm 9,40 \text{ ng.ml}^{-1}$.

Statisticky signifikantní rozdíly ($p \leq 0,05$) jsou označeny *.

5. Diskuze

5.1. Vývoj metody pro simultánní stanovení MDA a 3-NT z HepG2 buněčné matrice a zavedení metody pro hodnocení thiolové redoxní rovnováhy pomocí HPLC-UV/VIS

V rámci stávající disertační práce byla vyvinuta a validována nová chromatografická metoda, kterou lze v intracelulárním obsahu současně detekovat jak marker poškození lipidů (MDA), tak ukazatel nitrace proteinů (3-NT). Za účelem získání komplexní představy ohledně dopadu intracelulárního oxidačního stresu, byla současně zavedena a zoptimalizována HPLC-UV/VIS metoda pro stanovení NP-SH a NP-SS-NP, jenž představují jeden z esenciálních antioxidačních systémů buňky.

5.1.1. Vývoj LC-MS/MS metody a úprava biologických vzorků pro stanovení MDA a 3-NT

Při vývoji LC-MS/MS metody pro simultánní stanovení MDA a 3-NT z HepG2 buněk bylo nutné nalézt vhodné podmínky chromatografické separace a hmotnostně spektrometrické detekce a následně optimalizovat postup pro zpracování buněčné matrice. V rámci chromatografické analýzy patří část věnovaná úpravě vzorků k časově nejnáročnějším krokům. Navíc významně ovlivňuje výslednou přesnost a správnost měření (Nováková & Douša, 2013). V případě stanovení MDA a 3-NT spočívaly klíčové kroky zpracování buněčných vzorků v uvolnění těchto markerů z vazby na buněčné proteiny. MDA (a jeho vnitřního standardu GLA) byly navíc derivatizovány za účelem zvýšení selektivity a citlivosti detekce. U stanovení malých molekul, jako jsou MDA a 3-NT, ze složitých biologických matric je rovněž důležité odstranit ze vzorku balastní látky (proteiny a další makromolekuly), které by mohly nežádoucím způsobem ovlivňovat kvalitativní a kvantitativní stránku analýzy.

V případě uvolnění MDA z vazby na protein se nejčastěji využívá alkalická hydrolyza pomocí NaOH. Tento přístup poskytuje dostatečnou výtěžnost za podmínek spojených s nižším rozkladem lipidů indukovaným vyššími teplotami, čím lze omezit uměle vznik MDA (Mateos et al., 2004; Pilz et al., 2000; Cighetti et al., 2002; Grotto et al., 2007). Vedle kyselé (Delatour et al., 2002) a enzymatické hydrolyzy, prováděné směsí nescifických proteas (Ryberg & Caidahl, 2007), lze u 3-NT rovněž

využít NaOH (Frost et al., 2000). V metodě dle Mateose et al. (2004) byla pro alkalickou hydrolyzu proteinově vázaného MDA uvnitř HepG2 buněk použita reakce s 6M NaOH probíhající při 60 °C po dobu 30 min. Tato doba hydrolyzy však, dle našich výsledků, nestačila pro 3-NT a bylo třeba časový interval reakce prodloužit. Výsledná alkalická hydrolyza prováděna 6M NaOH při teplotě 60 °C po dobu 3 hodin již poskytovala přijatelnou výtěžnost reakce. Dále byla pomocí standardů MDA a 3-NT ověřeno, že jsou tyto reakční podmínky kompatibilní s jejich stanovením a že v průběhu alkalické hydrolyzy nedochází k jejich rozkladu. Rovněž bylo na roztoku standardu L-tyrosinu zjištěno, že tento postup dodatečně nezpůsobuje nežádoucí produkci 3-NT.

Po uvolnění MDA a 3-NT z vazby na bílkoviny byla provedena deproteinace vzorku. Na rozdíl od organických rozpouštědel (jako jsou např. ACN, MeOH) způsobilo použití 35% TCA (w/w) kromě samotné precipitace proteinů také snížení pH vzorku potřebné pro provedení následné derivatizace MDA pomocí DNPH, která by v alkalickém prostředí neproběhla. Pokles pH navíc zabrání rozkladu GLA, který je společně s [¹³C₉]3-NT přidán v dalším kroku (Czauderna et al., 2011). Použití HCl nebo kyseliny chloristé, které patří mezi další konvenčně používané deproteinační činidla, není plně kompatibilní s MS detekcí v důsledku potlačení ionizace cílových analytů (Klapková et al., 2011).

Ačkoliv lze MDA stanovit pomocí LC-MS/MS i bez předchozí derivatizace (Syslová et al., 2009), její zavedení vede ke zvýšení selektivity a citlivosti hmotnostně spektrometrické detekce. V současnosti je pro stanovení MDA z biologických matric nejpreferovanějším derivatizačním činidlem DNPH (Chen et al., 2011; Czauderna et al., 2011; Andreoli et al., 2003; Pilz et al., 2000), které na rozdíl od dříve hojně používané derivatizace pomocí TBA probíhá za mírnějších podmínek a je zde tak nižší riziko vzniku arteficiálních produktů (Korchazhkina et al., 2003). Za daných experimentálních podmínek poskytovala reakce s DNPH úplnou, spolehlivou a reprodukovatelnou derivatizaci stanovovaného MDA (i GLA), aniž by současně ovlivňovala stanovení 3-NT přítomného ve vzorku.

Pro kvantifikace MDA a 3-NT byla použita metoda vnitřního standardu s využitím kalibrační křivky. Ideální IS je sloučenina, která se přirozeně nevyskytuje v dané biologické matrici a vyznačuje se podobnými fyzikálně chemickými vlastnostmi, jaké má příslušný analyt. V případě 3-NT byl za IS zvolen izotopově značený analyt, [¹³C₉]3-NT, který splňuje požadavky kladené na spolehlivost analýzy (Klapková et al., 2011).

V případě MDA byl výběr vhodného IS náročnější. Použití deuterovaného MDA je komplikováno jeho obtížnější přípravou (Cighetti et al., 2002) a methyl-MDA vykazuje variabilní výtěžnost derivatizační reakce (Korchazhkina & Yang, 2004). Pro svoji komerční dostupnost a absenci v buněčné matrici byl proto vybrán GLA, který je strukturálním analogem MDA. Ačkoliv lze na chromatogramu (obrázek č. 9) u GLA pozorovat dvojitý pík, vznikající pravděpodobně v důsledku izomerie dvojně vazby v GLA-DNPH komplexu (Uchiyama et al., 2003; Uchiyama et al., 2011), opakovaným nástřikem derivatizovaného roztoku GLA a GLA v buněčném homogenátu při stejné koncentraci standardu ($0,72 \text{ nmol.ml}^{-1}$) bylo v obou případech dosaženo přijatelné opakovatelnosti ($CV < 13 \%$). GLA byl zároveň podobně ovlivněn matricovým efektem jako MDA ($ME < 10 \%$) a lze jej tedy použít pro jeho kvantifikaci.

Poslední krok v úpravě vzorku předcházející vlastní LC-MS/MS analýze spočíval v přečistění a zejména v odsolení vzorků pomocí SPE. Při použití SPE kolonek obsahujících C18-reverzní fázi dochází promytím H_2O těsně po nanesení vzorku k eluci jak solí, tak dalších polárních látek, které vykazují na tomto typu sorbentu jen velmi slabou retenci (Nováková & Douša, 2013). Riziko kontaminace iontového zdroje MS detektoru těmito látkami bylo na základě jejich nízké afinity vůči C18-reverzní fázi chromatografické kolony dále sníženo tím, že byl eluát v prvních 3 minutách analýzy přiváděn do odpadu namísto do detektoru.

Výsledný pracovní postup splňoval validační kritéria pro kvalitativní i kvantitativní stanovení analytů z biologické matrice (Nováková & Douša, 2013) a byl úspěšně aplikován na vzorky pocházející z *in vitro* i *in vivo* experimentů.

5.1.2. HPLC-UV/VIS metoda a úprava vzorků pro stanovení NP-SH a NP-SS-NP

Vzhledem k tomu, že thioly a disulfidy neobsahují ve své molekule žádný významný chromofor, je pro zvýšení selektivity a citlivosti chromatografického stanovení nutné provést jejich derivatizaci příslušným činidlem. Optimalizací původní HPLC-UV/VIS metody dle Chena et al. (2008) založené na stanovení NP-SH a NP-SS-NP (po převedení na thioly) pomocí DTNB byla zajištěna lepší kompatibilita s HepG2 buněčným homogenátem. Zásadní změny v pracovním postupu spočívaly ve změně množství NaBH_4 potřebného k redukci disulfidické vazby a použití nižší koncentrace DTNB. Derivatizace -SH skupin v molekulách thiolů probíhá nejlépe při neutrálním pH

(Guan et al., 2003). Pokud je pH vzorku > 8 , dochází v průběhu derivatizační reakce k nežádoucí hydrolyze DTNB na TNB vedoucí ke vzniku falešně pozitivního výsledku. Tento jev představuje problém zejména při stanovení NP-SS-NP. Jeho součástí je redukce disulfidu pomocí NaBH_4 , která probíhá v silně alkalickém prostředí. Nadbytek NaBH_4 ve vzorku lze však snadno odstranit přidáním kyseliny (HCl), přičemž dochází zároveň k okyselení vzorku ($\text{pH} < 1$) za uvolnění plynného vodíku (Winther & Thorpe, 2014). Snížení množství použitého NaBH_4 (100 mg.ml^{-1} místo původních $283,9 \text{ mg.ml}^{-1}$) při zachování účinnosti redukční reakce (93,6 %) vede kromě úpravy nadměrného pění v průběhu zpracování vzorku také ke snížení rizika vzniku falešně pozitivních hodnot v případě stanovení NP-SS-NP. Výťažnost derivatizační reakce byla rovněž srovnatelná (99,9 %) při použití poloviční koncentrace DTNB (10 mg.ml^{-1}).

5.1.3. Stanovení produktů oxidačního a nitrosativního stresu v HepG2 buněčné matrici po expozici *t*-BOOH

Při vývoji a optimalizaci metody pro sledování markerů oxidačního stresu *in vitro* byl jako modelový induktor použit *t*-BOOH, který díky své velmi dobré stabilitě v roztoku a absenci specifických intracelulárních detoxifikačních mechanismů, způsobuje trvalé oxidativní poškození biomolekul (Alía et al., 2005). Pomocí cytochromu P450 je *t*-BOOH uvnitř buněk metabolizován za vzniku vysoce reaktivních peroxylových a alkoxylových radikálů (Bartesaghi et al., 2010; Kučera et al., 2014). Poté, co byly HepG2 buňky vystavené působení *t*-BOOH ve třech koncentračních úrovních (100 , 500 a $1000 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$) po dobu 1, 4 a 24 hodin, byly v jejich cytoplazmatickém obsahu stanoveny hladiny MDA, 3-NT, NP-SH a NP-SS-NP (obrázek č. 11). V případě peroxidace lipidů byla v 1- a 4hodinovém inkubačním intervalu sledována koncentrační závislost vzniklého MDA na použitém *t*-BOOH, která zároveň korelovala s poklesem thiolových antioxidantů v podobě NP-SH a kompenzačním nárůstem NP-SS-NP. Tyto výsledky byly ve shodě s dalšími experimenty, kde byl *t*-BOOH o koncentraci $200 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$ používán k indukci oxidačního stresu a po 3 hodinách byl měřen cca 50% nárůst koncentrace MDA (Alía et al., 2006a; Alía et al., 2006b; Goya et al., 2006). Vzhledem k prudkému poklesu buněčné viability po 24hodinové inkubaci (zejména u koncentrací 500 a $1000 \text{ } \mu\text{mol.dm}^{-3}$) nebyl pro MDA pozorován obdobný trend. Podobný výsledek pozoroval Moore et al. (2010), jež zaznamenal pokles buněčné viability a snížení intracelulárního obsahu MDA po 24hodinové expozici organofosfátovému

pesticidu malathionu. Tento jev nastává pravděpodobně v důsledku silné inhibice mitochondriálního ETC, nejvýznamnějšího zdroje ROS uvnitř buňky, ke které dochází v umírajících buňkách (Ott et al., 2007). Svoji roli však může sehrávat i reaktivita MDA vůči dalším biomolekulám (zejména DNA), která je navíc akcelerována nízkou hodnotou pH v průběhu buněčné smrti (Ayala et al., 2014; Sharma et al., 2015).

Vzhledem k extrémně krátkému biologickému poločasu RNS, jejich vysoké reaktivitě vůči široké škále biomolekul a souběžnému vzniku dalších oxidačních produktů tyrosinu (např. hydroxytyrosin a dityrosin) jsou fyziologické intracelulární hladiny 3-NT v porovnání s produkty peroxidace lipidů obecně velmi nízké (Radi et al., 2013). U HepG2 buněk vystavených působení stresoru došlo k významnějšímu nárůstu koncentrace 3-NT pouze při použití *t*-BOOH o koncentraci 1000 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ po dobu 1 hodiny. Po 24 hodinách lze naopak pozorovat pokles jeho množství, který může být způsobený jak jeho zvýšenou metabolizací, tak degradací meziproductů nitrace tyrosinu, ke které dochází např. reakcí s thioley nebo membránovými lipidy (Bartesaghi et al., 2017; Bartesaghi & Radi, 2018). Nadměrná akumulace intracelulárních disulfidů pozorovaná po 4 a 24 hodinách inkubace buněk s *t*-BOOH může být rovněž dalším faktorem, který přispívá k buněčné smrti (Park et al., 2009).

5.2. In vitro hodnocení oxidačního stresu u oximových reaktivátorů AChE

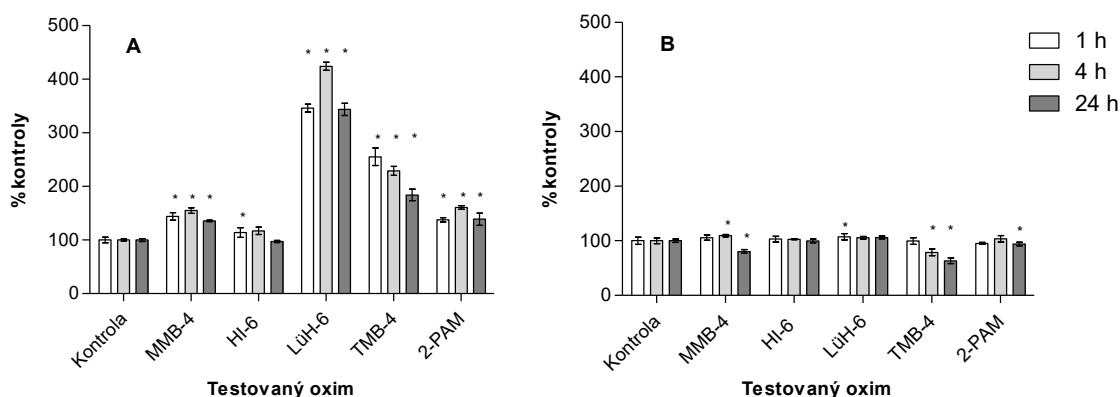
V současné době je k dispozici pouze velmi omezený počet studií popisujících schopnost oximových reaktivátorů AChE indukovat oxidační stres. Většina dat pochází z *in vivo* experimentů, ve kterých byly sledovány zejména hladiny TBARS, LMWA a aktivity antioxidantních enzymů (Vanova et al., 2018a). Metody použité v případě *in vitro* modelů rovněž nehodnotily oxidační stres a jeho důsledky dostatečně komplexně. Hroudová et al. (2011) sledovala vliv oximů HI-6, 2-PAM, TMB-4, MMB-4 a LüH-6 na komplex I ETC u mitochondrií buněk izolovaných z prasečí mozkové tkáně. V tomto případě nebyla u žádného z oximů pozorována interference s intracelulárním energetickým metabolismem spřaženým s ETC, jehož narušení je spojováno s generováním ROS/RNS. U výše zmíněných oximů byly také testovány jejich potenciální antioxidantní vlastnosti za použití 1,1-difenyl-2-pikrylhydrazylového (DPPH) testu, ale ani jeden z nich nevykázal aktivitu vůči DPPH radikálům (Kolečkář et al., 2007). Za účelem poskytnutí detailnější informace o schopnosti oximů generovat ROS/RNS,

ovlivňovat antioxidační systém a případně působit poškození biomolekul byly chromatografické metody vyvinuté a optimalizované v rámci předložené disertační práce doplněny *in vitro* postupy kombinující intracelulární detekci ROS/RNS za použití dvou fluorescenčních sond, dihydrodichlorofluorescein diacetátu (DCFH-DA) a dihydroethidia (DHE; Muckova et al., 2019). Tato metodika byla aplikována na oximy HI-6, 2-PAM, TMB-4, MMB-4 a LüH-6, což jsou léčiva zavedená do klinické praxe a zároveň se jedná o strukturně poměrně heterogenní skupinu sloučenin.

Na základě provedených měření byl jako nejsilnější induktor oxidačního stresu v HepG2 buňkách vyhodnocen LüH-6, pro který byl ve všech třech časových intervalech (1, 4 a 24 hodin) zaznamenán pomocí DCFH-DA nejintenzivnější nárůst ROS/RNS (obrázek č. 15A). Při použití DHE sondy (obrázek č. 15B), která je specifická pouze pro $O_2^{\cdot-}$, byla mírná nadprodukce volných radikálů pozorována pouze v 1hodinovém intervalu. Výsledky stávající disertační práce dále ukazují, že s tvorbou radikálů byl spojen pokles NP-SH (oproti ostatním oximům významně prohloubeným v 24hodinovém intervalu), doprovázený nárůstem koncentrace NP-SS-NP a významnou peroxidací lipidů (zejména po 4- a 24hodinové inkubaci). U LüH-6 byl také pozorován nejvyšší nárůst koncentrace 3-NT, a to ve všech třech časových bodech. Další oximy, u kterých bylo zaznamenáno zvýšení hladin 3-NT, byly TMB-4 a MMB-4. Dále nebyly pozorovány významné rozdíly v poklesu hladin NP-SH mezi jednotlivými hodnocenými oximy, i když se lišily svou schopností generovat ROS/RNS.

Míra oxidačního stresu v dalších skupinách klesala dle následujícího pořadí: TMB-4 > MMB-4 > 2-PAM > HI-6. Několik aspektů nicméně stojí za povšimnutí. Po 4hodinové inkubaci s TMB-4, MMB-4 a LüH-6 byly nalezené srovnatelné hladiny MDA, avšak u MMB-4 byly rozdíly mezi jednotlivými inkubačními intervaly méně znatelné než u TMB-4 a LüH-6. TMB-4 navíc vykázal nejintenzivnější produkci ROS/RNS po 1hodinové inkubaci, zatímco u ostatních oximů byl vrchol produkce ROS/RNS nalezen po 4 hodinách expozice. Mechanismus, který by vysvětlil takto rozdílnou produkci ROS/RNS u TMB-4 však není plně znám. Nižší schopnost oximů indukovat ROS/RNS po 24 hodinách pravděpodobně souvisí (vzhledem k použité koncentraci odpovídající jejich IC_{50}) se zhruba 50% poklesem buněčné viability (obrázek č. 12). Nejslabšími induktory oxidačního stresu byly v této studii oximy HI-6 a 2-PAM. Ačkoliv oxim HI-6 prokázal naprosto minimální schopnost generovat ROS/RNS, byl pro něj pozorován vliv na thiolovou redoxní rovnováhu srovnatelný s ostatními oximy a rovněž byly nalezeny

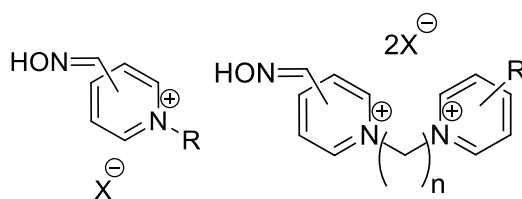
mírně zvýšené hladiny MDA. V případě 3-NT byly nalezené hladiny dokonce nižší, než u kontrolních neovlivněných buněk.



Obrázek č. 15: (převzato z Múčková et al., 2019). Změny v intracelulárních hladinách ROS/RNS měřených DCFH-DA sondou (A) a množství O_2^- hodnocené DHE sondou (B) po 1, 4 a 24 hodinách inkubace s asoximem (HI-6), metoximem (MMB-4), obidoximem (LüH-6), pralidoximem (2-PAM) a trimedoximem (TMB-4) v koncentraci odpovídající jejich hodnotě IC_{50} . Výsledky jsou vyjádřeny v % vůči negativní kontrole (neovlivněné buňky). Hodnoty v grafu představují průměr \pm SD ($n = 3$). Statisticky významné výsledky ($p \leq 0,05$) jsou označeny *.

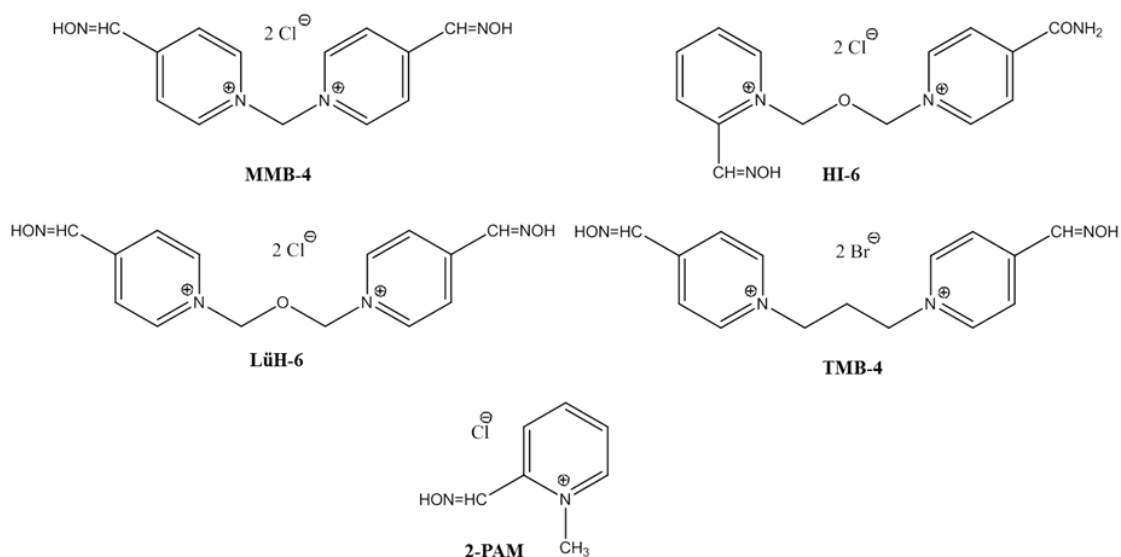
Mechanismy, kterými jednotlivé oximové reaktivátory AChE vyvolávají různou intenzitu oxidačního stresu *in vitro*, zůstávají neznámé. Lze uvažovat o vlivu chemické struktury, jenž může způsobit rozdíly v interakci s jednotlivými intracelulárními komponentami zodpovědnými za indukci/potlačení tvorby ROS/RNS. De Faria et al. (2015) zkoumali vliv struktury fenothiazinových derivátů na mitochondriální dysfunkci způsobenou únikem cytochromu *c*, ke kterému dochází v důsledku působení oxidačního stresu. U těchto sloučenin bylo zjištěno, že délka a charakter postranního řetězce na C2 a na dusíku fenothiazinového jádra významně ovlivňují jejich toxicitu. Vyšší toxicitou se vyznačovaly ty sloučeniny, které byly substituované hydrofobními skupinami obsahujícími piperidin nebo piperazin.

Oximové reaktivátory AChE jsou strukturně mono- a biskvarterní pyridinové sloučeniny, které jsou v poloze 2 nebo 4 pyridinového jádra substituovány funkční aldoximovou skupinou ($R-CH=NOH$) zodpovědnou za vlastní reaktivační účinek léčiva (Jokanović & Prostran, 2009). U biskvarterních oximů se setkáváme s různou délkou a charakterem spojovacího řetězce mezi dvěma dusíky v molekulách pyridinu (obrázek č. 16).



Obrázek č. 16: Základní struktury monokvarterních (A) a biskvarterních (B) oximových reaktivátorů AChE

V provedeném *in vitro* experimentu byly zastoupeny oximy jak monokvarterní (2-PAM), tak biskvarterní (HI-6, LüH-6, TMB-4 a MMB-4; obrázek č. 17). Látky LüH-6, TMB-4 a MMB-4, u nichž byl zjištěn největší potenciál indukovat oxidační stres *in vitro*, jsou strukturně biskvarterní sloučeniny, které obsahují dvě oximové skupiny v poloze 4 každého pyridiniového jádra. Struktury MMB-4 a TMB-4 se od sebe liší délkou spojovacího řetězce, který je u MMB-4 jednonuhlíkatý a u TMB-4 tříuhlíkatý. Tříčlenný spojovací řetězec je rovněž v molekule LüH-6, ale na rozdíl od TMB je substituován atomem kyslíku. Reaktivátory HI-6 a 2-PAM, které indukovali oxidační stres méně intenzivně, obsahují ve své molekule pouze jednu oximovou skupinu, která je na rozdíl od LüH-6, TMB-4 a MMB-4 v poloze 2 pyridiniového jádra. Přítomnost dvou oximových skupin v molekule reaktivátoru se tedy zdá být spojená s vyšším potenciálem generovat oxidační stres. Ačkoliv není přítomnost druhé oximové skupiny pro vlastní reaktivační efekt nezbytná, pozitivně ovlivňuje afinitu oximu k AChE inhibované organofosfátem (Karasova et al., 2009). Vzhledem k tomu, že pyridiniová jádra v molekulách LüH-6 i HI-6 jsou spojeny stejným typem řetězce (metoxymetyl) a obě tyto látky vykázaly odlišnou schopnost produkovat ROS/RNS i různou míru oxidativního poškození biomolekul, lze se domnívat, že kyslík přítomný ve spojovacím řetězci nemá zásadní vliv na indukci oxidačního stresu.



Obrázek č. 17: Chemické struktury metoximu (MMB-4), asoximu (HI-6), obidoximu (LüH-6), pralidoximu (2-PAM) a trimedoximu (TMB-4)

5.3. Stanovení BOS z mozkomíšního moku

Alzheimerova choroba patří mezi nejčastější neurodegenerativní onemocnění postihující převážně seniorskou populaci (> 65 let). Oxidační stres hraje významnou roli jak v iniciační fázi toho onemocnění, tak v jeho progresi (Huang et al., 2016). V mozkomíšním moku pacientů s AD lze obecně pozorovat nárůst koncentrace BOS (Arlt et al., 2002; Praticò et al., 2002; Montine et al., 2004; Butterfield et al., 2001). Zvýšené poškození proteinů způsobené jejich glykací, oxidací a nitrací bylo nalezeno v mozkomíšním moku pacientů s diagnostikovanou AD a v případě 3-NT jeho koncentrace negativně korelovala s výsledkem krátkého testu kognitivních funkcí Mini Mental State Exam (Ahmed et al., 2005). V mozkomíšním moku pacientů ve studii Tohgiho et al. (1999) a některých pacientů ve studii Ryberga et al. (2004) byl rovněž pozorován nárůst koncentrace 3-NT a vyšší poměr 3-NT vůči oxidativně nepozměněnému tyrosinu, jehož hladiny zůstaly u pacientů s AD nezměněny. Naproti tomu stojí práce Korolainena & Pirttiläho (2009), v níž nebyly v mozkomíšním moku a mozkové tkáni pacientů s AD a věkově odpovídající kontrolní skupiny sledovány žádné výrazné změny v hladinách markerů oxidativního poškození proteinů v podobě 3-NT a karbonylovaných proteinů.

Nadměrná stimulace NMDA receptorů spouští kaskádu intracelulárních dějů (včetně oxidačního stresu) vedoucích k poškození neuronů a následnému deficitu kognitivních

funkcí (Pietá Dias et al., 2007). Memantin, vzhledem ke svému mechanismu účinku spočívajícím v antagonismu NMDA receptorů, patří mezi základní léčiva v terapii AD, a to zejména u těžších forem tohoto onemocnění (Casey et al., 2010). Ve studii dle De Felice et al. (2007), která byla prováděna na hipokampálních neuronálních buněčných kulturách, byly poruchy funkce NMDA receptorů indukované oligomery A β (ADDL) spojovány s vyššími hladinami ROS. Ačkoliv dochází působením ADDL také k nadměrnému uvolňování glutamátu z poškozených neuronů, intenzivnější produkce ROS je s vyšší pravděpodobností způsobena přímou interakcí ADDL s NMDA receptory, neboť podání memantinu blokovalo nadměrnou produkci oxidačního stresu. Další studie uvádí, že oxidativní poškození neuronů souvisí kromě vlastní stimulace NMDA receptorů také s jejich lokalizací na membráně nervové buňky. Zatímco oxidační stres spojený se zvýšeným influxem Ca²⁺ přes synaptické NMDA receptory není považován za neurotoxický, hyperstimulace extrasynaptických receptorů, jež jsou lokalizovány na dendritických výběžcích neuronů, vyvolává excitotoxicitu. Memantin (v terapeutické dávce) vykazuje preferenci vůči extrasynaptickým receptorům (Wang et al., 2013; Zhang et al., 2016).

Stanovením vybraných BOS z mozkomíšního moku pomocí HPLC byla sledována schopnost memantinu ovlivnit oxidační stres u 22 pacientů s AD, kterým bylo léčivo v dávce 20 mg/den (p.o.) podáváno po dobu alespoň 3 měsíců. V tomto případě terapie memantinem pozitivně ovlivnila hladiny 3-NT a NP-SH, což naznačuje roli NMDA receptorů v procesu vzniku a škodlivého působení oxidačního stresu.

6. Přínos práce

Hlavní přínos předložené disertační práce spočívá v zavedení nové LC-MS/MS metody pro simultánní stanovení MDA a 3-NT, která zahrnuje i postup pro izolaci těchto markerů oxidačního stresu z biologické matrice (Vanova et al., 2018b). Díky této metodě lze současně v jednom vzorku hodnotit jak oxidační poškození lipidů, tak nitrosativní poškození proteinů. Tím dochází nejen ke snížení požadavku na vstupní množství biologického materiálu, ale také k časové úspoře při jeho zpracování. Společně s dalšími metodami sloužícími k monitorování thiolové redoxní rovnováhy pomocí HPLC-UV a stanovení intracelulárních hladin ROS/RNS fluorescenčními sondami tak představuje užitečný nástroj pro hodnocení oxidačního stresu *in vitro*, využitelný např. v preklinickém hodnocení cytotoxicity nových potenciálních léčiv i jiných xenobiotik. Díky kompatibilitě metody a postupu pro zpracování vzorku s tělními tekutinami (mozkomíšni mok) ji lze rovněž použít pro hodnocení oxidačního stresu vznikajícího *in vivo*.

7. Závěr

Testování toxicity patří vedle potvrzení vlastního farmakologického účinku mezi základní procesy probíhající v preklinickém hodnocení nových potenciálních léčiv. Ačkoliv *in vitro* modely nedokáží plně nahradit testování *in vivo*, umožňují screeningem většího počtu sloučenin vyřadit nevhodné kandidáty z řad potenciálních léčiv a tím snížit počet pokusných zvířat v rámci navazujícího hodnocení, což má kromě etického hlediska význam také v časové a finanční úspoře. Výběrem vhodného *in vitro* modelu lze také dobře simulovat podmínky, při kterých je možné studovat mechanismy toxického působení léčiv. Oxidační stres patří mezi jeden z možných mechanismů podílejících se na toxicitě léčiv a je spojován s jejich hepatotoxicitou, nefrotoxicitou a kardiotoxicitou. Protože oxidační stres je komplexní proces, je potřeba stejným způsobem přistupovat i k jeho monitorování, tzn. nejen hodnotit schopnost léčiva generovat ROS/RNS, ale také sledovat vliv nadprodukce ROS/RNS na intracelulární antioxidační systémy. Pokud dojde k překročení jejich kapacity, je vhodné stanovit markery oxidativního poškození biomolekul. Vzhledem k velmi krátké životnosti ROS/RNS, lze tyto vysoce reaktivní sloučeniny detekovat přímo a neinvazivně jen velmi obtížně, zejména u *in vivo* experimentů. Zavedené chromatografické metody pro sledování biomarkerů oxidačního stresu, kterými lze hodnotit thiolovou redoxní rovnováhu a sledovat tvorbu produktů oxidativního poškození lipidů a nitrosativního poškození proteinů, prokázaly svou kompatibilitu s metodami používanými pro stanovení intracelulárních koncentrací ROS/RNS využívajících fluorescenčních sond. Společně tedy představují komplexní a vzájemně doplňující se přístup k hodnocení oxidačního stresu *in vitro*. Výsledky, které vznikly aplikací těchto metod na vzorky připravené z HepG2 buněk vystavených působení klinicky nepoužívanějším oximovým reaktivátorům AChE dále poslouží pro hodnocení nových potenciálních léčiv ze skupiny antidot proti NPL, která jsou připravována na Katedře toxikologie a vojenské farmacie FVZ UO. Vzhledem k tomu, že testované oximy různé chemické struktury vykazovaly odlišnou schopnost indukovat oxidační stres, lze tuto metodiku použít například ke studiu vztahu mezi strukturou léčiva a jeho působením na intracelulární redoxní homeostázu. Kompatibilita těchto chromatografických metod s biologickým materiálem různého původu navíc umožňuje objektivnější hodnocení potenciálu léčiva generovat oxidační stres jak *in vitro*, tak *in vivo*.

Reference

A Pilot Study Using Rocuronium to Prevent Intermediate Syndrome After Organophosphorus Insecticide Poisoning. *Clinicaltrials.gov* [online].USA, 2014-2016, [cit. 2018-07-01]. Dostupné z: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02147054>

ABDEL-RAHMAN, A., Suzanne ABOU-DONIA, Eman EL-MASRY, Ashok SHETTY a Mohamed ABOU-DONIA. Stress and combined exposure to low doses of pyridostigmine bromide, DEET, and permethrin produce neurochemical and neuropathological alterations in cerebral cortex, hippocampus, and cerebellum. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A* [online]. 2004, **67**(2), 163–192. ISSN 1528-7394.

ABDOLLAHI, Mohaad a Somayyeh KARAMI-MOHAJERI. A comprehensive review on experimental and clinical findings in intermediate syndrome caused by organophosphate poisoning. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2012, **258**(3), 309–314. ISSN 0041-008X.

ABDOLLAHI, Mohammad, Sara MOSTAFALOU, Shirin POURNOURMOHAMMADI a Shahin SHADNIA. Oxidative stress and cholinesterase inhibition in saliva and plasma of rats following subchronic exposure to malathion. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* [online]. 2004, **137**(1), 29–34. ISSN 1532-0456.

ABE, Takashi, Hideo TOHGI, Chiaki ISOBE, Takahiko MURATA a Chigumi SATO. Remarkable increase in the concentration of 8-hydroxyguanosine in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer's disease. *Journal of Neuroscience Research* [online]. 2002, **70**(3), 447–450. ISSN 1097-4547.

ABU-QARE, A. W. a M. B. ABOU-DONIA. Combined exposure to sarin and pyridostigmine bromide increased levels of rat urinary 3-nitrotyrosine and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, biomarkers of oxidative stress. *Toxicology Letters*. 2001, **123**(1), 51–58. ISSN 0378-4274.

AGARWAL, Rajiv a Shawn D. CHASE. Rapid, fluorimetric–liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *Journal of Chromatography B* [online]. 2002, **775**(1), 121–126. ISSN 1570-0232.

AHMED, Naila, Usman AHMED, Paul J. THORNALLEY, Klaus HAGER, Gerd FLEISCHER a Gerald MÜNCH. Protein glycation, oxidation and nitration adduct residues and free adducts of cerebrospinal fluid in Alzheimer's disease and link to cognitive impairment. *Journal of Neurochemistry* [online]. 2005, **92**(2), 255–263. ISSN 1471-4159.

AKHGARI, Maryam, Mohammad ABDOLLAHI, Abbas KEBRYAEEZADEH, Ruhollah HOSSEINI a Omid SABZEVARI. Biochemical evidence for free radical-induced lipid peroxidation as a mechanism for subchronic toxicity of malathion in blood and liver of rats. *Human & Experimental Toxicology*. 2003, **22**, 205–211. ISSN 0960-3271.

ALÍA, Mario, Raquel MATEOS, Sonia RAMOS, Elena LECUMBERRI, Laura BRAVO a Luis GOYA. Influence of quercetin and rutin on growth and antioxidant defense system of a human hepatoma cell line (HepG2). *European Journal of Nutrition* [online]. 2006a, **45**(1), 19–28. ISSN 1436-6207.

ALÍA, Mario, Sonia RAMOS, Raquel MATEOS, Ana Belén GRANADO-SERRANO, Laura BRAVO a Luis GOYA. Quercetin protects human hepatoma HepG2 against oxidative stress induced by tert-butyl hydroperoxide. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2006b, **212**(2), 110–118. ISSN 0041-008X.

ALÍA, Mario, Sonia RAMOS, Raquel MATEOS, Laura BRAVO a Luis GOYA. Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* [online]. 2005, **19**(2), 119–128. ISSN 1095-6670.

ALTUNTAS, I, N. DELIBAS a R. SUTCU. The effects of organophosphate insecticide methidathion on lipid peroxidation and anti-oxidant enzymes in rat erythrocytes: role of vitamins E and C. *Human & Experimental Toxicology* [online]. 2002, **21**(12), 681–685. ISSN 0960-3271.

AMANI, Nahid, Maliheh SOODI, Bahram DARAEI a Abolfazl DASHTI. Chlorpyrifos Toxicity in Mouse Cultured Cerebellar Granule Neurons at Different Stages of Development: Additive Effect on Glutamate-Induced Excitotoxicity. *Cell Journal*. 2016, **18**(3), 464–472. ISSN 2228-5806.

AMERICAN PSYCHIATRIC ASSOCIATION. Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, 4th Edition (DSM-IV). *American Psychiatric Association* 1994 (Washington). 143–147.

ANDREOLI, Roberta, Paola MANINI, Massimo CORRADI, Antonio MUTTI a Wilfried M. A. NIESSEN. Determination of patterns of biologically relevant aldehydes in exhaled breath condensate of healthy subjects by liquid chromatography/atmospheric chemical ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* [online]. 2003, **17**(7), 637–645. ISSN 1097-0231.

ANTONIJEVIC, Evica, Jelena KOTUR-STEVLJEVIC, Kamil MUSILEK, Andrea KOSVANCOVA, Kamil KUCA, Danijela DJUKIC-COSIC, Vesna SPASOJEVIC-KALIMANOVSKA a Biljana ANTONIJEVIC. Effect of six oximes on acutely anticholinesterase inhibitor-induced oxidative stress in rat plasma and brain. *Archives of Toxicology* [online]. 2018, **92**(2), 745–757. ISSN 1432-0738.

AOYAMA, Koji, Kazuo MATSUBARA, Yasunori FUJIKAWA, Yukio NAGAIHIRO, Keiko SHIMIZU, Nobuyuki UMEGAE, Nobumasa HAYASE, Hiroshi SHIONO a Shotai KOBAYASHI. Nitration of manganese superoxide dismutase in cerebrospinal fluids is a marker for peroxynitrite-mediated oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Annals of Neurology* [online]. 2000, **47**(4), 524–527. ISSN 1531-8249.

ARIËNS, A. Th, E. MEETER, O. L. WOLTHUIS a R. M. J. van BENTHEM. Reversible necrosis at the end-plate region in striated muscles of the rat poisoned with cholinesterase inhibitors. *Experientia* [online]. 1969, **25**(1), 57–59. ISSN 0014-4754, 1420-9071.

ARLT, Sönke, Anatol KONTUSH, Inga ZERR, Carsten BUHMANN, Christian JACOBI, Andreas SCHRÖTER, Sigrid POSER a Ulrike BEISIEGEL. Increased lipid

peroxidation in cerebrospinal fluid and plasma from patients with Creutzfeldt-Jakob disease. *Neurobiology of Disease*. 2002, **10**(2), 150–156. ISSN 0969-9961.

AYALA, Antonio, Mario F. MUÑOZ a Sandro ARGÜELLES. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2014, **2014**, 1-31.

BALCERCZYK, Aneta a Grzegorz BARTOSZ. Thiols are main determinants of total antioxidant capacity of cellular homogenates. *Free Radical Research*. 2003, **37**(5), 537–541. ISSN 1071-5762.

BANERJEE, B. D., V. SETH, A. BHATTACHARYA, S. T. PASHA a A. K. CHAKRABORTY. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology Letters* [online]. 1999, **107**(1), 33–47. ISSN 0378-4274.

BANERJEE, Sharmistha, Jyotirmoy GHOSH a Parames C. SIL. Drug Metabolism and Oxidative Stress: Cellular Mechanism and New Therapeutic Insights. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* [online]. 2016, **5**(1) .ISSN 2161-1009.

BARTESAGHI, Silvina a Rafael RADI. Fundamentals on the biochemistry of peroxynitrite and protein tyrosine nitration. *Redox Biology* [online]. 2018, **14**, 618–625. ISSN 2213-2317.

BARTESAGHI, Silvina, Daniel HERRERA, Débora M. MARTINEZ, Ariel PETRUK, Verónica DEMICHELI, Madia TRUJILLO, Marcelo A. MARTÍ, Darío A. ESTRÍN a Rafael RADI. Tyrosine oxidation and nitration in transmembrane peptides is connected to lipid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2017, **622**, 9–25. ISSN 1096-0384.

BARTESAGHI, Silvina, Jorge WENZEL, Madia TRUJILLO, Marcos LÓPEZ, Joy JOSEPH, Balaraman KALYANARAMAN a Rafael RADI. Lipid peroxy radicals mediate tyrosine dimerization and nitration in membranes. *Chemical research in toxicology* [online]. 2010, **23**(4), 821–835. ISSN 0893-228X.

BARTOSOVA, Lucie, Kamil KUČA, Gabriela KUNESOVA a Daniel JUN. The Acute Toxicity of Acetylcholinesterase Reactivators in Mice in Relation to Their Structure. *Neurotoxicity Research* [online]. 2006, **9**(4), 291. ISSN 1029-8428, 1476-3524.

BEREND, Suzana, Ana LUCIĆ VRDOLJAK, Kamil MUSILEK, Kamil KUČA a Božica RADIĆ. Effects of Oxime K203 and Oxidative Stress in Plasma of Tabun Poisoned Rats. *Croatica Chemica Acta* [online]. 2012, **85**(2), 193-199.

BINUKUMAR, B. K., Amanjit BAL, Ramesh KANDIMALLA, Aditya SUNKARIA a Kiran Dip GILL. Mitochondrial energy metabolism impairment and liver dysfunction following chronic exposure to dichlorvos. *Toxicology* [online]. 2010, **270**(2), 77–84. ISSN 0300-483X.

BIRBEN, Esra, Umit Murat SAHINER, Cansin SACKESEN, Serpil ERZURUM a Omer KALAYCI. Oxidative stress and antioxidant defense. *The World Allergy Organization Journal* [online]. 2012, **5**(1), 9–19. ISSN 1939-4551.

BONORA, Massimo, Carlotta GIORGI a Paolo PINTON. Novel frontiers in calcium signaling: A possible target for chemotherapy. *Pharmacological Research* [online]. 2015, **99**, 82–85. ISSN 1096-1186.

BOYSEN, Gunnar, Leonard B. COLLINS, Shengkai LIAO, April M. LUKE, Brian F. PACHKOWSKI, Joanne L. WATTERS a James A. SWENBERG. Analysis of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine by ultra high pressure liquid chromatography-heat assisted electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2010, **878**(3–4), 375–380. ISSN 1873-376X.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, **72**, 248–254. ISSN 0003-2697.

BUTTERFIELD, D. A., J. DRAKE, C. POCERNICH a A. CASTEGNA. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends in Molecular Medicine*. 2001, **7**(12), 548–554. ISSN 1471-4914.

BÜYÜKOKUROĞLU, Mehmet Emin, Mustafa CEMEK, Murat TOSUN, Yusuf YÜRÜMEZ, Orhan BAŞ a Yücel YAVUZ. Dantrolene may prevent organophosphate-induced oxidative stress and muscle injury. *Pesticide Biochemistry and Physiology* [online]. 2008, **92**(3), 156–163. ISSN 0048-3575.

CABAL, Jiri, K. KUCA a J. KASSA. Specification of the structure of oximes able to reactivate tabun-inhibited acetylcholinesterase. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* [online]. 2004, **95**(2), 81–86. ISSN 1742-7835.

CANKAYALI, Ilkin, Kubilay DEMIRAG, Oguz ERIS, Biltan ERSOZ a Ali Resat MORAL. The effects of N-acetylcysteine on oxidative stress in organophosphate poisoning model. *Advances in Therapy* [online]. 2005, **22**(2), 107–116. ISSN 0741-238X, 1865-8652.

CAREY, Jennifer L., Courtney DUNN a Romolo J. GASPARI. Central respiratory failure during acute organophosphate poisoning. *Respiratory Physiology & Neurobiology* [online]. 2013, **189**(2), Clinical Challenges to Ventilatory Control, 403–410. ISSN 1569-9048.

CASEY, David A., Demetra ANTIMISIARIS a James O'BRIEN. Drugs for Alzheimer's Disease: Are They Effective? *Pharmacy and Therapeutics*. 2010, **35**(4), 208–211. ISSN 1052-1372.

CEMEK, Mustafa, Mehmet Emin BÜYÜKOKUROĞLU, Ahmet BÜYÜKBEN, Fatih AYMELEK a Levent ÖZCAN. Effects of vitamin E and selenium on tissue bioelement status in organophosphate toxicity of rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology* [online]. 2010, **98**(1), 9–18. ISSN 0048-3575.

CHAMBERS, Janice E., Howard W. CHAMBERS, Kristen E. FUNCK, Edward C. MEEK, Ronald B. PRINGLE a Matthew K. ROSS. Efficacy of novel phenoxyalkyl pyridinium oximes as brain-penetrating reactivators of cholinesterase inhibited by surrogates of sarin and VX. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2016, **259**(Pt B), 154–159. ISSN 1872-7786.

CHEIGNON, C., M. TOMAS, D. BONNEFONT-ROUSSELOT, P. FALLER, C. HUREAU a F. COLLIN. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biology* [online]. 2017, **14**, 450–464. ISSN 2213-2317.

CHEN, Jian-Lian, Yu-Jie HUANG, Chih-Hong PAN, Chiung-Wen HU a Mu-Rong CHAO. Determination of urinary malondialdehyde by isotope dilution LC-MS/MS with automated solid-phase extraction: A cautionary note on derivatization optimization. *Free Radical Biology and Medicine* [online]. 2011, **51**(9), 1823–1829. ISSN 0891-5849.

CHEN, Wei, Yong ZHAO, Teresa SEEFELDT a Xiangming GUAN. Determination of thiols and disulfides via HPLC quantification of 5-thio-2-nitrobenzoic acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2008, **48**(5), 1375–1380. ISSN 0731-7085.

CHEN, Yun. Organophosphate-induced brain damage: mechanisms, neuropsychiatric and neurological consequences, and potential therapeutic strategies. *Neurotoxicology* [online]. 2012, **33**(3), 391–400. ISSN 1872-9711.

CHMÁTALOVÁ, Z., a A. SKOUMALOVÁ. Oxidační stres u Alzheimerovy choroby a jeho důsledky. *Klinická Biochemie a Metabolismus* [online]. 2014, **22**(4), 189-175.

CIGHETTI, Giuliana, Pietro ALLEVI, Luigi ANASTASIA, Luana BORTONE a Rita PARONI. Use of Methyl Malondialdehyde as an Internal Standard for Malondialdehyde Detection: Validation by Isotope-Dilution Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*. 2002, **48**(12), 2266–2269. ISSN 0009-9147, 1530-8561.

ČOLOVIĆ, Mirjana B, Danijela Z KRSTIĆ, Tamara D LAZAREVIĆ-PAŠTI, Aleksandra M BONDŽIĆ a Vesna M VASIĆ. Acetylcholinesterase Inhibitors: Pharmacology and Toxicology. *Current Neuropharmacology* [online]. 2013, **11**(3), 315–335. ISSN 1570-159X.

COOKE, Marcus S., Mark D. EVANS, Miral DIZDAROGLU a Joseph LUNEC. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB journal: official*

publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology [online]. 2003, **17**(10), 1195–1214. ISSN 1530-6860.

CRUZ, Daniel Filipe a Margarida FARDILHA. Relevance of peroxynitrite formation and 3-nitrotyrosine on spermatozoa physiology. *Porto Biomedical Journal* [online]. 2016, **1**(4), 129–135. ISSN 2444-8664.

CZAUDERNA, Marian, Jan KOWALCZYK a Milan MAROUNEK. The simple and sensitive measurement of malondialdehyde in selected specimens of biological origin and some feed by reversed phase high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2011, **879**(23), 2251–2258. ISSN 1873-376X.

DA SILVA, Aline P., Marcelo FARINA, Jeferson L. FRANCO, Alcir L. DAFRE, Jiri KASSA a Kamil KUCA. Temporal effects of newly developed oximes (K027, K048) on malathion-induced acetylcholinesterase inhibition and lipid peroxidation in mouse prefrontal cortex. *Neurotoxicology* [online]. 2008, **29**(1), 184–189. ISSN 0161-813X.

DALLE-DONNE, Isabella, Ranieri ROSSI, Daniela GIUSTARINI, Aldo MILZANI a Roberto COLOMBO. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* [online]. 2003, **329**(1), 23–38. ISSN 0009-8981.

DE FARIA, Priscila A., Fernanda BETTANIN, Rodrigo L. O. R. CUNHA, Edgar J. PAREDES-GAMERO, Paula HOMEM-DE-MELLO, Iseli L. NANTES a Tiago RODRIGUES. Cytotoxicity of phenothiazine derivatives associated with mitochondrial dysfunction: a structure-activity investigation. *Toxicology* [online]. 2015, **330**, 44–54. ISSN 1879-3185.

DE FELICE, Fernanda G., Pauline T. VELASCO, Mary P. LAMBERT, Kirsten VIOLA, Sara J. FERNANDEZ, Sergio T. FERREIRA a William L. KLEIN. Abeta oligomers induce neuronal oxidative stress through an N-methyl-D-aspartate receptor-dependent mechanism that is blocked by the Alzheimer drug memantine. *The Journal of Biological Chemistry* [online]. 2007, **282**(15), 11590–11601. ISSN 0021-9258.

DEAVALL, Damian G., Elizabeth A. MARTIN, Judith M. HORNER a Ruth ROBERTS. Drug-Induced Oxidative Stress and Toxicity. *Journal of Toxicology* [online]. 2012, **2012**, 1-13.

DEL RIO, Daniele, Amanda J. STEWART a Nicoletta PELLEGRINI. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD* [online]. 2005, **15**(4), 316–328. ISSN 0939-4753.

DELATOUR, Thierry, Janique RICHOZ, Paul VOUIROS a Robert J. TURESKY. Simultaneous determination of 3-nitrotyrosine and tyrosine in plasma proteins of rats and assessment of artifactual tyrosine nitration. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2002, **779**(2), 189–199. ISSN 1570-0232.

DELGADO, Eduardo H. B., Emilio L. STRECK, João L. QUEVEDO a Felipe DAL-PIZZOL. Mitochondrial Respiratory Dysfunction and Oxidative Stress after Chronic Malathion Exposure. *Neurochemical Research* [online]. 2006, **31**(8), 1021–1025. ISSN 0364-3190, 1573-6903.

DENEKE, S. M. Thiol-based antioxidants. *Current Topics in Cellular Regulation*. 2000, **36**, 151–180. ISSN 0070-2137.

DIMOV, Dimo, Radka HADJIOLOVA, Kamen KANEV, Radka TOMOVA, Anna MICHOVA, Todor TODOROV, Rumen MURDJEV, Temenujka BONEVA a Ivanka DIMOVA. Cardiac and renal nitrosative-oxidative stress after acute poisoning by a nerve agent Tabun. *Journal of Environmental Science and Health. Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* [online]. 2015, **50**(8), 824–829. ISSN 1532-4117.

DIZDAROGLU, M., P. JARUGA a H. RODRIGUEZ. Measurement of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry: comparison with measurement by gas chromatography-mass spectrometry. *Nucleic Acids Research*. 2001, **29**(3), E12. ISSN 1362-4962.

DOS SANTOS, Alessandra Antunes, Danúbia Bonfanti DOS SANTOS, Renata Pietsch RIBEIRO, Dirleise COLLE, Kaite Cristiane PERES, Júlia HERMES, Anderson Machado BARBOSA, Alcir Luiz DAFRÉ, Andreza Fabro DE BEM, Kamil KUCA a Marcelo FARINA. Effects of K074 and pralidoxime on antioxidant and acetylcholinesterase response in malathion-poisoned mice. *Neurotoxicology* [online]. 2011, **32**(6), 888–895. ISSN 1872-9711.

DRTINOVA, Lucie a Miroslav POHANKA. Antioxidant markers in guinea pig exposed to obidoxime and HI-6 acetylcholinesterase oxime reactivators containing oxime moiety. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 2013, **7**(31), 2252–2257. ISSN 1996-0816.

DUNCAN, M. W. A review of approaches to the analysis of 3-nitrotyrosine. *Amino Acids* [online]. 2003, **25**(3–4), 351–361. ISSN 0939-4451, 1438-2199.

EDDLESTON, Michael a Fazle Rabbi CHOWDHURY. Pharmacological treatment of organophosphorus insecticide poisoning: the old and the (possible) new. *British Journal of Clinical Pharmacology* [online]. 2016, **81**(3), 462–470. ISSN 1365-2125.

EDDLESTON, Michael, Nick A BUCKLEY, Peter EYER a Andrew H DAWSON. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *The Lancet* [online]. 2008, **371**(9612), 597–607. ISSN 0140-6736.

ELSHARKAWY, Eman E., Doha YAHIA a Neveen A. EL-NISR. Sub-chronic exposure to chlorpyrifos induces hematological, metabolic disorders and oxidative stress in rat: Attenuation by glutathione. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2013, **35**(2), 218–227. ISSN 1382-6689.

EVANS, Mark D., Miral DIZDAROGLU a Marcus S. COOKE. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutation Research* [online]. 2004, **567**(1), 1–61. ISSN 0027-5107.

FANG, Yun-Zhong, Sheng YANG a Guoyao WU. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*. 2002, **18**(10), 872–879. ISSN 0899-9007.

FAULSTICH, H., P. TEWS a D. HEINTZ. Determination and Derivatization of Protein Thiols by n-Octyldithionitrobenzoic Acid. *Analytical Biochemistry* [online]. 1993, **208**(2), 357–362. ISSN 0003-2697.

FEISSNER, Robert F., Jolanta SKALSKA, Winston E. GAUM a Shey-Shing SHEU. Crosstalk signaling between mitochondrial Ca^{2+} and ROS. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2009, **14**, 1197–1218. ISSN 1093-9946.

FORTUNATO, Jucélia J., Gustavo FEIER, Angeles M. VITALI, Fabrícia C. PETRONILHO, Felipe DAL-PIZZOL a João QUEVEDO. Malathion-induced Oxidative Stress in Rat Brain Regions. *Neurochemical Research* [online]. 2006, **31**(5), 671–678. ISSN 0364-3190, 1573-6903.

FROST, M. T., B. HALLIWELL a K. P. MOORE. Analysis of free and protein-bound nitrotyrosine in human plasma by a gas chromatography/mass spectrometry method that avoids nitration artifacts. *Biochemical Journal*. 2000, **345**(Pt 3), 453–458. ISSN 0264-6021.

GIERA, Martin, Henk LINGEMAN a Wilfried M. A. NIESSEN. Recent Advancements in the LC- and GC-Based Analysis of Malondialdehyde (MDA): A Brief Overview. *Chromatographia* [online]. 2012, **75**(9–10), 433–440. ISSN 0009-5893, 1612-1112.

GIORDANO, Gennaro, Zhara AFSHARINEJAD, Marina GUIZZETTI, Annabella VITALONE, Terrance J. KAVANAGH a Lucio G. COSTA. Organophosphorus insecticides chlorpyrifos and diazinon and oxidative stress in neuronal cells in a genetic model of glutathione deficiency. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2007, **219**(2–3), 181–189. ISSN 0041-008X.

GIUSTARINI, Daniela, Isabella DALLE-DONNE, Dimitrios TSIKAS a Ranieri ROSSI. Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* [online]. 2009, **46**(5-6), 241-28. ISSN 1040-8363.

GLYNN, Paul. A mechanism for organophosphate-induced delayed neuropathy. *Toxicology Letters* [online]. 2006, **162**(1), 94–97. ISSN 0378-4274.

GOYA, Luis, Cristina DELGADO-ANDRADE, José A. RUFÍAN-HENARES, Laura BRAVO a Francisco J. MORALES. Effect of coffee Melanoidin on human hepatoma HepG2 cells. Protection against oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide. *Molecular Nutrition & Food Research* [online]. 2007, **51**(5), 536-545.

GROTTO, D., L. D. SANTA MARIA, S. BOEIRA, J. VALENTINI, M. F. CHARÃO, A. M. MORO, P. C. NASCIMENTO, V. J. POMBLUM a S. C. GARCIA. Rapid quantification of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography-visible detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2007, **43**(2), 619–624. ISSN 0731-7085.

GROTTO, Denise, Lucas Santa MARIA, Juliana VALENTINI, Clóvis PANIZ, Gabriela SCHMITT, Solange Cristina GARCIA, Valdeci Juarez POMBLUM, João Batista T. ROCHA a Marcelo FARINA. Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects FOR malondialdehyde quantification. *Química Nova* [online]. 2009, **32**(1), 169–174. ISSN 0100-4042.

GRYSZCZYŃSKA, Bogna, Dorota FORMANOWICZ, Magdalena BUDZYŃ, Maria WANIC-KOSSOWSKA, Elżbieta PAWLICZAK, Piotr FORMANOWICZ, Waclaw MAJEWSKI, Krzysztof Wojciech STRZYŻEWSKI, Magdalena P. KASPRZAK a Maria ISKRA. Advanced Oxidation Protein Products and Carbonylated Proteins as Biomarkers of Oxidative Stress in Selected Atherosclerosis-Mediated Diseases. *BioMed Research International* [online]. 2017, **2017**. ISSN 2314-6133.

GUAN, Xiangming, Brianna HOFFMAN, Chandradhar DWIVEDI a Duane P. MATTHEES. A simultaneous liquid chromatography/mass spectrometric assay of glutathione, cysteine, homocysteine and their disulfides in biological samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2003, **31**(2), 251–261. ISSN 0731-7085.

GUMUSYAYLA, Sadiye, Gonul VURAL, Hesna BEKTAS, Orhan DENIZ, Salim NESELIOGLU a Ozcan EREL. A novel oxidative stress marker in patients with Alzheimer's disease: dynamic thiol–disulphide homeostasis. *Acta Neuropsychiatrica* [online]. 2016, **28**(6), 315–320. ISSN 0924-2708, 1601-5215.

HALDAR, Soma, Sudeshna BHATTACHARYA, Biplab GIRI, Shyamal Das GUPTA, NiladriShekhar BHUNIA, AnindyaSundar BHUNIA, Sajal RAY, Mitali RAY, Rahul BHATTACHARYA a Pratiti GHOSH. Effect of Cold Stress on Pyridostigmine Pretreated Rats Exposed to an Organophosphorous Compound. *Journal of Life Sciences Research*. 2014, **1**(1), 10–15. ISSN 2408-9184.

HALLIWELL, Barry a Matthew WHITEMAN. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *British Journal of Pharmacology* [online]. 2004, **142**(2), 231–255. ISSN 0007-1188.

HALLIWELL, Barry. Biochemistry of oxidative stress. *Biochemical Society Transactions* [online]. 2007, **35**(Pt 5), 1147–1150. ISSN 0300-5127.

HNÍZDOVÁ, Iveta, Lenka LUHOVÁ a Marek PETŘIVALSKÝ. Nitrate proteinů reaktivními formami dusíku. *Chemické listy*. 2009, (103), 788-794.

HORT, J., J. T. O'BRIEN, G. GAINOTTI, T. PIRTTILA, B. O. POPESCU, I. REKTOROVA, S. SORBI, P. SCHELTENS a EFNS SCIENTIST PANEL ON DEMENTIA. EFNS guidelines for the diagnosis and management of Alzheimer's disease. *European Journal of Neurology* [online]. 2010, **17**(10), 1236–1248. ISSN 1468-1331.

HROUDOVÁ, A., D. FISAR, J. KORÁBEČNÝ, K. KUČA. In vitro effects of acetylcholinesterase inhibitors and reactivators on Complex I of electron transport chain. *Neuroendocrinology Letters*. 2011, **32**(3), 259-263.

HUANG, WEN-JUAN, XIA ZHANG a WEI-WEI CHEN. Role of oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biomedical Reports* [online]. 2016, **4**(5), 519–522. ISSN 2049-9434.

HULSE, Elspeth J., James O. J. DAVIES, A. John SIMPSON, Alfred M. SCIUTO a Michael EDDLESTON. Respiratory Complications of Organophosphorus Nerve Agent and Insecticide Poisoning. Implications for Respiratory and Critical Care. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* [online]. 2014, **190**(12), 1342–1354. ISSN 1073-449X.

HUSAIN, Kazim a Satu M. SOMANI. Persistent/delayed toxic effects of low-dose sarin and pyridostigmine under physical stress (exercise) in mice. *Indian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2004, **48**(2), 150–164. ISSN 0019-5499.

ISHII, Yuji, Masayoshi IJIMA, Takashi UMEMURA, Akiyoshi NISHIKAWA, Yusuke IWASAKI, Rie ITO, Koichi SAITO, Masao HIROSE a Hiroyuki NAKAZAWA. Determination of nitrotyrosine and tyrosine by high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry and immunohistochemical analysis in livers of mice administered acetaminophen. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2006, **41**(4), 1325–1331. ISSN 0731-7085.

JAFARI, Mahvash, Maryam SALEHI, Alireza ASGARI, Sediq AHMADI, Maryam ABBASNEZHAD, Reza HAJIHOOSANI a Mansoure HAJIGHOLAMALI. Effects of paraoxon on serum biochemical parameters and oxidative stress induction in various tissues of Wistar and Norway rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2012, **34**(3), 876–887. ISSN 1382-6689.

JEYARASASINGAM, G., M. YELUASHVILI a M. QUIK. Nitric oxide is involved in acetylcholinesterase inhibitor-induced myopathy in rats. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2000, **295**, 314–20.

JIMÉNEZ-JIMÉNEZ, F. J., F. de BUSTOS, J. A. MOLINA, J. BENITO-LEÓN, A. TALLÓN-BARRANCO, T. GASALLA, M. ORTÍ-PAREJA, F. GUILLAMÓN, J. C. RUBIO, J. ARENAS a R. ENRÍQUEZ-DE-SALAMANCA. Cerebrospinal fluid levels of alpha-tocopherol (vitamin E) in Alzheimer's disease. *Journal of Neural Transmission* [online]. 1997, **104**(6–7), 703–710. ISSN 0300-9564, 1435-1463

JOHN, Susan, Manisha KALE, Nisha RATHORE a Deepak BHATNAGAR. Protective effect of vitamin E in dimethoate and malathion induced oxidative stress in rat erythrocytes. *The Journal of Nutritional Biochemistry* [online]. 2001, **12**(9), 500–504. ISSN 0955-2863.

JOKANOVIĆ, Milan a Milica PROSTRAN. Pyridinium oximes as cholinesterase reactivators. Structure-activity relationship and efficacy in the treatment of poisoning

with organophosphorus compounds. *Current Medicinal Chemistry*. 2009, **16**(17), 2177–2188. ISSN 0929-8673.

JOKANOVIĆ, Milan a Miloš P. STOJILJKOVIĆ. Current understanding of the application of pyridinium oximes as cholinesterase reactivators in treatment of organophosphate poisoning. *European Journal of Pharmacology* [online]. 2006, **553**(1–3), 10–17. ISSN 0014-2999.

KARALLIEDDE, Lakshman, David BAKER a Timothy C. MARRS. Organophosphate-induced intermediate syndrome: aetiology and relationships with myopathy. *Toxicological Reviews*. 2006, **25**(1), 1–14. ISSN 1176-2551.

KARASOVA, Jana Zdarova, Jiri KASSA, Kamil MUSILEK, Miroslav POHANKA, Ladislav NOVOTNY a Kamil KUCA. Effect of Seven Newly Synthesized and Currently Available Oxime Cholinesterase Reactivators on Cyclosarin-Intoxicated Rats. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2009, **10**(7), 3065-3075.

KARASOVA, Jana, Daniela HNÍDKOVÁ, Miroslav POHANKA, Kamil MUSILEK, Rob CHILCOTT a Kamil KUCA. Pharmacokinetics of acetylcholinesterase reactivator K203 and consequent evaluation of low molecular weight antioxidants/markers of oxidative stress. *Journal of Applied Biomedicine* [online]. 2012, **10** (2), 71-78. ISSN 1214-021X.

KASSA, Jiri, Jana KARASOVA, Kamil MUSILEK a Kamil KUCA. An evaluation of therapeutic and reactivating effects of newly developed oximes (K156, K203) and commonly used oximes (obidoxime, trimedoxime, HI-6) in tabun-poisoned rats and mice. *Toxicology* [online]. 2008, **243**(3), 311–316. ISSN 0300-483X.

KAUR, Pushpinder, Bishan RADOTRA, Ranjana W. MINZ a K. D. GILL. Impaired mitochondrial energy metabolism and neuronal apoptotic cell death after chronic dichlorvos (OP) exposure in rat brain. *NeuroToxicology* [online]. 2007, **28**(6), 1208–1219. ISSN 0161-813X.

KLAPKOVÁ, E., R. URINOVSKÁ, R. PRŮŠA. Vliv matricových efektu při vývoji a validaci metod pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. *Klinická Biochemie a metabolismus*. (2011), **19**(40), 5-8.

KNIGHT, J. A., R. K. PIEPER a L. MCCLELLAN. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clinical Chemistry*. 1988, **34**(12), 2433–2438. ISSN 0009-9147, 1530-8561.

KOLEČKÁŘ, Vít, Daniel JUN, Luboš OPLETAL, Luděk JAHODÁŘ a Kamil KUČA. Assay of radical scavenging activity of antidotes against chemical warfare agents by DPPH test using sequential injection technique. *Journal of Applied Biomedicine*. 2007, **5**(81), 81-84.

KONIECZKA, P., A. J. ROZBICKA-WIECZOREK, E. WIĘSYK, S. SMULIKOWSKA a M. CZAUDERNA. Improved derivatization of malondialdehyde with 2-thiobarbituric acid for evaluation of oxidative stress in selected tissues of chickens. *Journal of Animal and Feed Sciences* [online]. 2014, **23**(2), 190–197. ISSN 1230-1388.

KORCHAZHKINA, Olga a Ying YANG. Methyl malondialdehyde is not suitable as an internal standard for malondialdehyde detection in urine after derivatisation with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Chromatography B* [online]. 2004, **806**(2), 295–298. ISSN 1570-0232.

KORCHAZHKINA, Olga, Christopher EXLEY a Stephen ANDREW SPENCER. Measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography of malondialdehyde in normal human urine following derivatisation with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Journal of Chromatography B* [online]. 2003, **794**(2), 353–362. ISSN 1570-0232.

KOROLAINEN, M. A. a T. PIRTTILÄ. Cerebrospinal fluid, serum and plasma protein oxidation in Alzheimer's disease. *Acta Neurologica Scandinavica* [online]. 2009, **119**(1), 32–38. ISSN 1600-0404.

KOSE, Ataman, Nurullah GUNAY, Beril KOSE, Ali R. OCAK, Ozcan EREL a Abdullah T. DEMIRYUREK. Effects of atropine and pralidoxime pretreatment on serum and cardiac oxidative stress parameters in acute dichlorvos toxicity in rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology* [online]. 2010, **97**(3), 249–255. ISSN 0048-3575.

KRYSTON, Thomas B., Anastasiya B. GEORGIEV, Polycarpos PISSIS a Alexandros G. GEORGAKILAS. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research* [online]. 2011, **711**(1–2), 193–201. ISSN 0027-5107.

KUCA, Kamil, Daniel JUN, Kamil MUSILEK, Miroslav POHANKA, Jana ZDAROVA KARASOVA a Ondrej SOUKUP. Prophylaxis and Post-exposure Treatment of Intoxications Caused by Nerve Agents and Organophosphorus Pesticides. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2013, **13**(14), 2102–2115.

KUČERA, Otto, René ENDLICHER, Tomáš ROUŠAR, Halka LOTKOVÁ, Tomáš GARNOL, Zdeněk DRAHOTA a Zuzana ČERVINKOVÁ. The Effect of tert-Butyl Hydroperoxide-Induced Oxidative Stress on Lean and Steatotic Rat Hepatocytes In Vitro. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2014, **2014**, 1-12.

LAM, Patricia M. W., Vilas MISTRY, Timothy H. MARCZYLO, Justin C. KONJE, Mark D. EVANS a Marcus S. COOKE. Rapid measurement of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine in human biological matrices using ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Free Radical Biology & Medicine* [online]. 2012, **52**(10), 2057–2063. ISSN 1873-4596.

LÄRSTAD, Monica, Göran LJUNGKVIST, Anna-Carin OLIN a Kjell TORÉN. Determination of malondialdehyde in breath condensate by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B* [online]. 2002, **766**(1), 107–114. ISSN 1570-0232.

LEE, JeongEun, Mi Sun LIM, Jae Hyeon PARK, Chang Hwan PARK a Hyun Chul KOH. Nuclear NF- κ B contributes to chlorpyrifos-induced apoptosis through p53 signaling in human neural precursor cells. *Neurotoxicology* [online]. 2014, **42**, 58–70. ISSN 1872-9711.

LEONARD, J. P. & M. M. SALPETER. Agonist-induced myopathy at the neuromuscular junction is mediated by calcium. *The Journal of Cell Biology* [online]. 1979, **82**(3), 811–819. ISSN 0021-9525, 1540-8140.

LEVINE, Rodney L. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radical Biology & Medicine*. 2002, **32**(9), 790–796. ISSN 0891-5849.

LI, Nanxin a Michael KARIN. Is NF- κ B the sensor of oxidative stress? *The FASEB Journal*. 1999, **13**(10), 1137–1143. ISSN 0892-6638, 1530-6860.

LOCKRIDGE, Oksana a Lawrence M. SCHOPFER. Review of tyrosine and lysine as new motifs for organophosphate binding to proteins that have no active site serine. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2010, **187**(1), 10th International Meeting on Cholinesterases, 344–348. ISSN 0009-2797.

LOVELL, M. A., W. D. EHMANN, M. P. MATTSON a W. R. MARKESBERY. Elevated 4-Hydroxynonenal in Ventricular Fluid in Alzheimer's Disease. *Neurobiology of Aging* [online]. 1997, **18**(5), 457–461. ISSN 0197-4580, 1558-1497.

LOVELL, Mark A. a William R. MARKESBERY. Ratio of 8-Hydroxyguanine in Intact DNA to Free 8-Hydroxyguanine Is Increased in Alzheimer Disease Ventricular Cerebrospinal Fluid. *Archives of Neurology* [online]. 2001, **58**(3), 392–396. ISSN 0003-9942.

LOVRIĆ, Jasna, Suzana BEREND, Ana LUCIĆ VRDOLJAK, Božica RADIĆ, Maja KATALINIĆ, Zrinka KOVARIK, Davor ŽELJEŽIĆ, Nevenka KOPJAR, Slavko RAST a Milan MESIĆ. A conjugate of pyridine-4-aldoxime and atropine as a potential antidote against organophosphorus compounds poisoning. *Acta Biochimica Polonica*. 2011, **58**(2), 193–198. ISSN 1734-154X.

LUKASZEWICZ-HUSSAIN, Anna. Role of oxidative stress in organophosphate insecticide toxicity – Short review. *Pesticide Biochemistry and Physiology* [online]. 2010, **98**, 145–150.

LUO, Shen a Nancy B. WEHR. Protein carbonylation: avoiding pitfalls in the 2,4-dinitrophenylhydrazine assay. *Redox Report* [online]. 2009, **14**(4), 159–166. ISSN 1351-0002.

LYKKESFELDT, Jens. Determination of Malondialdehyde as Dithiobarbituric Acid Adduct in Biological Samples by HPLC with Fluorescence Detection: Comparison with Ultraviolet-Visible Spectrophotometry. *Clinical Chemistry*. 2001, **47**(9), 1725–1727. ISSN 0009-9147, 1530-8561.

LYKKESFELDT, Jens. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* [online]. 2007, **380**(1–2), 50–58. ISSN 0009-8981.

MANGAL, Dipti, Daljit VUDATHALA, Jong-Heum PARK, Seon Hwa LEE, Trevor M. PENNING a Ian A. BLAIR. Analysis of 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in cellular DNA during oxidative stress. *Chemical Research in Toxicology* [online]. 2009, **22**(5), 788–797. ISSN 1520-5010.

MANSOUR, Sameeh A. a Abdel-Tawab H. MOSSA. Lipid peroxidation and oxidative stress in rat erythrocytes induced by chlorpyrifos and the protective effect of zinc. *Pesticide Biochemistry and Physiology* [online]. 2009, **93**(1), 34–39. ISSN 0048-3575.

MAO, Jianjun, Hongwu ZHANG, Jia LUO, Li LI, Rui ZHAO, Renen ZHANG a Guoquan LIU. New method for HPLC separation and fluorescence detection of malonaldehyde in normal human plasma. *Journal of Chromatography B* [online]. 2006, **832**(1), 103–108. ISSN 1570-0232.

MARIANI, E., M. C. POLIDORI, A. CHERUBINI a P. MECOCCHI. Oxidative stress in brain aging, neurodegenerative and vascular diseases: an overview. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2005, **827**(1), 65–75. ISSN 1570-0232.

MARMIY, N. V. a D. S. ESIPOV. Biological role of 8-oxo-2'-deoxyguanosine. *Moscow University Biological Sciences Bulletin* [online]. 2015, **70**(4), 168–172. ISSN 0096-3925, 1934-791X.

MARSILLACH, Judit, Lucio G. COSTA a Clement E. FURLONG. Protein adducts as biomarkers of exposure to organophosphorus compounds. *Toxicology* [online]. 2013, **307**, 46–54. ISSN 0300-483X.

MASSON, Patrick. Evolution of and perspectives on therapeutic approaches to nerve agent poisoning. *Toxicology Letters* [online]. 2011, **206**(1), 5–13. ISSN 1879-3169.

MATEOS, Raquel, Luis GOYA a Laura BRAVO. Determination of malondialdehyde by liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazone derivative: A marker for oxidative stress in cell cultures of human hepatoma HepG2. *Journal of Chromatography B* [online]. 2004, **805**(1), 33–39. ISSN 1570-0232.

MCKHANN, G., D. DRACHMAN, M. FOLSTEIN, R. KATZMAN, D. PRICE a E. M. STADLAN. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology*. 1984, **34**(7), 939–944. ISSN 0028-3878.

MILATOVIC, Dejan, Ramesh C. GUPTA a Michael ASCHNER. Anticholinesterase toxicity and oxidative stress. *The Scientific World Journal* [online]. 2006, **6**, 295–310. ISSN 1537-744X.

MONDRAGON-RODRIGUEZ, Siddhartha, Emilie TRILLAUD-DOPPIA, Anthony DUDILOT, Catherine BOURGEOIS, Michel LAUZON, Nicole LECLERC a Jannic BOEHM. Interaction of endogenous tau with synaptic proteins is regulated by NMDA-receptor dependent tau phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2012, jbc.M112.401240. ISSN 0021-9258, 1083-351X.

MONTINE T. J., MARKESBERY W. R., MORROW J. D. a ROBERTS L. J. Cerebrospinal fluid F2-isoprostane levels are increased in Alzheimer's disease. *Annals of Neurology* [online]. 2004, **44**(3), 410–413. ISSN 0364-5134.

MOORE, Pamela D., Clement G. YEDJOU a Paul B. TCHOUNWOU. Malathion-induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Environmental Toxicology* [online]. 2010, **25**(3), 221–226. ISSN 1522-7278.

MUCKOVA, L., N. VANOVA, J. MISIK, D. HERMAN, J. PEJCHAL a D. JUN. Oxidative stress induced by oxime reactivators of acetylcholinesterase in vitro. *Toxicology in Vitro*. 2019, **56**, 110-117 [cit. 2019-02-19]. ISSN 08872333.

MUCKOVA, Lubica, Jaroslav PEJCHAL, Petr JOST, Nela VANOVA, David HERMAN a Daniel JUN. Cytotoxicity of acetylcholinesterase reactivators evaluated in

vitro and its relation to their structure. *Drug and Chemical Toxicology* [online]. 2018, 1–5. ISSN 1525-6014.

MUSAVI, S. a P. KAKKAR. Diazepam induced early oxidative changes at the subcellular level in rat brain. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 1998, **178**(1–2), 41–46. ISSN 0300-8177.

MYHRER, Trond, Siri ENGER a Pål AAS. Anticonvulsant efficacy of drugs with cholinergic and/or glutamatergic antagonism microinfused into area tempestas of rats exposed to soman. *Neurochemical Research* [online]. 2008, **33**(2), 348–354. ISSN 0364-3190.

NIKI, Etsuo. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [online]. 2014, **1840**(2), Current methods to study reactive oxygen species - pros and cons, 809–817. ISSN 0304-4165.

NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. Moderní HPLC separace v teorii a praxi. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.

NURULAIN, Syed M., Peter SZEGI, Kornèlia TEKES a Syed N. H. NAQVI. Antioxidants in organophosphorus compounds poisoning. *Arhiv Za Higijenu Rada I Toksikologiju* [online]. 2013, **64**(1), 169–177. ISSN 1848-6312.

OJHA, Anupama, Santosh K. YADUVANSHI a Nalini SRIVASTAVA. Effect of combined exposure of commonly used organophosphate pesticides on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat tissues. *Pesticide Biochemistry and Physiology* [online]. 2011, **99**(2), 148–156. ISSN 0048-3575.

OLIVE, Peggy L. a Judit P. BANÁTH. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols* [online]. 2006, **1**(1), 23–29. ISSN 1750-2799.

OTT, Martin, Vladimir GOGVADZE, Sten ORRENIUS a Boris ZHIVOTOVSKY. Mitochondria, oxidative stress and cell death. Apoptosis: *An International Journal on Programmed Cell Death* [online]. 2007, **12**(5), 913–922. ISSN 1360-8185.

PARIHAR, Vipin K., Bharathi HATTIANGADY, Bing SHUAI a Ashok K. SHETTY. Mood and memory deficits in a model of Gulf War illness are linked with reduced neurogenesis, partial neuron loss, and mild inflammation in the hippocampus. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology* [online]. 2013, **38**(12), 2348–2362. ISSN 1740-634X.

PARK, Han-A., Savita KHANNA, Cameron RINK, Surya GNYAWALI, Sashwati ROY a Chandan K. SEN. Glutathione disulfide induces neural cell death via a 12-lipoxygenase pathway. *Cell death and differentiation* [online]. 2009, **16**(8), 1167.

PARSONS, Chris G., Wojciech DANYSZ, Andrzej DEKUNDY a Irena PULTE. Memantine and Cholinesterase Inhibitors: Complementary Mechanisms in the Treatment of Alzheimer's Disease. *Neurotoxicity Research* [online]. 2013, **24**(3), 358–369. ISSN 1029-8428.

PATEL, Manisha. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress: cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radical Biology & Medicine* [online]. 2004, **37**(12), 1951–1962. ISSN 0891-5849.

PATSOUKIS, Nikolaos a Christos D. GEORGIU. Determination of the thiol redox state of organisms: new oxidative stress indicators. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2004, **378**(7), 1783–1792. ISSN 1618-2642.

PAZDERNIK, T. L., M. R. EMERSON, R. CROSS, S. R. NELSON a F. E. SAMSON. Soman-induced seizures: limbic activity, oxidative stress and neuroprotective proteins. *Journal of Applied Toxicology* [online]. 2001, **21**(S1), S87–S94. ISSN 1099-1263.

PEARSON, Jennifer N. a Manisha PATEL. The role of oxidative stress in organophosphate and nerve agent toxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2016, **1378**(1), 17–24. ISSN 1749-6632.

PEJCHAL, Jaroslav, Jan OSTERREICHER, Jiri KASSA, Ales TICHY, Stanislav MICUDA, Zuzana SINKOROVA a Lenka ZARYBNICKA. Soman poisoning alters p38 MAPK pathway in rat cerebellar Purkinje cells. *Journal of applied toxicology: JAT* [online]. 2009, **29**(4), 338–345. ISSN 1099-1263.

PEJCHAL, Jaroslav, Jan OSTERREICHER, Kamil KUCA, Daniel JUN, Jiri BAJGAR a Jiri KASSA. The Influence of Acetylcholinesterase Reactivators on Selected Hepatic Functions in Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* [online]. 2008, **103**(2), 119–123. ISSN 1742-7843.

PENG, Tsung-I. a Mei-Jie JOU. Oxidative stress caused by mitochondrial calcium overload. *Annals of the New York Academy of Sciences* [online]. 2010, **1201**, 183–188. ISSN 1749-6632.

PETER, John Victor, Thomas Isiah SUDARSAN a John L. MORAN. Clinical features of organophosphate poisoning: A review of different classification systems and approaches. *Indian Journal of Critical Care Medicine: Peer-reviewed, Official Publication of Indian Society of Critical Care Medicine* [online]. 2014, **18**(11), 735–745. ISSN 0972-5229.

PIETÁ DIAS, C., M. N. MARTINS DE LIMA, J. PRESTI-TORRES, A. DORNELLES, V. A. GARCIA, F. SICILIANI SCALCO, M. REWSAAT GUIMARÃES, L. CONSTANTINO, P. BUDNI, Felipe DAL-PIZZOL a N. SCHRÖDER. Memantine reduces oxidative damage and enhances long-term recognition memory in aged rats. *Neuroscience* [online]. 2007, **146**(4), 1719–1725. ISSN 0306-4522.

PILZ, Jürgen, Ingolf MEINEKE a Christoph H GLEITER. Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 2000, **742**(2), 315–325. ISSN 0378-4347.

POHANKA, Miroslav, Jakub SOBOTKA, Hana SVOBODOVA a Rudolf STETINA. Investigation of oxidative stress in blood, brain, kidney, and liver after oxime antidote HI-6 application in a mouse experimental model. *Drug and Chemical Toxicology* [online]. 2011c, **34**(3), 255–260. ISSN 0148-0545.

POHANKA, Miroslav, Jana Zdarova KARASOVA, Kamil MUSILEK, Kamil KUCA, Young-Sik JUNG a Jiri KASSA. Changes of rat plasma total low molecular weight antioxidant level after tabun exposure and consequent treatment by

acetylcholinesterase reactivators. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* [online]. 2011a, **26**(1), 93–97. ISSN 1475-6366.

POHANKA, Miroslav, Jana Zdarova KARASOVA, Kamil MUSILEK, Kamil KUCA a Jiri KASSA. Effect of five acetylcholinesterase reactivators on tabun-intoxicated rats: induction of oxidative stress versus reactivation efficacy. *Journal of applied toxicology: JAT* [online]. 2009, **29**(6), 483–488. ISSN 1099-1263.

POHANKA, Miroslav, Ladislav NOVOTNY, Jana ZDAROVA-KARASOVA, Hana BANDOUCHOVA, Filip ZEMEK, Martina HRABINOVA, Jan MISIK, Kamil KUCA, Jiri BAJGAR, Ondrej ZITKA, Natalia CERNEI, Rene KIZEK a Jiri PIKULA. Asoxime (HI-6) impact on dogs after one and tenfold therapeutic doses: Assessment of adverse effects, distribution, and oxidative stress. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2011b, **32**(1), 75–81. ISSN 1382-6689.

POHANKA, Miroslav, Ladislav NOVOTNY, Josef FUSEK a Jiri PIKULA. HI-6 and obidoxime implication in oxidative stress, antioxidants level and apoptosis. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology* [online]. 2011d, **5**(8), 1145–1149. ISSN 1996-0816.

POPE, Carey, Subramanya KARANTH a Jing LIU. Pharmacology and toxicology of cholinesterase inhibitors: uses and misuses of a common mechanism of action. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2005, **19**(3), 433–446. ISSN 1382-6689.

POSSAMAI, F. P., J. J. FORTUNATO, G. FEIER, F. R. AGOSTINHO, J. QUEVEDO, D. WILHELM FILHO a F. DAL-PIZZOL. Oxidative stress after acute and sub-chronic malathion intoxication in Wistar rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology* [online]. 2007, **23**(2), 198–204. ISSN 1382-6689.

PRATICÒ, Domenico, Christopher M. CLARK, Feyan LIUN, Virginia Y.-M. LEE a John Q. TROJANOWSKI. Increase of Brain Oxidative Stress in Mild Cognitive Impairment: A Possible Predictor of Alzheimer Disease. *Archives of Neurology* [online]. 2002, **59**(6), 972–976. ISSN 0003-9942.

PRATICÒ, Domenico, Christopher M. CLARK, Virginia M.-Y. LEE, John Q. TROJANOWSKI, Joshua ROKACH a Garret A. FITZGERALD. Increased 8,12-iso-iPF₂ α -VI in Alzheimer's disease: Correlation of a noninvasive index of lipid peroxidation with disease severity. *Annals of Neurology* [online]. 2000, **48**(5), 809–812. ISSN 1531-8249.

PUNTEL, Gustavo Orione, Nelson Rodrigues DE CARVALHO, Priscila GUBERT, Aline Schwertner PALMA, Cristiane Lenz DALLA CORTE, Daiana Silva AVILA, Maria Ester PEREIRA, Vanessa Santana CARRATU, Leandro BRESOLIN, João Batista Teixeira DA ROCHA a Félix A. Antunes SOARES. Butane-2,3-dionethiosemicarbazone: an oxime with antioxidant properties. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2009, **177**(2), 153–160. ISSN 1872-7786.

PUNTEL, Gustavo Orione, Priscila GUBERT, Gisele Louro PERES, Leandro BRESOLIN, João Batista Teixeira ROCHA, Maria Ester PEREIRA, Vanessa Santana CARRATU a Félix A. Antunes SOARES. Antioxidant properties of oxime 3-(phenylhydrazono) butan-2-one. *Archives of Toxicology* [online]. 2008, **82**(10), 755–762. ISSN 0340-5761, 1432-0738.

RADI, Rafael. Protein Tyrosine Nitration: Biochemical Mechanisms and Structural Basis of its Functional Effects. *Accounts of chemical research* [online]. 2013, **46**(2), 550–559. ISSN 0001-4842.

RAJASEKARAN, Karthik. Seizure-induced oxidative stress in rat brain regions: blockade by nNOS inhibition. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* [online]. 2005, **80**(2), 263–272. ISSN 0091-3057.

RAMARAO, G. a B. K. BHATTACHARYA. Multiple signal transduction pathways alterations during nerve agent toxicity. *Toxicology Letters* [online]. 2012, **208**(1), 16–22. ISSN 0378-4274.

RAY, D. E. a P. G. RICHARDS. The potential for toxic effects of chronic, low-dose exposure to organophosphates. *Toxicology Letters*. 2001, **120**(1–3), 343–351. ISSN 0378-4274.

RAY, Paul D., Bo-Wen HUANG a Yoshiaki TSUJI. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signaling* [online]. 2012, **24**(5), 981–990. ISSN 0898-6568.

REDDY, Sandesh D. a Doodipala Samba REDDY. Midazolam as an anticonvulsant antidote for organophosphate intoxication. A pharmacotherapeutic appraisal. *Epilepsia* [online]. 2015, **56**(6), 813–821. ISSN 1528-1167.

REPETTO, Marisa, Jimena SEMPRINE a Alberto BOVERIS. Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination [online]. 2012 [vid. 2017-11-12].

RESSNER, P., J. HORT, I. REKTOROVÁ, A. BARTOŠ, R. RUSINA. V. LÍNEK, K. SHEARDOVÁ. Doporučené postupy pro diagnostiku Alzheimerovy nemoci a dalších onemocnění spojených s demencí. *Česká a slovenská neurologie a neurochirurgie* [online]. 2008, **71**(104), 494–501.

RIENER, Christian K., Gerald KADA a Hermann J. GRUBER. Quick measurement of protein sulfhydryls with Ellman's reagent and with 4,4'-dithiodipyridine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2002, **373**(4–5), 266–276. ISSN 1618-2642.

RYBERG, Henrik a Kenneth CAIDAHL. Chromatographic and mass spectrometric methods for quantitative determination of 3-nitrotyrosine in biological samples and their application to human samples. *Journal of Chromatography B* [online]. 2007, **851**(1), Analysis of the L-Arginine/NO Pathway, 160–171. ISSN 1570-0232.

RYBERG, Henrik, Ann-Sofi SÖDERLING, Pia DAVIDSSON, Kaj BLENNOW, Kenneth CAIDAHL a Lennart I. PERSSON. Cerebrospinal fluid levels of free 3-nitrotyrosine are not elevated in the majority of patients with amyotrophic lateral sclerosis or Alzheimer's disease. *Neurochemistry International* [online]. 2004, **45**(1), 57–62. ISSN 0197-0186.

SARNOWSKA, Anna, Małgorzata BERESEWICZ, Barbara ZABŁOCKA a Krystyna DOMAŃSKA-JANIK. Diazepam neuroprotection in excitotoxic and oxidative stress involves a mitochondrial mechanism additional to the GABAAR and hypothermic

effects. *Neurochemistry International* [online]. 2009, **55**(1–3), 164–173. ISSN 1872-9754.

SHAIKH Mutmaz-Ali. Mortality in patients presenting with organophosphorus poisoning at Liaquat University of Medical and Health Sciences. *Pakistan Journal of Medical Sciences* [online]. 2011, **27**(5), 1022-1024.

SHARMA, Vishal, Ramandeep KAUR, Archana BHATNAGAR a Jagdeep KAUR. Low-pH-induced apoptosis: role of endoplasmic reticulum stress-induced calcium permeability and mitochondria-dependent signaling. *Cell Stress & Chaperones* [online]. 2015, **20**(3), 431–440. ISSN 1355-8145.

SIM, Ah Siew, Chris SALONIKAS, Daya NAIDOO a David Emil Leon WILCKEN. Improved method for plasma malondialdehyde measurement by high-performance liquid chromatography using methyl malondialdehyde as an internal standard. *Journal of Chromatography B* [online]. 2003, **785**(2), 337–344. ISSN 1570-0232.

SONG, M. S., G. RAUW, G. B. BAKER a S. KAR. Memantine protects rat cortical cultured neurons against β -amyloid-induced toxicity by attenuating tau phosphorylation. *European Journal of Neuroscience* [online]. 2008, **28**(10), 1989–2002. ISSN 1460-9568.

SUZUKI, Yuichiro J., Marina CARINI a D. Allan BUTTERFIELD. Protein Carbonylation. *Antioxidants & Redox Signaling* [online]. 2010, **12**(3), 323–325. ISSN 1523-0864.

SYSLOVÁ, Kamila, Petr KACER, Marek KUZMA, Vera NAJMANOVÁ, Zdenka FENCLOVÁ, Stepánka VLCKOVÁ, Jindriska LEBEDOVÁ a Daniela PELCLOVÁ. Rapid and easy method for monitoring oxidative stress markers in body fluids of patients with asbestos or silica-induced lung diseases. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2009, **877**(24), 2477–2486. ISSN 1873-376X.

TAN, Adeline L. Y., Josephine M. FORBES a Mark E. COOPER. AGE, RAGE, and ROS in diabetic nephropathy. *Seminars in Nephrology* [online]. 2007, **27**(2), 130–143. ISSN 0270-9295.

THANNICKAL, Victor J. a Barry L. FANBURG. Reactive oxygen species in cell signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* [online]. 2000, **279**(6), L1005–L1028. ISSN 1040-0605.

THIERMANN, Horst, Dirk STEINRITZ, Franz WOREK, Maria RADTKE, Peter EYER, Florian EYER, Norbert FELGENHAUER a Thomas ZILKER. Atropine maintenance dosage in patients with severe organophosphate pesticide poisoning. *Toxicology Letters* [online]. 2011, **206**(1), 77–83. ISSN 1879-3169.

THIERMANN, Horst, Franz WOREK a Kai KEHE. Limitations and challenges in treatment of acute chemical warfare agent poisoning. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2013, **206**(3), 435–443. ISSN 1872-7786.

TOHGI, H., T. ABE, K. YAMAZAKI, T. MURATA, E. ISHIZAKI a C. ISOBE. Alterations of 3-nitrotyrosine concentration in the cerebrospinal fluid during aging and in patients with Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*. 1999, **269**(1), 52–54. ISSN 0304-3940.

TSIKAS, Dimitrios, Anja MITSCHKE a Frank-Mathias GUTZKI. Measurement of 3-nitro-tyrosine in human plasma and urine by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* [online]. 2012, **828**, 255–270. ISSN 1940-6029.

TURRENS JULIO F. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *The Journal of Physiology* [online]. 2004, **552**(2), 335–344. ISSN 0022-3751.

UCHIYAMA, Shigehisa, Masanori ANDO a Shohei AOYAGI. Isomerization of aldehyde-2,4-dinitrophenylhydrazone derivatives and validation of high-performance liquid chromatographic analysis. *Journal of Chromatography. A*. 2003, **996**(1–2), 95–102. ISSN 0021-9673.

UCHIYAMA, Shigehisa, Yohei INABA a Naoki KUNUGITA. Derivatization of carbonyl compounds with 2,4-dinitrophenylhydrazine and their subsequent determination by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* [online]. 2011, **879**(17–18), 1282–1289. ISSN 1873-376X.

VALAVANIDIS, Athanasios, Thomais VLACHOGIANNI a Constantinos FIOTAKIS. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis. *Journal of Environmental Science and Health. Part C, Environmental Carcinogenesis & Ecotoxicology Reviews* [online]. 2009, **27**(2), 120–139. ISSN 1532-4095.

VALE, J. A. Toxicokinetic and toxicodynamic aspects of organophosphorus (OP) insecticide poisoning. *Toxicology Letters*. 1998, **102–103**, 649–652. ISSN 0378-4274.

VALKO, M., C. J. RHODES, J. MONCOL, M. IZAKOVIC a M. MAZUR. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2006, **160**(1), 1–40. ISSN 0009-2797.

VALKO, Marian, Dieter LEIBFRITZ, Jan MONCOL, Mark T. D. CRONIN, Milan MAZUR a Joshua TELSER. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* [online]. 2007, **39**(1), 44–84. ISSN 1357-2725.

VANOVA, Nela, Jaroslav PEJCHAL, David HERMAN, Alzbeta DLABKOVA a Daniel JUN. Oxidative stress in organophosphate poisoning: role of standard antidotal therapy. *Journal of Applied Toxicology* [online]. 2018a, **38**(8), 1058-1070. ISSN 0260437X.

VANOVA, Nela, Lubica MUCKOVA, Monika SCHMIDT, David HERMAN, Alzbeta DLABKOVA, Jaroslav PEJCHAL a Daniel JUN. Simultaneous determination of malondialdehyde and 3-nitrotyrosine in cultured human hepatoma cells by liquid chromatography-mass spectrometry. *Biomedical chromatography: BMC* [online]. 2018b, e4349. ISSN 1099-0801.

VERMA, Suresh Kumar, Geetu RAHEJA a Kiran Dip GILL. Role of muscarinic signal transduction and CREB phosphorylation in dichlorvos-induced memory deficits in rats: An acetylcholine independent mechanism. *Toxicology* [online]. 2009, **256**(3), 175–182. ISSN 0300-483X.

WALKER, Paul M. Ischemia/Reperfusion Injury in Skeletal Muscle. *Annals of Vascular Surgery* [online]. 1991, **5**(4), 399–402. ISSN 0890-5096, 1615-5947.

WANG, Xinkuna Elias K. MICHAELIS. Selective Neuronal Vulnerability to Oxidative Stress in the Brain. *Frontiers in Aging Neuroscience* [online]. 2010, **2**(12). ISSN 1663-4365.

WANG, Zhi-Cong, Jie ZHAO a Shao LI. Dysregulation of synaptic and extrasynaptic N-methyl-D-aspartate receptors induced by amyloid- β . *Neuroscience Bulletin* [online]. 2013, **29**(6), 752–760. ISSN 1995-8218.

WANI, WillayatYousuf, Satish GUDUP, Aditya SUNKARIA, Amanjit BAL, Parvinder Pal SINGH, Ramesh J. L. KANDIMALLA, Deep Raj SHARMA a Kiran Dip GILL. Protective efficacy of mitochondrial targeted antioxidant MitoQ against dichlorvos induced oxidative stress and cell death in rat brain. *Neuropharmacology* [online]. 2011, **61**(8), 1193–1201. ISSN 0028-3908.

WEISSMAN, Ben Avi a Lily RAVEH. Multifunctional drugs as novel antidotes for organophosphates' poisoning. *Toxicology* [online]. 2011, **290**(2–3), 149–155. ISSN 1879-3185.

WINNIK, Witold M. a Kirk T. KITCHIN. Measurement of oxidative stress parameters using liquid chromatography-tandem mass spectroscopy (LC-MS/MS). *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2008, **233**(1), 100–106. ISSN 1096-0333.

WINTERBOURN, Christine C. a I. Hendrikje BUSS. Protein carbonyl measurement by enzyme-linked immunosorbent assay. *Methods in Enzymology* [online]. B.m.: Academic Press, 1999, Oxidants and Antioxidants Part B, s. 106–111.

WINTHER, Jakob R. a Colin THORPE. Quantification of Thiols and Disulfides. *Biochimica et biophysica acta* [online]. 2014, **1840**(2). ISSN 0006-3002.

WOREK, Franz a Horst THIERMANN. The value of novel oximes for treatment of poisoning by organophosphorus compounds. *Pharmacology & Therapeutics* [online]. 2013, **139**(2), 249–259. ISSN 1879-016X.

WOREK, Franz, Horst THIERMANN a Timo WILLE. Oximes in organophosphate poisoning: 60 years of hope and despair. *Chemico-Biological Interactions* [online]. 2016, **259**(Pt B), 93–98. ISSN 1872-7786.

WRIGHT, S. Kirk a Ronald E. VIOLA. Evaluation of Methods for the Quantitation of Cysteines in Proteins. *Analytical Biochemistry* [online]. 1998, **265**(1), 8–14. ISSN 0003-2697.

YANG, Chen-Chang a Jou-Fang DENG. Intermediate syndrome following organophosphate insecticide poisoning. *Journal of the Chinese Medical Association: JCMSA* [online]. 2007, **70**(11), 467–472. ISSN 1726-4901.

YU, Fu, Ziren WANG, Bao JU, Yongqiang WANG, Jing WANG a Decheng BAI. Apoptotic effect of organophosphorus insecticide chlorpyrifos on mouse retina in vivo via oxidative stress and protection of combination of vitamins C and E. *Experimental and Toxicologic Pathology: Official Journal of the Gesellschaft Fur Toxikologische Pathologie* [online]. 2008, **59**(6), 415–423. ISSN 0940-2993.

ZAJA-MILATOVIĆ, Snjezana, Ramesh C. GUPTA, Michael ASCHNER a Dejan MILATOVIĆ. Protection of DFP-induced oxidative damage and neurodegeneration by antioxidants and NMDA receptor antagonist. *Toxicology and Applied Pharmacology* [online]. 2009, **240**(2), Toxicants and Neurodegenerative Diseases Gupta Special Issue, 124–131. ISSN 0041-008X.

ŽELJEŽIĆ, Davor, Marin MLADINIĆ, Suzana ŽUNEC, Ana LUCIĆ VRDOLJAK, Vilena KAŠUBA, Blanka TARIBA, Tanja ŽIVKOVIĆ, Ana Marija MARJANOVIĆ, Ivan PAVIČIĆ, Mirta MILIĆ, Ružica ROZGAJ a Nevenka KOPJAR. Cytotoxic, genotoxic and biochemical markers of insecticide toxicity evaluated in human peripheral blood lymphocytes and an HepG2 cell line. *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* [online]. 2016, **96**, 90–106. ISSN 1873-6351.

ZHANG, Yan, Peiyao LI, Jianbo FENG a Minghua WU. Dysfunction of NMDA receptors in Alzheimer's disease. *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian*

Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology [online]. 2016, **37**(7), 1039–1047. ISSN 1590-3478.

ZHAO, Yan a Baolu ZHAO. Oxidative Stress and the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* [online]. 2013, 2013, 1-10.

ŽUNEC, Suzana, Nevenka KOPJAR, Davor ŽELJEŽIĆ, Kamil KUČA, Kamil MUSILEK a Ana Lucić VRDOLJAK. In Vivo Evaluation of Cholinesterase Activity, Oxidative Stress Markers, Cyto- and Genotoxicity of K048 Oxime – a Promising Antidote against Organophosphate Poisoning. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* [online]. 2014, **114**(4), 344–351. ISSN 1742-7843.