

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA TITAN

DIPLOMSKA NALOGA

Univerzitetni študij farmacije

Ljubljana, 2011

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANA TITAN

**DOLOČANJE MALONDIALDEHIDA V PLAZMI KONJ Z  
DERIVATIZACIJSKIMI METODAMI IN TEKOČINSKO  
KROMATOGRFIJO**

**DETERMINATION OF MALONDIALDEHYDE IN HORSE  
PLASMA WITH DERIVATISATION METHODS AND  
LIQUID CHROMATOGRAPHY**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, pod mentorstvom doc. dr. Tomaža Vovka.

### **Zahvala**

Za strokovne nasvete in pomoč pri izvedbi diplomskega dela se najlepše zahvaljujem mentorju doc. dr. Tomažu Vovku. Zahvaljujem se tudi doc. dr. Robertu Roškarju, Mariji Bošković, mag. farm. in vsem zaposlenim na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, ki so mi pomagali pri laboratorijskem delu.

Iskreno se zahvaljujem moji družini za podporo tekom celotnega šolanja in fantu Blažu za vse spodbudne besede.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod vodstvom mentorja doc. dr. Tomaža Vovka.

Ana Titan

Ljubljana, junij 2011

Predsednik diplomske komisije:izr. prof. dr. Aleš Obreza, mag. farm.

Član diplomske komisije:izr. prof. dr. Darko Černe, mag. farm.

# VSEBINA

POVZETEK .....	I
ABSTRACT .....	II
SEZNAM OKRAJŠAV .....	III
1 UVOD.....	1
1.1 OKSIDATIVNI STRES .....	1
1.2 LIPIDNA PEROKSIDACIJA .....	2
1.2.1 Osnovne značilnosti.....	2
1.2.2 Mehanizem .....	3
1.2.3 Produkti LP.....	6
1.2.4 Posledice LP .....	7
1.2.5 Biološki kazalci LP.....	7
1.2.6 Vrednotenje LP.....	9
1.3 METODE ZA DOLOČANJE MALONDIALDEHIDA (MDA) .....	11
1.3.1 TBA metoda .....	12
1.3.2 DNPH metoda .....	13
2 NAMEN DELA .....	15
3 MATERIALI IN METODE .....	16
3.1 MATERIALI .....	16
3.1.1 Biološki material .....	16
3.1.2 Standardi.....	16
3.1.3 Reagenti in topila.....	17
3.1.4 Oprema .....	18
3.2 METODE.....	19
3.2.1 Pogoji analize MDA s HPLC z DNPH metodo.....	19
3.2.2 Pogoji analize MDA s HPLC s TBA metodo (Chromsystems test).....	22
3.2.3 Optimizacija DNPH metode.....	23
3.2.4 Validacija DNPH metode za določanje celokupnega MDA .....	26
3.2.5 Validacija TBA metode .....	29
3.2.6 Meritve MDA v plazmi konj .....	30
4 REZULTATI .....	33
4.1 OPTIMIZACIJA DNPH METODE .....	33

4.1.1 Zamenjava steklenih epruвет z 1.5 ml plastičnimi epruветkami .....	33
4.1.2 Volumen mobilne faze za rekonstitucijo .....	33
4.1.3 Volumen plazme .....	34
4.1.4 Število ekstrakcij .....	34
4.2 VALIDACIJA DNPH METODE ZA DOLOČANJE CELOKUPNEGA MDA .....	35
4.2.1 Izkoristki ekstrakcije .....	35
4.2.2 Linearnost .....	36
4.2.3 Ponovljivost metode .....	37
4.2.4 Točnost .....	38
4.2.5 Območje linearnosti .....	38
4.2.6 Meja kvantifikacije (LOQ) .....	38
4.2.7 Stabilnost .....	39
4.3 VALIDACIJA TBA METODE .....	40
4.3.1 Izkoristki ekstrakcije .....	40
4.3.2 Linearnost .....	40
4.3.3 Območje linearnosti .....	42
4.3.4 Meja kvantifikacije (LOQ) .....	42
4.3.5 Stabilnost .....	42
4.4 MERITVE MDA V PLAZMI KONJ .....	43
4.4.1 Določitev celokupne oblike MDA s HPLC z DNPH metodo .....	43
4.4.2 Določitev MDA s TBA metodo .....	44
4.5.4 Določitev proste oblike MDA z LC-MS/MS z DNPH metodo .....	45
5 RAZPRAVA .....	47
5.1 Optimizacija DNPH metode .....	47
5.2 Validacija DNPH metode za določanje celokupnega MDA .....	48
5.3 Validacija TBA metode .....	50
5.4 Merjenje MDA v plazmi konj .....	51
6 SKLEP .....	53
LITERATURA .....	54

## POVZETEK

Malondialdehid (MDA) je eden izmed najpogosteje uporabljenih kazalcev lipidne peroksidacije (LP) v bioloških vzorcih. V diplomski nalogi smo z različnimi metodami določali MDA v plazmi konj. Uporabili smo derivatizacijo z 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH metoda) in 2-tiobarbiturno kislino (TBA metoda). Pri prvi metodi smo derivate detektirali z UV in masnim detektorjem, pri drugi pa s fluorescenčnim detektorjem.

Najprej smo prilagodili DNPH HPLC-UV metodo za določanje celokupnega MDA, ki je bila predhodno razvita na Fakulteti za farmacijo. Nato smo metodo poskušali optimizirati tako, da bi z njo lahko določili tudi prosto obliko MDA v konjski plazmi. Metoda je bila premalo občutljiva. Prosto obliko smo po derivatizaciji z DNPH določili z uporabo LC-MS/MS sistema.

Sledila je validacija metod v skladu z FDA smernicami za bioanalizne metode.

DNPH HPLC-UV metoda za določanje celokupnega MDA je bila linearna v območju od 0.16 do 10  $\mu\text{mol/l}$  ( $r^2 > 0.999$ ). V tem območju je bila tudi ponovljiva (koeficient variacije  $< 15\%$ ) in točna (odstop QC vzorcev  $\pm 15\%$ , pri LOQ  $\pm 20\%$ ). Meja kvantifikacije določena iz umeritvenih premic v dnevih analize vzorcev konj je bila 0.67  $\mu\text{mol/l}$  in je bila glede na določene koncentracije v plazmi konj ustrezno nizka. Izkoristek ekstrakcije je, pri dodatkih približno 10, 50 in 100% koncentracije endogenega MDA, znašal 96.0, 91.3 oz. 83.5%.

TBA metoda je bila linearna v območju med 0.078 in 10  $\mu\text{mol/l}$  ( $r^2 > 0.999$ ), meja kvantifikacije je znašala 0.16  $\mu\text{mol/l}$  in je bila glede na določene koncentracije v plazmi konj prav tako ustrezno nizka. Izkoristek ekstrakcije je, pri dodatkih približno 10, 50 in 100% koncentracije endogenega MDA, znašal 73.8, 75.0 oz. 73.3%.

Območje linearnosti za DNPH LC-MS/MS metodo za določanje prostega MDA smo določili med 0.0195 in 0.625  $\mu\text{mol/l}$ , LOQ pa je znašala 0.0195  $\mu\text{mol/l}$ .

Povprečna koncentracija celokupnega MDA, ki smo ga določali z DNPH HPLC-UV metodo, je bila pred ter 0, 24 in 48 ur po treningu 1.14, 1.63, 1.86 ter 2.30  $\mu\text{mol/l}$  in je podobno kot v drugih raziskavah porastla, iz česar smo zaključili, da je DNPH HPLC-UV metoda za določanje celokupnega MDA primerna za spremljanje oksidativnega stresa v plazmi konj po treningu. Povprečna koncentracija MDA določenega s TBA metodo po treningu ni porastla (0.189  $\rightarrow$  0.174  $\mu\text{mol/l}$ ). Tudi povprečna koncentracija prostega MDA, ki smo jo določali z DNPH LC-MS/MS metodo, po treningu ni porastla (0.0251  $\rightarrow$  0.0150  $\mu\text{mol/l}$ ).

## ABSTRACT

Malondialdehyde (MDA) is one of the most frequently used biomarkers of lipid peroxidation (LP). We measured MDA in horse plasma with different methods. MDA was derivatized with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH method) and 2-thiobarbituric acid (TBA method). Products were detected using UV and mass detector (DNPH method) and fluorescence detector (TBA method).

We used DNPH HPLC-UV method, which was previously developed at the Faculty of Pharmacy, University of Ljubljana, and modified it in terms of sensitivity to obtain method which would allow quantification of free MDA in horse plasma. Developed UV method was not sensitive enough. Free MDA after DNPH derivatization was determined using LC-MS/MS detection.

The methods were validated according to FDA guidelines for bioanalytical methods validation.

DNPH HPLC-UV method for total MDA determination was linear in the range 0.16-10  $\mu\text{mol/l}$  ( $r^2 > 0.999$ ). In this range it was also precise (coefficient of variation  $< 15\%$ ) and accurate (deviation of QC samples  $\pm 15\%$ , at LOQ  $\pm 20\%$ ). LOQ determined from the calibration curves used for horse samples analysis was 0.67  $\mu\text{mol/l}$ , which was low enough to determine MDA in horse plasma. Analytical recovery was 96.0, 91.3 and 83.5% when adding around 10, 50 and 100% of endogenous MDA to plasma samples.

TBA method was linear in the range 0.078-10  $\mu\text{mol/l}$  ( $r^2 > 0.999$ ), LOQ (0.16  $\mu\text{mol/l}$ ) was low enough to determine MDA in horse plasma. Analytical recovery was 73.8, 75.0 and 73.3% when adding around 10, 50 and 100% of endogenous MDA to plasma samples.

Linear range for DNPH LC-MS/MS method for free MDA determination was determined between 0.0195 and 0.625  $\mu\text{mol/l}$ . LOQ was 0.0195  $\mu\text{mol/l}$ .

Mean total MDA concentration determined with DNPH HPLC-UV method was before and 0, 24 and 48 hours after exercise 1.14, 1.63, 1.86 and 2.30  $\mu\text{mol/l}$ . Mean total MDA concentration after exercise increased, similar to other studies. We concluded that DNPH HPLC-UV method for total MDA determination can be used for quantification of oxidative stress in horse plasma as a result of physical exercise. Mean MDA concentration determined with TBA method did not increase after exercise (0.189  $\rightarrow$  0.174  $\mu\text{mol/l}$ ). Also mean free MDA concentration determined with DNPH LC-MS/MS method did not increase after exercise (0.0251  $\rightarrow$  0.0150  $\mu\text{mol/l}$ ).

**SEZNAM OKRAJŠAV**

c	koncentracija
CV	koeficient variacije
DNPB	2,4-dinitrofenilhidrazin
FDA	ameriška Agencija za hrano in zdravila (Food and drug administration)
GC	plinska kromatografija (ang. <i>gas chromatography</i> )
GC-MS	plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo
HNE	4-hidroksi-2-nonenal
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (ang. <i>high-performance liquid chromatography</i> )
HPLC-MS	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti sklopljena z masno spektrometrijo
IzoP	izoprostani
LC	tekočinska kromatografija (ang. <i>liquid chromatography</i> )
LC-MS/MS	tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo (ang. <i>liquid chromatography-tandem mass spectrometry</i> )
LOQ	meja kvantifikacije (ang. <i>limit of quantification</i> )
LP	lipidna peroksidacija
MDA	malondialdehid
MF	mobilna faza
MK	maščobne kisline
MS	masna spektrometrija
MS/MS	tandemska masna spektrometrija (ang. <i>tandem mass spectrometry</i> )
NRP	neradikalni produkt
OR	osnovna raztopina
PD-MDA	površina kromatografskega vrha derivatiziranega malondialdehida
PNMK	polinenasičene maščobne kisline
QC vzorci	vzorci za kontrolo analizne metode
$r^2$	determinacijski koeficient
RNS	reaktivne dušikove zvrsti
ROS	reaktivne kisikove zvrsti



RS	reaktivne zvrsti
SD	standardni odklon
ST	standard
TBA	2-tiobarbiturna kislina
TBARS	spojine, ki reagirajo z 2-tiobarbiturno kislino (ang. <i>thiobarbituric acid reacting substances</i> )
TEP	1,1,4,4-tetraetoksipropan
V	volumen

# 1 UVOD

## 1.1 OKSIDATIVNI STRES

V fizioloških pogojih je nastajanje reaktivnih zvrsti (RS) približno uravnoteženo z obrambnim sistemom antioksidantov. Če se ravnotežje premakne v smer RS, pride do stanja, ki ga imenujemo oksidativni stres (1).

Oksidativni stres je definiran kot motnja v ravnotežju med prooksidanti in antioksidanti v korist prvih, kar vodi do možnih poškodb (1).

V osnovi pride do oksidativnega stresa, če se zmanjša celična zaščita, ki sloni na antioksidantih in/ali se poveča nastajanja RS (radikalov, reaktivnih kisikovih (ROS) oziroma dušikovih (RNS) zvrsti) (2). Prvo je med drugim značilno za kronično, drugo pa za akutno fizično obremenitev (3). Med ROS in RNS uvrščamo tako radikale kot spojine, ki so nastale iz radikalov in so kemično še reaktivne, oziroma pod določenimi pogoji lahko iz njih nastanejo novi radikali. Tipični predstavniki ROS so:

- radikali: superoksidni ( $O_2^{\bullet -}$ ), hidroksilni ( $HO^{\bullet}$ ), peroksilni ( $ROO^{\bullet}$ ), hidroperoksilni ( $HOO^{\bullet}$ ), alkoksilni ( $RO^{\bullet}$ ) radikal;
- neradikalske spojine: vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), hipoklorit ( $ClO^-$ ), singletni kisik ( $^1O_2$ ), peroksinitrit ( $ONOO^-$ ), ozon ( $O_3$ ), itd.;

in RNS:

- radikali: dušikov oksid ( $NO^{\bullet}$ ), dušikov dioksid ( $NO_2^{\bullet}$ );
- neradikalske spojine: peroksinitrit ( $ONOO^-$ ), didušikov trioksid ( $N_2O_3$ ), didušikov tetraoksid ( $N_2O_4$ ), nitrozil kation ( $ON^+$ ), nitrozil anion ( $ON^-$ ), itd. (2).

Radikali so atomi, ioni in molekule ali njihovi deli, ki imajo na vsaj enem od energijskih nivojev en sam, neparjen elektron (4).

Posledice oksidativnega stresa so lahko povečana celična proliferacija, adaptacija celice ali organizma s prilagoditvijo obrambnih sistemov, celične poškodbe, nezmožnost celične delitve (staranje celice) in celo celična smrt. Celične poškodbe vključujejo poškodbe lipidov (lipidna peroksidacija (LP)), DNA, proteinov in ogljikovih hidratov (1).

Biološki kazalci (biomarkerji) oksidativnega stresa so med drugim tudi produkti oziroma biološki kazalci lipidne peroksidacije (1).

## 1.2 LIPIDNA PEROKSIDACIJA

### 1.2.1 Osnovne značilnosti

Lipidna peroksidacija (LP) je nekontrolirana oksidacija lipidov v biološki membrani, ki se začne kot radikalna verižna reakcija in se nadaljuje v kompleksen in prepleten sistem oksidacij, ki potekajo po radikalskih in neradikalskih poteh (5-7).

Glavne sestavine bioloških membran so lipidi in proteini. Količina proteinov narašča s številom funkcij, ki jih opravlja membrana. Nekateri proteini so povezani le z membransko površino preko nekovalentnih interakcij (ekstrinzični ali periferni proteini), drugi so delno ali v celoti vpeti v membrano ali pa jo prebadajo (intrinzični ali integralni proteini). Prevladujoči lipidi v živalskih celičnih membranah so fosfolipidi (lipidi, ki vsebujejo fosforjevo kislino). Od fosfolipidov je v živalskih membranah najpogosteje prisoten lecitin (fosfatidilholin), nekatere membrane, še posebej plazemske, pa vsebujejo tudi pomembne količine holesterola in sfingolipidov. Stranske verige lipidov v živalskih celicah sestavljajo maščobne kisline (MK) z nerazvejano ogljikovo verigo, ki ima navadno od 14 do 24 ogljikovih atomov, vse dvojne vezi pa so v cis konfiguraciji (1).

**Preglednica I:** Pregled nekaterih pogosto prisotnih naravnih maščobnih kislin (1).

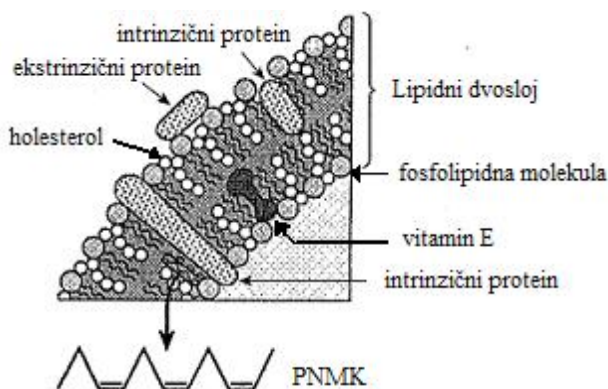
	Oznaka <sup>a</sup>	Trivialno ime
<b>Nenasičene MK</b>	16:0	palmitinska kislina
	18:0	stearinska kislina
<b>Mononenasičene MK</b>	18:1 ( $\omega$ -9) <sup>b</sup>	oleinska kislina
	18:2 ( $\omega$ -6)	linolna kislina
	18:3 ( $\omega$ -3)	linolenska kislina
<b>Polinenasičene MK (PNMK)</b>	20:4 ( $\omega$ -6)	arahidonska kislina (AA)
	20:5 ( $\omega$ -3)	eikozapentaenojska kislina (EPA)
	22:6 ( $\omega$ -3)	dokozaheksaenojska kislina (DHA)

<sup>a</sup> Število ogljikovih atomov v verigi : število dvojnih vezi.

<sup>b</sup> Poimenovanje glede na številčenje dvojnih vezi z metilnega (-CH<sub>3</sub>) konca verige.

Osnovna struktura celičnih membran in membran organelov je lipidni dvosloj. Prehod lipidov iz ene v drugo polovico dvosloja je redek. Znotraj posamezne polovice dvosloja pa lipidne molekule in proteini lahko prehajajo z enega konca na drugega. Ta fluidnost membran je v veliki meri posledica prisotnosti polinenasičenih maščobnih kislin (PNMK) v stranskih verigah lipidov, ki z znižanjem tališča povečajo viskoznost. Tališče se znižuje z

naraščanjem števila dvojnih vezi v maščobnih kislinah. Poškodbe PNMK zmanjšajo fluidnost membrane, ki je nujno potrebna za ustrezno opravljanje funkcij bioloških membran (1). Pri uravnavanju fluidnosti in organizaciji strukture membrane ima pomembno vlogo tudi holesterol. V manjših količinah pospešuje, v večjih pa zavira peroksidacijo membranskih lipidov (4).



**Slika 1:** Lipidni dvosloj (1).

Primarna tarča RS, ki sprožijo LP, so v membrani PNMK (6,8), ki so bodisi proste bodisi zaestrene s holesterolom ali glicerolom (9) in katerih možnost za oksidacijo se povečuje z naraščanjem števila dvojnih vezi (8).

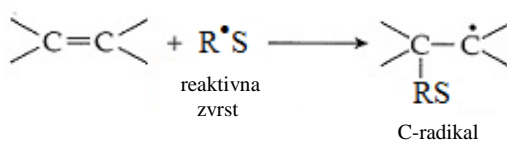
### 1.2.2 Mehanizem

Potek LP lahko razdelimo na tri faze: iniciacijo, propagacijo in terminacijo (1,6,9).

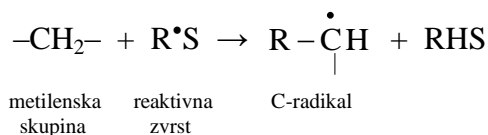
#### Iniciacija

LP sproži adicija RS na dvojno vez (1), bolj pogosto pa odtegnitev vodikovega atoma iz aktivirane metilenske ( $-\text{CH}_2-$ ) skupine v reakciji z RS (1,4,6,7,9). V obeh primerih nastane ogljikov radikal (C-radikal) (1,4,6-9). RS, ki so sposobne začeti LP, so protonirana oblika peroksinitrita  $\text{ONOOH}$ , hidroksilni  $\text{HO}^\bullet$ , hidroperoksilni  $\text{HOO}^\bullet$ , alkoksilni  $\text{RO}^\bullet$ , peroksilni  $\text{ROO}^\bullet$  radikal, dušikov dioksid  $\text{NOO}^\bullet$  ter nekateri kompleksi med železom in kisikom (1).

Adicija:



Odtegnitev vodikovega atoma:

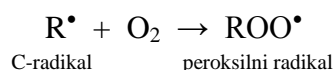


Dvojna vez ob sosednjem ogljikovem atomu metilenske skupine (alilna metilenska skupina) oslabi C–H vezi v metilenski skupini in tako olajša odtegnitev vodikovega atoma s te skupine (1). Odtegnitev je še lažja, če je dvojna vez prisotna ob obeh sosednjih ogljikovih atomih (bis-alilna metilenska skupina) (1,6). Nasičene in mononenasičene MK so zato veliko manj dovzetne za oksidacijo kot PNMK (6-9).

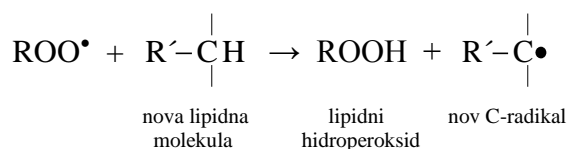
### **Propagacija**

Nastali C-radikal se stabilizira s preureditvijo atomov, tako da nastanejo konjugirani dieni. Reakcija se ustavi, če C-radikal pride v stik z drugim lipidnim C-radikalom (1,4). To poveže molekule fosfolipidov, kar zmanjša fluidnost in prožnost membran. Druga možnost je reakcija z membranskimi proteini, kar vpliva na njihovo funkcijo (4). Ti dve reakciji sta favorizirani pri zelo nizkih koncentracijah kisika (O<sub>2</sub>) v membrani (1). Najugodnejše je, da se reakcija prekine v stiku z vitaminom E (4).

V aerobnih razmerah pa je najverjetnejša reakcija C-radikala s kisikom (1,4), še posebej ker se kisik koncentrira znotraj membran (1). Pri tem nastane peroksilni radikal (ROO<sup>•</sup>) (1,4,6-9), ki predstavlja začetek verižne reakcije oksidacije lipidov (4).

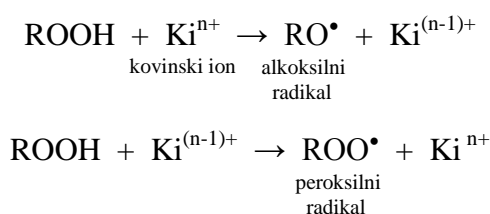


Peroksilni radikal lahko odvzame vodikov atom iz drugih lipidov (1,4,6). Nastaneta lipidni hidroperoksid (ROOH) in nov C-radikal, ki lahko reagira s kisikom in tvori nov peroksilni radikal. Tako se verižna reakcija LP nadaljuje (1).

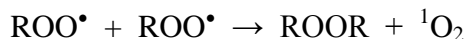


Na tak način lahko en sam iniciator sproži LP velikega števila molekul (1,6).

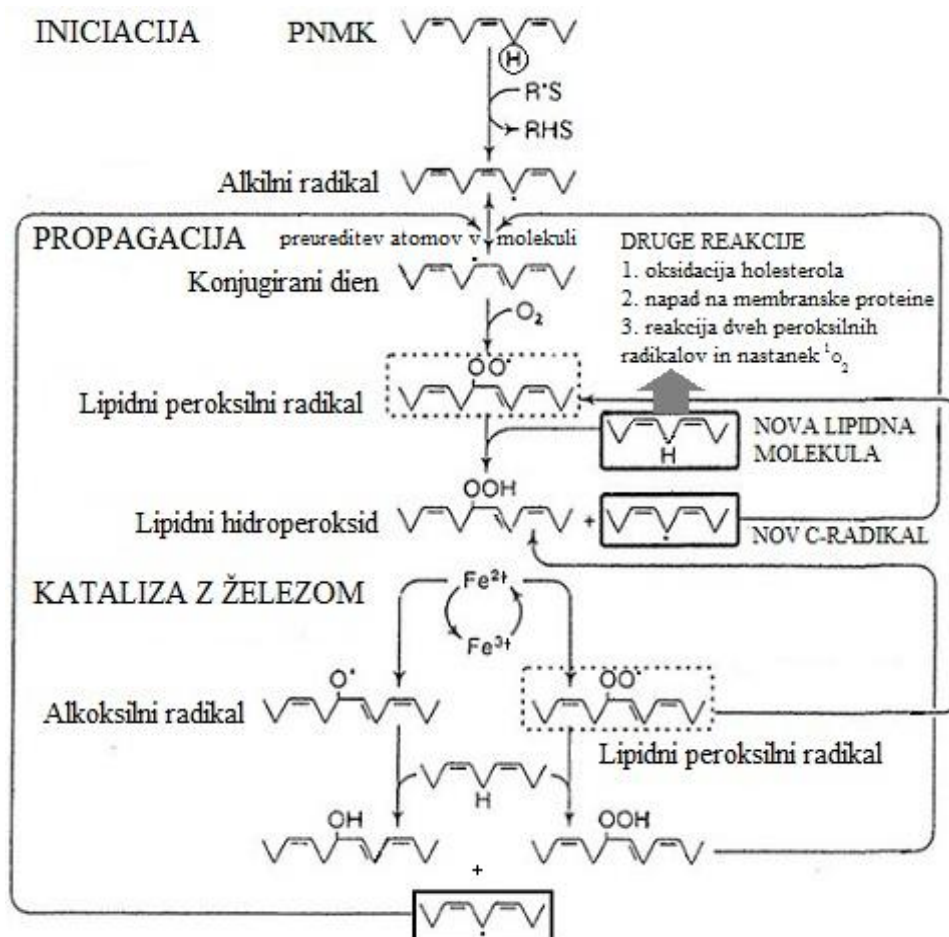
Lipidni hidroperoksid ob prisotnosti ionov nekaterih prehodnih kovin (železo, baker, kobalt (1)) razpade na alkoksilni ali peroksilni radikal, ki sprožita nov val oksidacij (1,4,6).



Ko je proces LP v razmahu, začne kemično nastajati še singletni kisik ( $^1\text{O}_2$ ) predvsem v reakciji med dvema peroksilnima radikaloma (reakcija terminacije) (2):



Nastali singletni kisik ne potrebuje več »radikalske« aktivacije ampak oksidira celične sestavine v svoji neposredni okolici po neradikalnih poteh. Primarno nastajajo hidroperoksidi in ciklični endoperoksidi, ki se lahko ob prisotnosti nekaterih kovinskih ionov pretvorijo v alkoksilne in peroksilne radikale, ki zopet sprožijo nov val oksidacij s kisikom (1,2).

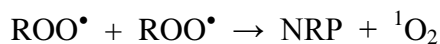


**Slika 2:** Prikaz poteka reakcij iniciacijske in propagacijske faze LP (1,4).

Verižno reakcijo LP omejujejo količina kisika in lipidov ter antioksidanti. Antioksidanti se lahko vmešajo v opisane reakcije tako, da reagirajo s posameznimi intermediati in tako prekinijo verigo povezanih reakcij. Končni rezultat je upočasnitev ali prekinitev LP (5).

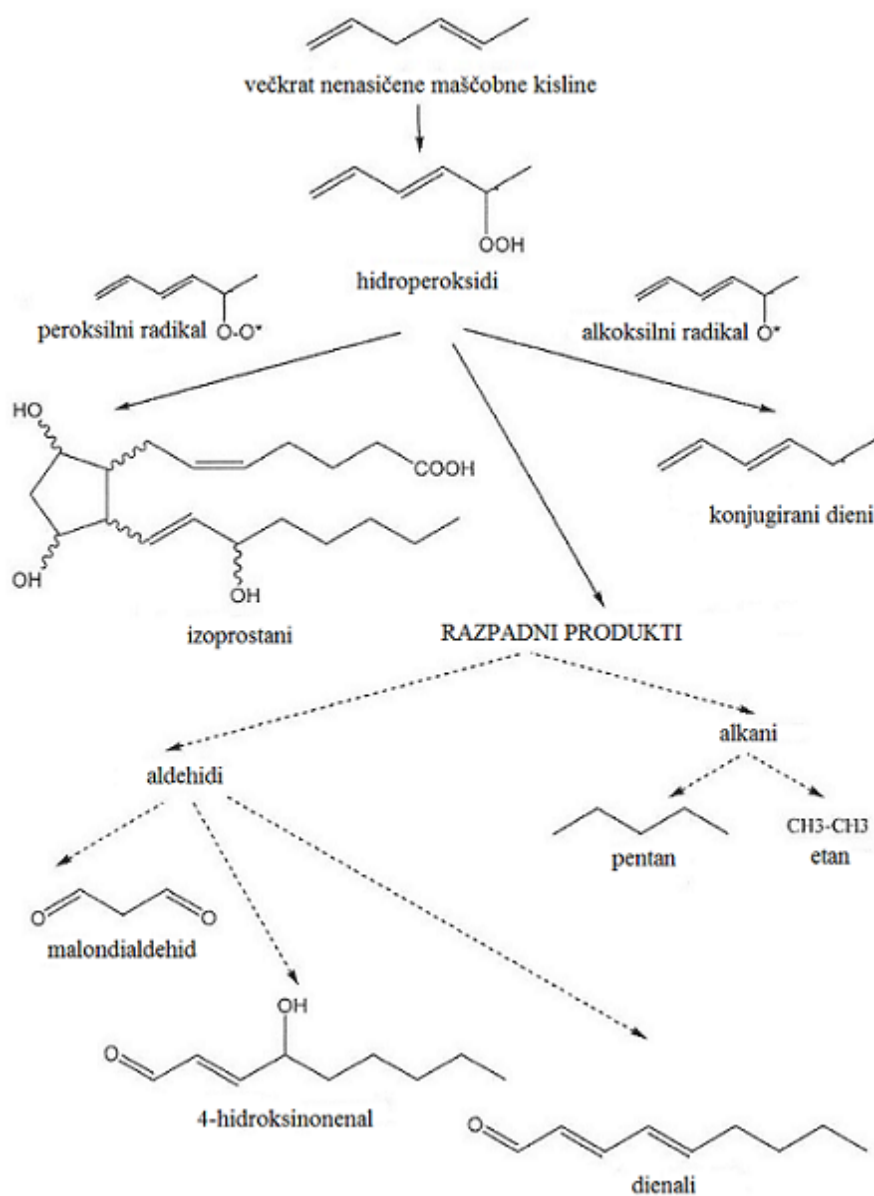
### Terminacija

V pogojih, kjer stalno poteka iniciacija LP, reakcija terminacije omeji LP tako, da poveže dva peroksilna radikala v neradikalni produkt (NRP) (1,6):



### 1.2.3 Produkti LP

Prvi produkti LP so lipidni hidroperoksidi, ki pa niso stabilni in se v nizu nadaljnjih reakcij pretvarjajo v končne alkane (etan, pentan, ...), alkene, aldehide (malondialdehid (MDA), 4-hidroksi-2-nonenal (HNE), dienali, ...), ketone, epokside ali izoprostane (IzoP) (1,2,9).



Slika 3: Tvorba nekaterih produktov LP (9).

### **1.2.4 Posledice LP**

Posledice LP so zmanjšana fluidnost membran, lažja izmenjava fosfolipidov med dvema polovicama lipidnega dvosloja, povečana propustnost membrane za snovi, katerih transport poteka samo skozi specifične kanale (npr. kalcijevi ioni) ter poškodbe proteinov, inaktivacija encimov (npr.  $\text{Ca}^{2+}$  ATP-aza,  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATP-aza) in ionskih kanalov (1).

Nekateri produkti LP prizadenejo normalno funkcijo membranskih proteinov s tem, da jih prečno povežejo ali pa inhibirajo njihove funkcionalne skupine. V membranah lahko nastanejo veliki agregati nefunkcionalnih proteinov in zato celična membrana propada. Izgubljajo se maščobne kisline, predvsem nenasičene, ki najprej vstopajo v reakcije z radikali. Skozi poškodovano membrano vstopajo kalcijevi ioni, iz celice pa se izgubljajo vitalne snovi in kalijevi ioni, kar v končni fazi vodi v propad celice oz. nekrozo, lahko tudi apoptozo (4).

Zaradi peroksidacije eritrocitne membrane eritrociti izgubijo sposobnost spreminjanja oblike in ne morejo več skozi najmanjše kapilare. Zaradi poškodb endoplazemskega retikuluma in Golgijevega aparata pa se zmanjša celična sinteza proteinov (1).

Napetostno odvisni  $\text{K}^+$  kanali imajo pomembno vlogo pri ustvarjanju električne aktivnosti v srcu in živčnem tkivu. Poškodbe teh kanalov lahko povzročijo nepravilnosti v srčnem ritmu in nevronske smrti (1).

Pri številnih boleznih so našli povišane koncentracije določenih produktov LP (1). LP ima tako glavno vlogo pri razvoju ateroskleroze (1,6,10), pomembna pa je tudi pri diabetesu (1,6), nevrodegenerativnih boleznih (npr. Alzheimerjeva in Parkinsonova bolezen) (6), revmatoidnem artritisu (1,6), poškodbah po ishemiji (6), mutagenosti (10), staranju (1) ter pri rakavih (11), ledvičnih (1) in jetrnih (12) obolenjih. Pogosto ni jasno ali je LP vzrok ali posledica bolezni (8).

Že v začetnih fazah LP se z njo močno zmanjša antioksidantna zaščita celic, kar vodi v pozitivno povratno zvezo (4).

### **1.2.5 Biološki kazalci LP**

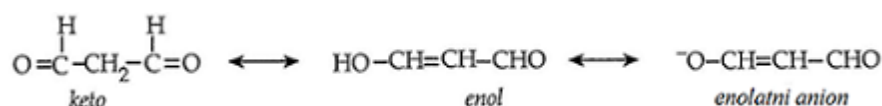
Biološki kazalec je definiran kot tista značilnost, ki se lahko objektivno izmeri in ovrednoti kot indikator normalnega biološkega procesa, patološkega procesa ali farmakološkega odziva na farmacevtsko intervencijo (9).



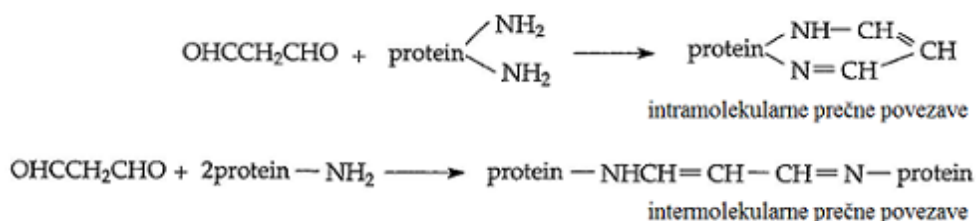
Med številnimi produkti oksidacije lipidov se kot biološki kazalci LP uporabljajo različni aldehidi, med katerimi sta najpogosteje omenjena malondialdehid (MDA) in 4-hidroksi-2-nonenal (HNE). Poleg aldehydov pa še izoprostani, lipidni peroksidi ter izdihani kratkoveržni ogljikovodiki (etan, pentan, ...) (1,9) in tudi klorirani in nitrirani lipidi (1,13).

### **Malondialdehid (MDA)**

MDA je eden glavnih sekundarnih produktov peroksidacije PNMK (9). Tvori se predvsem pri peroksidaciji tistih PNMK, ki vsebujejo več kot dve dvojni vezi. Take so med drugimi linolenska, arahidonska in dokozaheksaenojska kislina. Nekaj se ga tvori med encimsko sintezo eikozanoidov (1) in v pogojih, ko so različni ogljikovi hidrati (npr. saharoza, 2-deoksiriboza) in aminokislina izpostavljeni hidroksilnemu radikalu (1,14). Izvor MDA v urinu pa je tudi hrana, ki jo vnesemo v telo (1). MDA nastaja v manjših količinah v vseh tkivih, več pa ga nastaja med peroksidacijo v mikrosomalnih frakcijah jeter (4). V tkivu sesalcev se hitro metabolizira (1). V odvisnosti od pH obstaja v vodnih raztopinah v različnih tautomernih oblikah (1,11):



Pri fiziološkem pH je večina prostega MDA v obliki enolatnega aniona, ki ima nizko reaktivnost do večine aminokislin. V kislem pH se reaktivnost MDA poveča (1), lahko reagira s funkcionalnimi aaminskimi ( $-\text{NH}_2$ ) in tiolnimi ( $-\text{SH}$ ) skupinami proteinov in jih s tem inhibira (4) ali pa proteine prečno poveže (1,4). Povezave so intra- in intermolekularne (1):



MDA je genotoksičen (15) in mutagen, saj reagira z DNA bazami (1,15). Je tudi citotoksičen (12). Povečane količine MDA so našli pri različnih patoloških stanjih (maligni tumorji, diabetes tipa II, Alzheimerjeva bolezen) in pacientih na hemodializi (15).

MDA je najpogosteje uporabljen kazalec LP v bioloških vzorcih. Uporablja se tudi kot indeks oksidacije lipidov in žarkosti v hrani (9).

### 1.2.6 Vrednotenje LP

LP je kompleksen proces, ki poteka v številnih fazah, zato je za njeno vrednotenje na voljo veliko različnih metod (1). Metode se med seboj razlikujejo, nobena pa ni idealna (1,9).

LP lahko vrednotimo z merjenjem izgube substratov, merjenjem intermediatov (konjugirani dieni) in končnih produktov (peroksidi, izoprostani, aldehidi in izdihani ogljikovodiki) (1).

#### Izguba substratov (1)

Pri LP se izgublajo PNMK. To izgubo merimo tako, da najprej iz preiskovanega sistema ekstrahiramo lipide in jih hidroliziramo, da se sprostijo MK. Te pa nato analiziramo s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) ali pa jih pretvorimo v hlapne produkte (npr. s tvorbo estrov z metanolom) in ločimo s plinsko kromatografijo (GC). Da se izognemo peroksidaciji MK med hidrolizo in ekstrakcijo, ta dva procesa ponavadi izvajamo v dušikovi atmosferi.

**Preglednica II:** Izguba MK med peroksidacijo eritrocitne membrane (1).

Število C-atomov v MK	Število $>C=C<$ vezi v MK	Delež MK v membrani (%)	
		Normalno	Po poteku LP
16	0	21	21
18	0	14	14
18	1	12	11
18	2	10	8
20	4	15	5
22	0	3	3
22	4	2	1

Incubacija eritrocitov v prisotnosti velike količine vodikovega peroksida ( $H_2O_2$ ) in azida, ki inhibira katalazo.

#### Merjenje intermediatov: konjugirani dieni

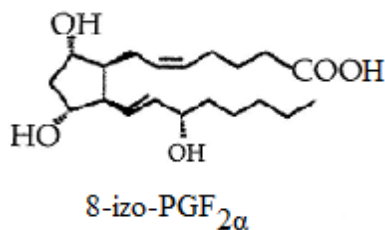
Pri oksidaciji PNMK se tvorijo konjugirani dieni, ki absorbirajo ultravijolično (UV) svetlobo v območju od 230 do 235 nm (1,6,7). Merjenje konjugiranih dienov predstavlja uporaben indeks LP pri čistih lipidih in izoliranih lipoproteinih in ima prednost, da meri zgodnjo fazo LP (1). Velik problem pa je neposreden prenos metode na tkiva in telesne tekočine, saj številne druge prisotne substance absorbirajo v danem UV območju (1,6,7). Temu se poskušamo izogniti z ekstrakcijo lipidov z organskimi topili in ločitvijo konjugiranih dienov s HPLC ali GC sklopljeno z masno spektrometrijo (GC-MS) (1).

### **Merjenje končnih produktov: peroksidi**

Pri LP se tvorijo tako hidroperoksidi in različni ciklični peroksidi kot produkti oksidacije holesterola (1). Metode za merjenje peroksidov lahko razdelimo na tiste, ki merijo celokupne peroksidge in tiste, ki ločijo različne peroksidge (1,6). Količina peroksidov v določenem času je odvisna od obsega iniciacijske faze LP in od tega, kako hitro peroksidge razpadejo na druge produkte ali pa se metabolizirajo (1). Ker peroksidge niso stabilni produkti LP, količina izmerjenih peroksidov ne predstavlja obsega LP in vivo (7,8).

### **Merjenje končnih produktov: izoprostani (IzoP)**

Najboljši biološki kazalci LP naj bi bili izoprostani, specifični končni produkti peroksidacije PNMK iz membranskih fosfolipidov (13). Pri z radikali povzročeni oksidaciji se tvorijo iz arahidonske F<sub>2</sub>-, iz eikozapentaenojske F<sub>3</sub>- in iz dokozaheksaenojske kisline F<sub>4</sub>-izoprostani. Za vrednotenje LP se najpogosteje uporabljajo F<sub>2</sub>-IzoP, izmed njih še posebej 8-izo-PGF<sub>2α</sub> (1):



Najboljše tehnike za merjenje IzoP so GC-MS in HPLC-MS tehnike (1,7). Obstajajo tudi komercialno dostopni kiti, ki z imunološko metodo določajo F<sub>2</sub>-IzoP, a je njihova zanesljivost vprašljiva (1).

Tudi IzoP pa niso »idealni« biološki kazalci. 8-izo-PGF<sub>2α</sub> pogosto predstavljajo le manjši delež končnih produktov LP, poleg tega je njihova tvorba odvisna od koncentracije kisika (13). V plazmi so F<sub>2</sub>-IzoP večinoma zaestreni s fosfolipidi, v urinu pa se nahajajo samo v prosti obliki (9). Prosti IzoP v plazmi se hitro metabolizirajo, zato je povečana količina prostih IzoP v plazmi lahko posledica povečane LP ali upočasnjene metabolizma (13). Pri stradanju se poveča količina IzoP v urinu. Najbolj idealno je sicer merjenje F<sub>2</sub>-IzoP in njihovih produktov v urinu (1). IzoP pa lahko določamo tudi v drugih bioloških tekočinah, kot so limfa, bronhoalveolarna tekočina, izdihan kondenziran zrak, žolč, cerebrospinalna, sinovialna, semenska in perikardialna tekočina (1,9).

***Merjenje končnih produktov: aldehidi (1)***

Med LP nastajajo različni aldehidi, med drugim MDA in HNE. Za njuno določanje obstajajo številne metode. Aldehyde lahko določamo z derivatizacijo z različnimi reagenti, katerih produkte ločimo s HPLC in izmerimo spektrofotometrično ali fluorometrično. Uporabimo lahko nederivatizacijske metode ali pa aldehide pretvorimo v hlapne produkte, jih ločimo z GC in identificiramo z MS. Konjugati med aldehidi in proteini so imunogeni, zato jih lahko določamo tudi s protitelesi.

Koncentracija prostih aldehydov v plazmi je verjetno zelo nizka. Za sprostitev vezanih aldehydov se uporablja podaljšana inkubacija, kar lahko vodi v umetno povečano peroksidacijo v vzorcu. Aldehidi nastajajo tudi pri razpadu peroksidov pod vplivom določenih kovinskih ionov, ki so lahko prisotni v vzorcu. MDA, HNE in ostali aldehidi pa se tudi metabolizirajo v celicah.

***Merjenje končnih produktov: izdihani ogljikovodiki***

V izdihanem zraku se poleg ostalih substanc nahajajo tudi različni ogljikovodiki kot sta etan in pentan (13). Etan nastaja pri razpadu  $\omega$ -3, pentan pa  $\omega$ -6 PNMK. Oba plina lahko določimo z GC; izdihan zrak potuje pri nizki temperaturi skozi adsorbent, da se ogljikovodiki vežejo in skoncentrirajo, nato pa jih sprostimo in analiziramo (1). Glede na dosedanje podatke naj bi bil etan kot biološki kazalec LP bolj primeren od pentana. Ogljikovodiki predstavljajo le manjši delež končnih produktov LP, njihova tvorba pa je močno odvisna od okolja v katerem poteka LP (13). Prav tako niso za rutinsko uporabo, saj zahtevajo kompleksno opremo in metode (7,13).

**1.3 METODE ZA DOLOČANJE MALONDIALDEHIDA (MDA)**

Za vrednotenje LP se najpogosteje uporabljajo metode, s katerimi določamo MDA (16).

Ker je v bioloških vzorcih prisotna le manjša količina prostega MDA, katerega določanje je ponavadi omejeno z limito detekcije posamezne metode, se večinoma določa celokupni (prost in vezan) MDA. Najpogosteje spektrofotometrično po reakciji z 2-tiobarbiturno kislino (TBA) (17,18).

MDA molekula je majhna, dobro topna v vodi in polarnih topilih, zato se težko ekstrahira (15,19). Ne vsebuje elektroforov, kromoforov, fluoroforov in je relativno nestabilna. Zaradi vsega naštetega se pogosto uporabljajo metode z derivatizacijo (15). MDA pa lahko

določamo tudi neposredno (9). Objavljene so številne metode za kvantitativno določanje MDA v bioloških vzorcih z uporabo HPLC, GC, GC-MS in kapilarne elektroforeze ter s fluorometrično ali spektrofotometrično detekcijo (18). Opisane so tudi imunološke metode (15).

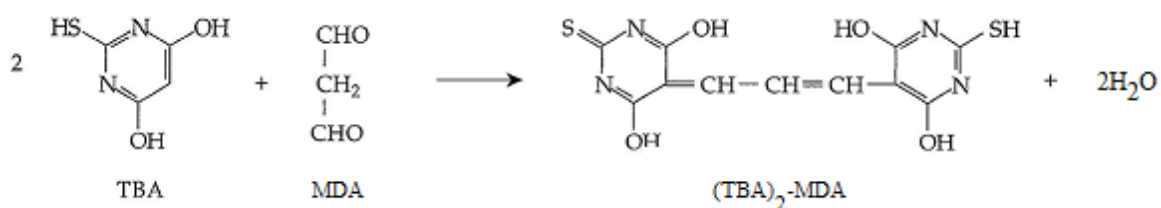
**Preglednica III:** Nekatere metode za določanje MDA (1,9).

Derivatizacijski reagent	Analitski pristop	Biološki vzorec
TBA	HPLC-fluorescenca HPLC-UV/VIS	plazma, urin, sinovialna tekočina, eritrocitna membrana, trombociti
DETBA	HPLC-fluorescenca	ribje tkivo
DNPH	HPLC-UV/VIS HPLC-DAD	plazma, urin
DAN	HPLC-UV/VIS	plazma, serum
TCPH	GC-MS/GC-ECD	plazma, urin
MPI	Kolorimetrija	telesne tekočine
/	HPLC-UV/VIS	serum
/	HPCE	plazma
/	Monoklonska in poliklonska protitelesa	številni, loči med različnimi produkti med MDA in aminokislinskimi ostanki

TBA: 2-tiobarbiturna kislina; DETBA: 1,3-dietil-2-tiobarbiturna kislina; DNPH: 2,4-dinitrofenilhidrazin; DAN: diaminoftalen; TCPH: 2,4,6-triklorofenilhidrazin; MPI: N-metil-2-fenilindol; HPLC-UV/VIS: tekočinska kromatografija visoke ločljivosti z detektorjem za ultravijolični in vidni del spektra; HPLC-DAD: HPLC z detektorjem z nizom diod; GC-ECD: plinska kromatografija z detektorjem na zajetje elektronov; HPCE: kapilarna elektroforeza visoke ločljivosti.

### 1.3.1 TBA metoda

TBA metoda je ena najstarejših in najpogosteje uporabljenih metod za merjenje LP. Osnova je reakcija med MDA in dvema molekulama tiobarbiturne kisline (TBA), pri čemer se tvori rožnato obarvan  $(TBA)_2$ -MDA produkt (1):



Reakcija poteka v kislem mediju (pH 0.75-3.5 (18)) pri temperaturi 95-100°C (7,9,16,20), produkt pa lahko določimo spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 532 nm (1,14)

ali fluorometrično z ekscitacijo pri 515 nm in emisijo pri 553 nm (10,20). Začetna kislina oz. bazična hidroliza določa, ali bomo merili prosto ali celokupno obliko MDA (11).

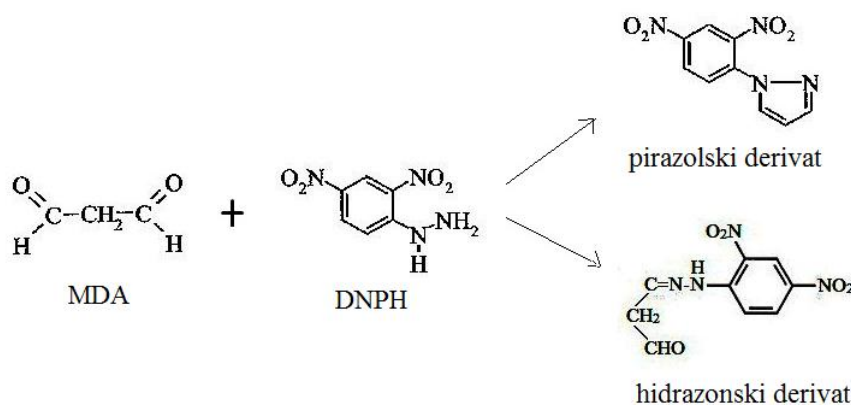
Glavna pomanjkljivost metode je slaba specifičnost za MDA, saj TBA reagira s številnimi drugimi substancami, ki vsebujejo karbonilno skupino (16). Te substance so različni aldehidi, nukleinske kisline, aminokisline, proteini, fosfolipidi, sialična kislina, žolčna barvila (9,11) in jim pravimo TBARS (ang. *thiobarbituric acid reacting substances*) (11). S TBA tvorijo kromogene, ki absorbirajo pri ali blizu 532 nm, prav tako pa motijo fluorescenčno določevanje. Tem interferencam se lahko izognemo z ločitvijo (TBA)<sub>2</sub>-MDA produkta od ostalih TBARS, ponavadi s HPLC, s čimer izboljšamo specifičnost (1). Še ena pomanjkljivost metode je, da se zaradi uporabe ostrih pogojev (visoka temperatura, nizek pH) večina MDA tvori pri razpadu lipidnih peroksidov in posledično oksidaciji novih PNMK (1,14,15). Razpad peroksidov pospešijo tudi nekateri kovinski ioni, ki so lahko prisotni v vzorcu ali reagentih (1). Vse to umetno povečuje koncentracijo MDA v vzorcu (16).

MDA lahko s TBA metodo določamo tudi v serumu, različnih tkivih in v urinu. Večina TBARS v urinu prihaja iz hrane, ki jo vnesemo v telo, zato se urinarni MDA ne sme uporabljati kot indeks telesne LP (1).

Prednost TBA metode je v njeni enostavnosti (1,14).

### 1.3.2 DNPH metoda

Poleg TBA metode je DNPH metoda ena najpogosteje uporabljenih derivatizacijskih metod za določanje MDA (18). Osnovana je na reakciji med MDA in 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH), pri čemer se tvorita hidrazonski (19) in pirazolski (21) derivat:



Reakcija poteka hitro, pri sobni temperaturi in v kislem mediju. Produkt je rumenkasto obarvan in nestabilen v prisotnosti svetlobe. Je slabo topen v vodnih raztopinah, zato ga lahko ekstrahiramo z uporabo organskih topil (17,22). Hidrazonski derivat določamo spektrofotometrično z merjenjem absorbance pri 310 nm (17,12). Pogosto se uporablja detektor z nizom diod (ang. *diode-array*) (12,23). Za sprostitvev na proteine vezanega MDA ponavadi uporabimo alkalne pogoje (12,17,23).

DNPH ima visoko afiniteto do karbonilnih spojih, zato reagira s številnimi aldehidi in ketoni (17,22). A je produkt značilen za določen aldehyd oziroma keton in ga lahko ločimo od ostalih z uporabo HPLC, kar nam omogoča specifično določevanje MDA (17).

Prednost DNPH metode pred TBA metodo je v tem, da reakcija z DNPH poteka pri sobni temperaturi, kar lahko zmanjša obseg kislinsko katalizirane tvorbe MDA v vzorcu (18,22). Je pa DNPH metoda dolgotrajnejša od TBA metode, vsebuje številne ekstrakcije tekoč-tekoče in DNPH reagent je treba dnevno čistiti in rekristalizirati ali ga pripraviti vsak dan svežega. Poleg tega se lahko vzorec zlahka kontaminira z aldehidi iz zraka ali nečistotami, ki so prisotne v reagentih (22).

## 2 NAMEN DELA

Malondialdehid je najpogosteje uporabljen kazalec lipidne peroksidacije v bioloških vzorcih. Za njegovo kvantifikacijo se lahko uporabljajo različne metode, med katerimi so najbolj uporabljene derivatizacijske metode sklopljene s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti.

V diplomski nalogi bomo primerjali kromatografski metodi, ki uporabljata za derivatizacijo 2-tiobarbiturno kislino (TBA metoda (Chromsystems assay)) in 2,4-dinitrofenilhidrazin (DNPH metoda). Pri prvi metodi bomo derivate detektirali s fluorescenčnim, pri drugi pa z UV in masnim detektorjem. Metodi bomo optimizirali za delo s plazmo konj.

Najprej bomo poskusili razviti metodo za določanje proste oblike MDA v plazmi konj. Pri tem bomo najprej modificirali DNPH metodo, ki so jo razvili v diplomski nalogi Šparakl (24) in s katero bomo določali celokupni MDA. Modifikacije bomo uporabili pri DNPH metodi za določanje proste oblike MDA, ki jo bomo nato poskusili še dodatno optimizirati. Optimizacija bo potekala v smeri koncentriranja vzorca.

Nato bomo modificirano DNPH metodo za določanje celokupnega MDA in TBA metodo validirali po FDA smernicah. Pri DNPH metodi bomo določili izkoristek ekstrakcije, linearnost, ponovljivost, točnost, območje linearnosti, mejo kvantifikacije ter stabilnost, pri TBA metodi pa izkoristek ekstrakcije, linearnost, območje linearnosti, mejo kvantifikacije in stabilnost.

Nazadnje bomo z DNPH in TBA metodo določili koncentracijo MDA v plazmi konj in metodi primerjali med seboj. Določili bomo tudi ali sta metodi primerni za spremljanje oksidativnega stresa pri konjih z vidika sprememb v koncentraciji MDA v plazmi.



### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Biološki material

PLAZMA A: Heparizirana plazma ljubiteljskih konj, odvzeta 3. 4. 2009 na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani, po 6 ml v več plastičnih epruvet. Do pričetka dela je bila hranjena v zamrzovalniku pri  $-70^{\circ}\text{C}$ . Nato smo po potrebi plazmo v posamezni epruveti odtalili v hladni vodi, jo premešali na mešalu na ekscenter (lab dancer) in jo razdelili po 510-1000  $\mu\text{l}$  v 2 ml plastične epruvetke, ki smo jih hranili v zamrzovalniku pri  $-20^{\circ}\text{C}$ . Plazmo iz teh epruvet smo pred uporabo prav tako odtalili v hladni vodi in jo premešali na mešalu na ekscenter (lab dancer).

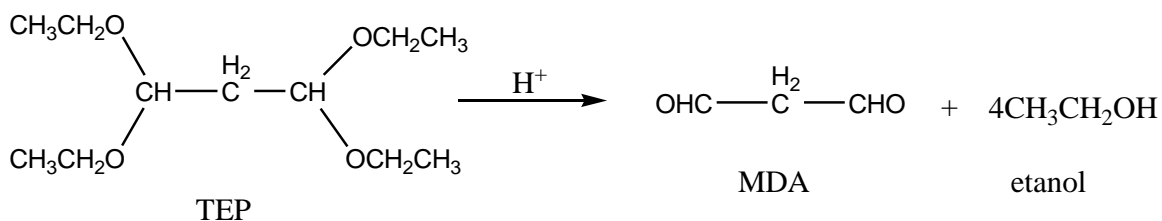
PLAZMA K1-K10: Plazemski vzorci desetih treniranih konj, odvzeti marca 2010 na Veterinarski fakulteti Univerze v Ljubljani, po 0.4-1 ml v plastične epruvetke s heparinom. Konji so opravili predpisan trening za kasače, vzorci pa so bili konjem odvzeti pred treningom ter 0 ur, 24 ur in 48 ur po treningu. Za vsakega konja sta bila od vsakem času odvzeta dva vzorca. Vzorci so bili do pričetka dela hranjeni v zamrzovalniku pri  $-70^{\circ}\text{C}$ , nato smo jih odtalili v hladni vodi in jih premešali na mešalu na ekscenter (lab dancer).

##### 3.1.2 Standardi

1,1,3,3-TETRAETOKSIPROPAN (TEP), 97% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija);  $M=220.31$  g/mol,  $\rho=0.918$  g/ml.

Standard malondialdehida (MDA) smo pripravili s kislno hidrolizo TEP.

Pri popolni hidrolizi TEP nastanejo štiri molekule etanola na eno molekulo MDA (1):



### 3.1.3 Reagenti in topila

ŽVEPLOVA(VI) KISLINA (95-97%), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Nemčija); M=98.08 g/mol, ρ=1.84 kg/l.

KLOROVODIKOVA KISLINA (37%), HCl (Merck, Darmstadt, Nemčija); M=36.46 g/mol, ρ=1.19 kg/l.

NATRIJEV HIDROKSID (99%), NaOH (Zorka Šabac, Šabac, Srbija); M=40.00 g/mol.

RAZTOPINA NATRIJEVEGA HIDROKSIDA, Titrisol (c=1 mol/l (1 N)), (Merck, Darmstadt, Nemčija).

PERKLORNA KISLINA (70%), HClO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Nemčija); M=100.50 g/mol, ρ=1.67 kg/l.

2,4-DINITROFENILHIDRAZIN (97%), DNPH (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija); M=198.14 g/mol.

DINATRIJEV HIDROGENFOSFAT DODEKAHIDRAT (99-102%), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O (Merck, Darmstadt, Nemčija); M=358.14 g/mol .

KALIJEV DIHIDROGENFOSFAT (99.5-100.5%), KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck, Darmstadt, Nemčija); M=136.08 g/mol.

NATRIJEV KLORID (≥99.5%), NaCl (Merck, Darmstadt, Nemčija); M=58.44 g/mol.

O CETNA KISLINA (99.9%), CH<sub>3</sub>COOH (J.T.Baker B.V, Deventer, Nizozemska); M=60.05 g/mol, ρ=1.05 kg/l.

ACETONITRIL (≥99.9%), CH<sub>3</sub>CN (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija); M=41.05 g/mol, ρ=0.78 kg/l.

IZOPROPANOL (≥99.9%), CH<sub>3</sub>CH(OH)CH<sub>3</sub> (Merck, Darmstadt, Nemčija); M=60.10 g/mol, ρ=0.786 kg/l.

HEKSAN (≥95%), CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>CH<sub>3</sub> (Fluka, Buchs, Švica); M=86.18 g/mol, ρ=0.66 kg/l.

MRAVLJIČNA KISLINA (LC-MS čistote), HCOOH (Merck, Darmstadt, Nemčija); M=46.03 g/mol, ρ=1.22 kg/l.

DUŠIK (Tovarna Dušika Ruše, Ruše, Slovenija).

MILI-Q VODA (MILI-Q sistem, Milipore, Bedford, MA, ZDA); specifična upornost 18.2 MΩ\*cm, celokupni organski ogljik (TOC)<5 ppb.

REAGENT KIT FOR HPLC ANALYSIS OF MDA IN PLASMA/SERUM (Cat. no. 67.000, Chromsystems Instruments and Chemicals GmbH, München, Nemčija).

### 3.1.4 Oprema

HLADILNIK (LTH, Škofja Loka, Slovenija).

ZAMRZOVALNIK -20°C (Gorenje, Velenje, Slovenija).

ZAMRZOVALNIK -70°C MDF-U50V (Sanyo Electric Biomedical, Moriguchi, Japonska).

TEHTNICA AG 245 (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Švica).

TEHTNICA H 54 AR (Mettler, Greifensee, Švica).

MEŠALO NA EKSCENTER LAB DANCER (IKA, Staufen, Nemčija).

MEŠALO NA EKSCENTER VIBROMIX 114EV (Tehtnica, Železniki, Slovenija).

STRESALNIK VIBROMIX 403 EVT (Tehtnica, Železniki, Slovenija).

TERMOSTATIRANI STRESALNIK VORTEMP 56 EVC (Tehtnica, Železniki, Slovenija).

CENTRIFUGA Sigma 3K30; rotor: Nr. 12110 (Tehtnica, Železniki, Slovenija).

TURBOVAP®LV (Caliper, Hopkinton-MA, ZDA).

ULTRAZVOČNA KADIČKA SONIS 4 (Iskra, Kranj, Slovenija).

POLAVTOMATSKE PIPETE: 20-200 µl in 100-1000 µl (Eppendorf research, Hamburg, Nemčija).

PLASTIČNE EPRUVET(K)E: 1.5 ml prozorne in rjave (Brand, Wertheim, Nemčija), 2.0 ml (Sarstedt, Nümbrecht, Nemčija), 14 ml (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Nemčija).

STEKLENI INVENTAR: čaše, merilne bučke, tehtiči, viala, inserti, merilni valji.

OSTALI INVENTAR: plastične kapalke, kovinske spatule in žličke, Parafilm M, pH papirčki in alufolija.

HPLC SISTEM (Agilent Technologies 1100 Series) z UV detektorjem (Diode-Array G 1315 A) in FLD detektorjem (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA).

KOLONA: Gemini 110 A C18, 150 x 4.60 mm, 5 µm (Phenomenex, Chesire, Velika Britanija) in

PREDKOLONA: Gemini C18, 5 µm (Phenomenex, Chesire, Velika Britanija).

LC-MS/MS SISTEM Agilent 1290 Infinity LC in Agilent 6460 Triple Quadrupole Jetstream® LC/MS (Agilent technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA).

KOLONA: Kinetex C18, 50 x 2.1 mm, 2.6 µm (Phenomenex, Chesire, Velika Britanija).

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Pogoji analize MDA s HPLC z DNPH metodo

#### Priprava 1% (v/v) žveplovo(VI) kisline (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

1% (v/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> smo pripravili iz 95-97% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

#### Priprava standardov MDA

62 µl 1,1,3,3-tetraetoksipropana (TEP) smo odpipetirali v 100 ml bučko in z vodo dopolnili do oznake. Tako smo dobili 2.5 mM osnovno raztopino (ORI). Nato smo 998 µl ORI odpipetirali v 50 ml bučko in dopolnili do oznake z 1% žveplovo(VI) kislino. Nastalo raztopino smo inkubirali dve uri pri sobni temperaturi, da je potekla hidroliza TEP. Tako smo dobili standard MDA s koncentracijo 50 µmol/l (ORII). Ta standard smo ustrezno redčili z 1% žveplovo(VI) kislino, da smo dobili standarde s koncentracijami 10, 5, 2.5 in 1.25 µmol/l. Standard s koncentracijo 1.25 µmol/l pa smo dalje redčili z 1% žveplovo(VI) kislino, da smo dobili še standarde s koncentracijami 0.625, 0.313, 0.156 in 0.078 µmol/l.

Vsakega standarda MDA z določeno koncentracijo smo pripravili po 1 ml v 1.5 ml plastičnih epruvetkah. V preglednici IV so prikazane redčitve 50 µM ORII in 1.25 µM standarda z 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> za pripravo standardov MDA z ustrezno koncentracijo.

**Preglednica IV:** Priprava standardov MDA.

<b>c<sub>ST</sub> (µmol/l)</b>	<b>50 µM ORII (µl)</b>	<b>1.25 µmol/l ST (µl)</b>	<b>1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (µl)</b>
10	200	-	800
5	100	-	900
2.5	50	-	950
1.25	25	-	975
0.625	-	500	500
0.313	-	250	750
0.156	-	125	875
0	-	-	1000

#### Priprava 2 M klorovodikove kisline (HCl)

100 ml 2 M HCl smo pripravili iz 16.57 ml 37% HCl in vode do oznake.

### **Priprava 6 M natrijevega hidroksida (NaOH)**

V 100 ml bučko smo nalili približno 50 ml vode in med mešanjem počasi dodajali predhodno natehtani NaOH (24 g), ki se je sproti raztapljal. Ko se je ves NaOH raztopil, smo dolili vodo do oznake in še enkrat premešali.

Ker smo imeli težave s previsokimi odzivi v slepih vzorcih, verjetno zaradi nečistot v reagentih, smo za validacijo in analizo plazemskih vzorcev konj uporabili 6 M NaOH, ki smo ga pripravili z redčenjem koncentrirane raztopine NaOH (Titrisol) s 167 ml vode.

### **Priprava 5.25 M perklorne kisline (HClO<sub>4</sub>)**

10 ml 5.25 M HClO<sub>4</sub> smo pripravili iz 4.514 ml 70% HClO<sub>4</sub> in vode do oznake. To raztopino smo pripravili vsak dan svežo.

### **Priprava 5 mM raztopine 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH)**

V 5 ml bučko smo natehtali 5.1 mg DNPH, dopolnili z 2 M HCl do oznake in dobro premešali. To raztopino smo pripravili vsak dan svežo.

1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 M HCl in obe raztopini 6 M NaOH smo pripravili sveže vsakih 7 dni, 50 μM ORII pa vsakih 14 dni. Te raztopine smo shranjevali v hladilniku pri temperaturi cca. 5°C.

### **Osnovni postopek priprave vzorcev za določanje celokupnega MDA z DNPH metodo**

Izhajali smo iz postopka, ki so ga razvili v diplomski nalogi z naslovom Razvoj metode HPLC za vrednotenje lipidne peroksidacije z določanjem malondialdehida v plazmi (24). Postopek smo optimizirali. Optimizacija je opisana v 3.2.3.

V 1.5 ml plastičnih epruvtkah smo k 250 μl vzorca (plazma, standard) dodali 50 μl 6 M NaOH, premešali in inkubirali 30 minut v termostatisiranem stresalniku pri 60°C in 20 obratih/min (alkalna hidroliza na proteine vezanega MDA). Vzorce smo nato ohlajali 10 min pri sobni temperaturi, jih nakisali s 125 μl 5.25 M HClO<sub>4</sub> in jih centrifugirali 10 minut pri 5°C in 15000 obratih/min (obarjanje proteinov). Po 250 μl supernatanta smo prenesli v 2 ml plastične epruvtke, dodali po 25 μl 5 mM raztopine DNPH in inkubirali 30 minut pri sobni temperaturi, zaščiteno pred svetlobo (derivatizacija MDA). Nastali produkt MDA-DNPH je nestabilen v prisotnosti svetlobe, zato smo morali vse nadaljnje faze izvajati tako, da so bili vzorci zaščiteni pred svetlobo. Sledila je faza ekstrakcije. Derivatiziranim vzorcem v 2 ml plastičnih epruvtkah smo dodali po 1.2 ml heksana, jih stresali na

stresalniku 5 minut pri hitrosti 250 obratov/min in nato po 1 ml heksanske frakcije prenesli v 1.5 ml plastične epruvetke, ovite z alufolijo. Te smo zložili v aparaturo TURBOVAP in jih sušili s tokom dušika pri temperaturi 40°C in tlaku dušika 0.5-1 psi oziroma 3.4-6.9 kPa (prvo minuto) in 2.5 psi oziroma 17.2 kPa (naslednjih 6 min). Derivatiziranim vzorcem v 2 ml plastičnih epruvetkah smo nato še enkrat dodali po 1.2 ml heksana, jih stresali na stresalniku 5 minut pri hitrosti 250 obratov/min in odvzeli po 1.1 ml heksanske frakcije. Odvzete heksanske frakcije smo združili s posušenimi heksanskimi frakcijami v 1.5 ml plastičnih epruvetkah, ovitih z alufolijo in jih posušili. Sušenje v aparaturi TURBOVAP je tokrat potekalo pri tlaku dušika 0.5-1 psi oziroma 3.4-6.9 kPa (prvi minuto do dve) in 2.5 psi oziroma 17.2 kPa (naslednjih 6 min oziroma toliko, da so se vzorci do konca posušili). Temperatura za izparevanje heksana je ostala enaka, 40°C. Dobljenim suhim ekstraktom smo dodali po 100 µl mobilne faze (acetonitril/voda/ocetna kislina = 38:62:0.2%, v/v/v), jih mešali na mešalniku VIBROMIX po 1.5 minute (rekonstitucija) in odpipetirali po 80-90 µl dobljene raztopine v inserte, ki smo jih nato vstavili v obarvane vialo. Vialo z vzorci smo zlagali v avtomatski vzorčevalnik HPLC sistema ohlajenega na 5°C.

### **Osnovni postopek priprave vzorcev za določanje prostega MDA z DNPH metodo**

Postopek je bil enak postopku priprave vzorcev za določanje celokupnega MDA, ki smo ga opisali zgoraj, s to izjemo, da nismo izvedli alkalne hidrolize na proteine vezanega MDA in torej vzorcem nismo dodali 50 µl 6 M NaOH in jih nismo inkubirali 30 minut v termostatisiranem stresalniku pri 60°C in 20 obratih/min.

### **Analitski pogoji**

Mobilna faza (MF) je bila sestavljena iz acetonitrila, vode in očetne kisline (38:62:0.2 %, v/v/v). Imeli smo izokratsko elucijo. Izbrali smo kolono Gemini 110 A C18 (150 x 4.60 mm, velikost delcev 5 µm) in predkolono Gemini C18 (velikost delcev 5 µm). Kolona je bila termostatisirana na 35°C, pretok MF skozi kolono je bil 0.9 ml/min, tlak na koloni pa med 65 in 69 bari. Injicirali smo 20 µl vzorca. Po vsakem injiciranju vzorca se nam je igla za injiciranje spirala v mešanici izopropanola in vode (50:50, v/v). Čas analize vsakega vzorca je bil 16 minut, retencijski čas našega analita pa približno 11.7 minute. Valovna dolžina, pri kateri smo določevali naš analit, je bila 310 nm, referenčna valovna dolžina pa 390 nm.

**Priprava mobilne faze (MF)**

Mobilno fazo smo pripravljali vsak dan svežo, ločeno organsko in vodno komponento. Acetonitril in vodo smo nakisali z 0.2%, v/v očetne kisline in ju vsaj 10 minut razplinjevali s pomočjo ultrazvočne kadičke.

**3.2.2 Pogoji analize MDA s HPLC s TBA metodo (Chromsystems test)****Priprava fosfatnega pufru s pH 7.4 (PBS)**

0.238 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0.019 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 0.8 g NaCl smo stresli v 100 ml bučko, raztopili v vodi in nato z vodo dopolnili do oznake. Raztopino smo hranili v hladilniku pri temperaturi 5°C.

**Priprava standardov MDA**

Najprej smo pripravili ORI in ORII, kot je opisano v 3.2.1. Nato smo pripravili standarde MDA s koncentracijami od 0 do 10  $\mu\text{mol/l}$ , prav tako na način, ki je opisan v 3.2.1, le da smo namesto 1%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , uporabili fosfatni pufer s pH 7.4. PBS smo uporabili zato, da bi zmanjšali vpliv na pH mobilne faze Chromsystems kita, kjer MF kroži v zaprtem sistemu. Način priprave standardov MDA je prikazan v preglednici V.

**Preglednica V:** Priprava standardov MDA.

<b>c<sub>ST</sub> (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b>50 <math>\mu\text{M}</math> ORII (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>1.25 <math>\mu\text{mol/l}</math> ST (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	<b>PBS (<math>\mu\text{l}</math>)</b>
10	200	-	800
5	100	-	900
2.5	50	-	950
1.25	25	-	975
0.625	-	500	500
0.313	-	250	750
0.156	-	125	875
0.078	-	62.4	937.6
0	-	-	1000

**Priprava vzorcev**

Uporabili smo Chromsystems kit for HPLC analysis of MDA in plasma/serum (Cat. no. 67.000, Chromsystems Instruments and Chemicals GmbH, München, Nemčija) (10).

V 1.5 ml rjavih plastičnih epruvetkah (zaščita vzorca pred svetlobo) smo k 100  $\mu\text{l}$  plazme ali standarda dodali 500  $\mu\text{l}$  obarjalnega reagenta, mešali 10 s na vortexu in centrifugirali 5 minut pri 13000 obratih/min (obarjanje proteinov). Nato smo po 500  $\mu\text{l}$  supernatanta

prenesli v 1.5 ml prozorne plastične epruvetke, dodali po 100  $\mu$ l derivatizacijskega reagenta, rahlo premešali in inkubirali 60 min v termostatisiranem stresalniku pri 95°C in 20 obratih/min (derivatizacija MDA). Potem ko smo vzorce ohlajali 19 min v zamrzovalniku pri -20°C, smo jim dodali po 500  $\mu$ l nevtralizacijskega pufra, rahlo premešali in jih prenesli v vialo. Vialo smo zlagali v avtomatski vzorčevalnik HPLC sistema ohlajenega na 5°C.

### **Analitski pogoji**

Kolona in mobilna faza so bili iz Chromsystems kita. Kolona je bila termostatisirana na 25°C, pretok MF skozi kolono je bil 1.0 ml/min, tlak na koloni pa okrog 125 barov. Imeli smo izokratsko elucijo. Volumen injiciranja je bil 20  $\mu$ l. Po injiciranju vsakega vzorca se nam je igla za injiciranje spirala v mešanici vode in metanola (50:50, v/v). Čas analize posameznega vzorca je bil 4.5 minute, retencijski čas našega analita pa približno 2.8 minute. Analit smo določali s fluorescenčnim detektorjem z ekscitacijo pri 515 nm in emisijo pri 553 nm.

### ***3.2.3 Optimizacija DNPH metode***

Optimizirali smo DNPH metodo, ki so jo razvili v diplomski nalogi z naslovom Razvoj metode HPLC za vrednotenje lipidne peroksidacije z določanjem malondialdehida v plazmi (24). Metodo smo optimizirali, ker z njo s HPLC-UV analizo nismo mogli določiti koncentracije proste oblike MDA v plazmi. Z namenom določitve te koncentracije, je optimizacija potekla v smeri koncentriranja vzorca. Tako smo najprej optimizirali postopek priprave vzorcev za določanje celokupnega MDA, ki so ga opisali v diplomski nalogi Šparakl (24). Pri tem smo prilagodili fazo sušenja, ter spremenili volumen mobilne faze za rekonstitucijo. Za potrebe validacije smo spremenili še volumen injiciranja pri HPLC analizi. Ker nam je bil tak način dela lažji, smo se odločili, da bomo delali po tem prilagojenem postopku, opisanem v 3.2.1. V poskusih določitve koncentracije prostega MDA v plazmi smo nato spreminjali še volumen plazme in število ekstrakcij.



## **A. Optimizacija DNPH metode za določanje celokupne oblike MDA v plazmi**

### **Zamenjava steklenih epruvet z 1.5 ml plastičnimi epruvetkami**

Steklene epruvete (12 ml), ki jih za sušenje heksanskih frakcij uporabljajo v diplomski nalogi Šparakl (24), smo zamenjali z 1.5 ml plastičnimi epruvetkami. Naš namen je bil, da bi z nadaljnjimi modifikacijami lažje skoncentrirali vzorec.

### **Volumen mobilne faze za rekonstitucijo**

Volumen MF za rekonstitucijo smo spremenili z 200  $\mu\text{l}$ , ki jih uporabljajo v diplomski nalogi Šparakl (24), na 100  $\mu\text{l}$  in 80  $\mu\text{l}$ .

Pripravili smo po 1 ml standardov s koncentracijami 0, 0.156, 0.625 in 2.5  $\mu\text{mol/l}$ . Način priprave standardov je prikazan v preglednici IV. Standarde smo obdelali po postopku za določanje celokupnega MDA, opisanem v 3.2.1, le da smo v fazi rekonstitucije uporabili različne volumne MF. V prvem poskusu smo izvedli rekonstitucijo z 200 in 100  $\mu\text{l}$  MF in primerjali površine odzivov. V drugem poskusu pa smo izvedli rekonstitucijo s 100 in 80  $\mu\text{l}$  MF in ravno tako primerjali površine odzivov. Iz razmerja površin odzivov, smo ugotovili, za koliko nam je res uspelo skoncentrirati vzorec. Vzorce smo analizirali pod pogoji navedenimi v 3.2.1, le da smo injicirali 50  $\mu\text{l}$  vzorca.

### **Volumen injiciranja**

Ker smo se odločili, da bomo vzorce pripravljali po prilagojenem postopku za določanje celokupnega MDA, opisanem v 3.2.1, smo, da bi lahko isti vzorec večkrat injicirali, prilagodili tudi volumen injiciranja za HPLC analizo. Volumen injiciranja smo tako s 50  $\mu\text{l}$ , ki jih uporabljajo v diplomski nalogi Šparakl (24), zmanjšali na 20  $\mu\text{l}$ .

## **B. Optimizacija DNPH metode za določanje proste oblike MDA v plazmi**

### **Volumen plazme**

Začetni volumen plazme, 250  $\mu\text{l}$ , smo povečali na 500  $\mu\text{l}$ , 750  $\mu\text{l}$  in 1000  $\mu\text{l}$ .

Najprej smo pripravili po 1 ml standardov s koncentracijami 0, 0.156, 0.625 in 2.5  $\mu\text{mol/l}$ . Način priprave standardov je prikazan v preglednici IV. Nato smo naredili poskuse z 250  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$ , 750  $\mu\text{l}$  in 1000  $\mu\text{l}$  plazme in standardov. Vzorce smo obdelali po postopku za določanje prostega MDA, opisanem v 3.2.1. Način priprave vzorcev je prikazan v preglednici VI.

Skladno s povečevanjem začetnega volumna vzorcev, smo povečevali tudi volumne ostalih reagentov z izjemo heksana pri vzorcih z začetnim volumnom 500  $\mu\text{l}$ . Pri vzorcih z začetnim volumnom 750  $\mu\text{l}$  smo tako izvedli ekstrakcijo s trikrat po 1.2 ml heksana in smo vzorce tudi trikrat sušili. Pri vzorcih z začetnim volumnom 1000  $\mu\text{l}$  pa smo zaradi večjega volumna reagentov obarjanje izvedli v 2 ml plastičnih epruvtkah, derivatizacijo v 14 ml plastičnih epruvtah, ekstrakcijo smo izvedli z dvakrat po 2.5 ml heksana, heksanske frakcije pa smo prenesli v 2 ml plastične epruvetke (prvič po 1.8 ml in drugič po 2 ml heksanske frakcije) in jih v aparaturi TURBOVAP sušili do suhega.

Vse vzorce smo analizirali pod pogoji, navedenimi v 3.2.1, le da smo injicirali 50  $\mu\text{l}$  vzorca. Zaradi pomanjkanja plazme smo delali le v eni paralelki.

**Preglednica VI:** Priprava vzorcev z različnimi začetnimi volumni (250  $\mu\text{l}$ , 500  $\mu\text{l}$ , 750  $\mu\text{l}$  in 1000  $\mu\text{l}$ ).

	<b>začetni volumen standarda ali plazme (<math>\mu\text{l}</math>)</b>			
	<b>250</b>	<b>500</b>	<b>750</b>	<b>1000</b>
<b>volumen <math>\text{HClO}_4</math> (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	125	250	375	500
<b>odvzem supernatanta (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	250	500	750	1000
<b>volumen DNPH (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	25	50	75	100
<b>dodatek heksana (ml)</b>	2x1.2	2x1.2	3x1.2	2x2.5
<b>odvzem heksanske frakcije (ml)</b>	1. 1.0 2. 1.1	1. 1.0 2. 1.1	1. 1.0 2. 1.1 3. 1.1	1. 1.8 2. 2.0
<b>volumen MF za rekonstitucijo (<math>\mu\text{l}</math>)</b>	100	100	100	100

### Število ekstrakcij

Spreminjali smo število ekstrakcij pri vzorcih z začetnim volumnom 1000  $\mu\text{l}$ .

Pripravili smo po 1 ml standardov s koncentracijami 0, 0.078, 0.156 in 0.625  $\mu\text{mol/l}$ . Način priprave standardov je prikazan v preglednici IV. Nato smo po 1000  $\mu\text{l}$  plazme in posameznih standardov obdelali po postopku za določanje prostega MDA, opisanem v 3.2.1, le da smo spreminjali število ekstrakcij. Povečali smo tudi volumne vseh ostalih reagentov. Način priprave vzorcev za analizo je prikazan v preglednici VII.

Derivatizacija je potekala v 14 ml plastičnih epruvtah. Ekstrakcijo smo izvedli z dvakrat, trikrat ali štirikrat po 2.5 ml heksana. Heksanske frakcije smo prenesli v 2 ml plastične epruvete in jih v aparaturi TURBOVAP sušili do suhega.

Vzorce smo analizirali pod pogoji, navedenimi v 3.2.1, s to razliko, da smo injicirali po 80  $\mu\text{l}$  vzorca. Delali smo v eni paralelki. Pri poskusu s trikratno ekstrakcijo, smo delali le s standardi s koncentracijo 0 in 0.156  $\mu\text{mol/l}$  in s plazmo.

**Preglednica VII:** Priprava vzorcev z začetnim volumnom 1000  $\mu$ l in različnim številom ekstrakcij.

<b>volumen standarda ali plazme (<math>\mu</math>l)</b>	1000	1000	1000
<b>volumen HClO<sub>4</sub> (<math>\mu</math>l)</b>	500	500	500
<b>odvzem supernatanta (<math>\mu</math>l)</b>	1000	1000	1000
<b>volumen DNPH (<math>\mu</math>l)</b>	100	100	100
<b>dodatek heksana (ml)</b>	2x2.5	3x2.5	4x2.5
<b>odvzem heksanske frakcije (ml)</b>	1. 1.8 2. 2.0	1. 1.8 2. 2.0 3. 2.0	1. 2.0 2. 2.5 3. 2.5 4. 2.5
<b>volumen MF za rekonstitucijo (<math>\mu</math>l)</b>	100	100	100

### 3.2.4 Validacija DNPH metode za določanje celokupnega MDA

Metodo smo validirali v skladu z FDA smernicami za validacijo bioanaliznih metod.

#### Določanje izkoristka ekstrakcije

##### *Priprava standardov MDA*

V 1.5 ml plastičnih epruvetkah smo pripravili po 1 ml standardov MDA z določenimi koncentracijami. Način priprave je prikazan v preglednici VIII.

**Preglednica VIII:** Priprava standardov MDA za določanje izkoristka ekstrakcije.

<b>c<sub>ST</sub> (<math>\mu</math>mol/l)</b>	<b>50 <math>\mu</math>M ORII (<math>\mu</math>l)</b>	<b>1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (<math>\mu</math>l)</b>
3	60	940
15	300	700
30	600	400

##### *Postopek*

Na osnovi predhodnih poskusov smo z DNPH metodo določili, da je koncentracija celokupnega MDA v plazmi A približno 3  $\mu$ mol/l. Odločili smo se, da bomo k 225  $\mu$ l plazme A dodali približno po 10, 50 in 100% določene koncentracije MDA. 225  $\mu$ l plazme smo izbrali zato, da smo po dodatku 25  $\mu$ l standarda, obdržali začetni volumen vzorca 250  $\mu$ l. Tako nam ni bilo treba spreminjati volumna ali koncentracij ostalih reagentov.

Za določitev izkoristka ekstrakcije smo najprej pripravili vzorce s standardi. V 1.5 ml plastičnih epruvetkah smo k 225  $\mu$ l 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dodali 25  $\mu$ l 3, 15 in 30  $\mu$ M standardov MDA. Vzorce smo pripravili v eni paralelki. Nato smo pripravili še vzorce s plazmo, tako da smo v 1.5 ml plastičnih epruvetkah k 225  $\mu$ l plazme A dodali 25  $\mu$ l 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oziroma enak volumen 3, 15 in 30  $\mu$ M standardov MDA. Te vzorce smo pripravili v treh

paralelkah. Vse pripravljene vzorce smo obdelali po postopku za določanje celokupnega MDA, opisanem v 3.2.1 in jih analizirali pod pogoji, prav tako navedenimi v 3.2.1.

### **Določanje linearnosti, območja linearnosti, ponovljivosti, točnosti, meje kvantifikacije ter stabilnosti**

Najprej smo pripravili 50  $\mu\text{M}$  ORII po postopku opisanem v 3.2.1. Nato smo v 1.5 ml plastičnih epruvetkah pripravili po 1 ml standardov (ST) MDA za umeritveno krivuljo s koncentracijami 0, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5 in 10  $\mu\text{mol/l}$ . Način priprave je prikazan v preglednici IV.

Pripravili smo tudi po 1 ml standardov za kontrolo analizne metode (QC vzorci). Način priprave je prikazan v preglednici IX. QC vzorci vsebujejo znano količino analita. Za študijo se uporabijo najmanj tri različne koncentracije, ki pokrivajo celotno območje umeritvene krivulje: ena znotraj trikratne vrednosti meje kvantifikacije (QCl), ena blizu srednje (QCm) in ena blizu zgornje vrednosti v umeritveni krivulji (QCh). Koncentracije so izbrane tako, da ne sovpadajo s standardi oz. točkami, iz katerih izhaja umeritvena krivulja.

**Preglednica IX:** Priprava QC vzorcev za kontrolo analizne metode.

	$c_{\text{QC}}$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	50 $\mu\text{M}$ ORII ( $\mu\text{l}$ )	1.5 $\mu\text{mol/l}$ QCm ( $\mu\text{l}$ )	1% $\text{H}_2\text{SO}_4$ ( $\mu\text{l}$ )
<b>QCh</b>	7.5	150	-	850
<b>QCm</b>	1.5	30	-	970
<b>QCl</b>	0.468	-	312	688

Standarde in QC-je smo obdelali po postopku za določanje celokupnega MDA, opisanem v 3.2.1 in jih analizirali pod pogoji, prav tako navedenimi v 3.2.1. Validacijo smo izvedli v treh zaporednih dneh. Standarde in QC-je smo pripravili vsak dan na novo iz iste ORII, kot smo jo pripravili prvi dan. Najprej smo analizirali standarde od najnižje proti najvišji koncentraciji, zatem pa še QC-je.

### **Linearnost**

Linearnost je sposobnost analizne metode, da znotraj določenega območja daje odzive, ki so premosorazmerni s koncentracijo analita v vzorcu. Za določitev linearnosti potrebujemo slepi vzorec in vsaj šest standardov, ki pokrivajo pričakovano koncentracijsko območje, vključno z mejo kvantifikacije. Linearnost ovrednotimo s primerno statistično metodo, na

primer z metodo najmanjše vsote kvadratov odstopanj. Iz dobljenih rezultatov določimo regresijsko premico, ki ima enačbo  $y = k \cdot x + n$ , pri čemer je  $y$  intenziteta odziva, za kar smo izbrali površino kromatografskih vrhov,  $x$  koncentracija analita,  $n$  odsek na ordinati in  $k$  naklon premice. Korelacijo med koncentracijo in odzivom podajamo s Pearsonovim koeficientom ( $r$ ) oziroma determinacijskim koeficientom ( $r^2$ ). Dovoljena odstopanja pri koncentracijah vzorcev so 15% oziroma 20% pri meji kvantifikacije. Najmanj štirje od šestih standardov, vključno z mejo kvantifikacije in najvišjo koncentracijo, morajo ustrezati danim zahtevam (25).

### **Ponovljivost**

Ponovljivost je sposobnost analizne metode, da daje vedno enake rezultate pri istem homogenem vzorcu. Ovrednotimo jo s standardnim odkromom (SD) in koeficientom variacije (CV) (%). Koeficient variacije ne sme biti večji od 15%, pri meji kvantifikacije pa ne večji od 20%. Za določanje smo uporabili QC vzorce (po pet vzorcev za vsako koncentracijo) (25). Določili smo znotrajdnevno in meddnevno ponovljivost za tri dni.

### **Točnost**

Točnost je sposobnost analizne metode, da določi pravo vrednost oziroma da izmerjena vrednost signifikantno ne odstopa od dejanske. Točnost določamo z vzorci, ki vsebujejo znano količino analita. Uporabimo najmanj tri različne koncentracije, ki pokrivajo pričakovano koncentracijsko območje (QC vzorci). Za vsako koncentracijo pripravimo pet vzorcev in jih analiziramo. Povprečje določenih vrednosti, ki jih izračunamo iz odzivov s pomočjo enačbe umeritvene krivulje, mora biti znotraj 15% prave vrednosti, razen pri meji kvantifikacije, kjer odstopanje ne sme biti večje od 20%. Za vrednotenje točnosti se uporablja odstopanje povprečja določenih vrednosti od pravih (25).

### **Območje linearnosti**

Metoda je linearna v območju, v katerem določene koncentracije ne odstopajo od pričakovanih za več kot 15% oz. pri meji kvantifikacije za več kot 20% (25).

### **Meja kvantifikacije (LOQ)**

Po FDA smernicah, najnižji standard v umeritveni premici ustreza meji kvantifikacije, če ustreza naslednjim merilom:

- odziv analita pri meji kvantifikacije je vsaj petkrat večji od odziva slepega vzorca,
- vrh oz. odziv analita mora imeti ponovljivost znotraj 20% in točnost 80-120% (25).

### **Stabilnost**

Določali smo postpreparativno stabilnost (ang. *post-preparative stability*), to je stabilnost pripravljenih vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku (25). Za določanje smo uporabili eno paralelko plazemskih vzorcev konj K1-K4, ki so bili odvzeti 0 ur po fizični obremenitvi, in eno paralelko QC vzorcev. QC vzorce smo prvič analizirali isti dan, kot smo jih pripravili. Nato smo jih pustili stati v avtomatskem vzorčevalniku pri 5°C in jih analizirali še 24 in 48 ur po prvi analizi. Plazemske vzorce konj pa smo analizirali na enak način le, da smo njihovo stabilnost spremljali po 12 in 23 urah.

### **3.2.5 Validacija TBA metode**

Metodo smo validirali v skladu z FDA smernicami za validacijo bioanaliznih metod.

### **Določanje izkoristka ekstrakcije**

#### *Priprava standardov MDA*

V 1.5 ml plastičnih epruvetkah smo pripravili po 1 ml standardov MDA z določenimi koncentracijami. Način priprave je prikazan v preglednici X.

**Preglednica X:** Priprava standardov MDA za določanje izkoristka ekstrakcije.

<b>c<sub>ST</sub> (μmol/l)</b>	<b>50 μM ORII (μl)</b>	<b>2 μmol/l ST (μl)</b>	<b>PBS (μl)</b>
0.2	-	100	900
1.0	-	500	500
2.0	40	-	960

#### *Postopek*

Na osnovi predhodnih poskusov smo določili, da je koncentracija MDA v plazmi A, določena s TBA metodo, približno 0.20 μmol/l. Odločili smo se, da bomo k 225 μl plazme A dodali približno po 10, 50 in 100% določene koncentracije MDA. 225 μl plazme smo izbrali zato, da smo po dodatku 25 μl standarda oziroma 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, obdržali začetni volumen vzorca 250 μl. Tako nam ni bilo treba spreminjati volumna ali koncentracij ostalih reagentov.

Za določitev izkoristka ekstrakcije smo najprej pripravili vzorce s standardi. V 1.5 ml plastičnih epruvetkah smo k 225 μl 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> dodali 25 μl 0.2, 1.0 in 2.0 μM standardov

MDA. Vzorce smo pripravili v eni paralelki. Nato smo pripravili še vzorce s plazmo, tako da smo v 1.5 ml plastičnih epruvtkah k 225  $\mu$ l plazme A dodali 25  $\mu$ l 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oziroma enak volumen 0.2, 1.0 in 2.0  $\mu$ M standardov MDA. Te vzorce smo pripravili v treh paralelkah. Vse pripravljene vzorce smo obdelali po postopku za določanje MDA, opisanem v 3.2.2 in jih analizirali pod pogoji, prav tako navedenimi v 3.2.2.

### **Določanje linearnosti, območja linearnosti, meje kvantifikacije ter stabilnosti**

Najprej smo pripravili 50  $\mu$ M ORII po postopku opisanem v 3.2.1. Nato smo v 1.5 ml plastičnih epruvtkah pripravili po 1 ml standardov (ST) MDA za umeritveno krivuljo s koncentracijami od 0 do 10  $\mu$ mol/l. Način priprave je prikazan v preglednici V.

Standarde smo obdelali po postopku za določanje MDA s TBA metodo, opisanem v 3.2.2 in jih analizirali pod pogoji, prav tako navedenimi v 3.2.2. Validacijo smo izvedli v treh zaporednih dneh. Standarde smo pripravili vsak dan na novo iz iste ORII, kot smo jo pripravili prvi dan. Standarde smo analizirali od najnižje proti najvišji koncentraciji.

### **Stabilnost**

Določali smo postpreparativno stabilnost (ang. *post-preparative stability*), to je stabilnost pripravljenih vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku (25). Za določanje smo uporabili po dve paralelki vzorcev, ki smo jih pripravili iz 225  $\mu$ l plazme A in 25  $\mu$ l 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oziroma 25  $\mu$ l 3, 15 in 30  $\mu$ M standardov MDA. Vzorce smo prvič analizirali takoj, ko smo jih pripravili. Nato smo jih pustili stati v avtomatskem vzorčevalniku pri 5°C in jih analizirali še 1.5 ure in 19 ur po prvi analizi.

### ***3.2.6 Meritve MDA v plazmi konj***

#### **Meritve celokupnega MDA s HPLC z DNPH metodo**

Vzorce konj K1-K10 odvzetih pred fizično obremenitvijo ter 0 ur, 24 ur in 48 ur po fizični obremenitvi smo obdelali DNPH metodo za določanje celokupnega MDA, opisano v 3.2.1. Zaradi pomanjkanja plazme smo pri pripravi vzorca namesto 250  $\mu$ l uporabili 200  $\mu$ l plazme, ki smo ji dodali 50  $\mu$ l 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Ostali koraki so ostali nespremenjeni. Na enak način smo naredili tudi umeritveno premico. Vzorce smo analizirali pod pogoji, opisanimi

v 3.2.1. Ker vedno nismo imeli dovolj plazme, smo za vsak vzorec naredili le dve paralelki.

### **Meritve MDA s TBA metodo**

Vzorci konj K1-K10 odvzetih pred fizično obremenitvijo ter 0 ur, 24 ur in 48 ur po fizični obremenitvi smo obdelali s TBA metodo po postopku, opisanem v 3.2.2. Vzorce smo analizirali pod pogoji, prav tako opisanimi v 3.2.2. Zaradi pomanjkanja plazme smo naredili le dve paralelki.

### **Meritve prostega MDA z LC-MS/MS z DNPH metodo**

*Določitev območja linearnosti in meje kvantifikacije za DNPH LC-MS/MS metodo*

Metode DNPH za določanje proste oblike MDA z LC-MS/MS detekcijo nismo validirali. Preverili smo le območje linearnosti (0.0195-2.5  $\mu\text{mol/l}$ ) in ocenili limito kvantifikacije.

*Meritve proste oblike v plazmi konj*

Vzorci konja K5 odvzete pred treningom in 0, 24 ter 48 ur po treningu smo obdelali z DNPH metodo za določanje prostega MDA, opisano v 3.2.1. Za analizo in detekcijo vzorcev smo uporabili tekočinsko kromatografijo sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Namesto 250  $\mu\text{l}$  plazme smo delali z 200  $\mu\text{l}$  plazme, ki smo ji dodali 50  $\mu\text{l}$  1%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Delali smo v dveh paralelkah.

### ***Metoda LC***

Uporabili smo LC sistem Agilent 1290 Infinity. Analizo smo izvajali na koloni Kinetex C18 (50 x 2.1 mm, velikost delcev 5  $\mu\text{m}$ ). Injicirali smo 5  $\mu\text{l}$  vzorca, avtomatski vzorčevalnik pa je bil ohlajen na 4°C. Pretok MF na koloni je bil 0.5 ml/min. MF je bila sestavljena iz topila A, ki ga je predstavljala 0.1% mravljinčna kislina, in topila B, ki ga je predstavljal acetonitril. Obe topili smo pred analizo razplinjevali v ultrazvočni kadički. Imeli smo gradientno elucijo po shemi:

t (min)	delež topila B (%)
0	30
2	50
2.05	30

Čas analize je znašal 2.6 min.



**Metoda MS/MS**

Uporabili smo masni analizator Agilent 6460 s trojnim kvadrupolnim MS/MS analizatorjem. Za metodo ionizacije smo uporabili ionizacijo z razprševanjem raztopin v električnem polju oziroma elektrorazprševalno ionizacijo - ESI (ang. *electrospray ionization*). Pri kvantifikaciji smo spremljali prehod 235.1 (pirazolska oblika MDA-DNPH produkta) v 159.2 (fragmentacija z odcepom NO<sub>2</sub> in NO skupine) in za odziv jemali odziv ionov 159.2.

Nastavitve masnega analizatorja so podane v preglednici XI.

**Preglednica XI:** Nastavitve masnega analizatorja.

Sušilni plin	300°C, 5 l/min
Nebulizacijski plin	45 psi
Jetstream® plin	320°C, 11 l/min
Napetost na kapilari	3500 V
Nozzle voltage®	500 V
MDA: SRM prehod, Kolizijska energija (CE), Fragmentor (FR)	235.1→159.2; CE 20 eV; FR 100 V

SRM prehod: spremljanje zgolj starševskega in hčerinskega iona (ang. *selected reaction monitoring*).

## 4 REZULTATI

### 4.1 OPTIMIZACIJA DNPH METODE

#### A. Optimizacija DNPH metode za določanje celokupne oblike MDA v plazmi

##### 4.1.1 Zamenjava steklenih epruвет z 1.5 ml plastičnimi epruветkami

Zaradi manjšega volumna plastičnih epruветk (1.5 ml) napram steklenim epruветam (12 ml) smo morali prilagoditi fazo sušenja ekstrahiranih vzorcev. Tako smo po vsakem prenosu heksanske frakcije v plastične epruветke, frakcije najprej posušili in jim šele nato dodali naslednjo heksansko frakcijo. Za razliko od Šparakl (24), kjer sušijo združene heksanske frakcije v steklenih epruветah. Način sušenja je opisan v 3.2.1 v postopku za pripravo vzorcev za določanje celokupnega MDA.

##### 4.1.2 Volumen mobilne faze za rekonstitucijo

Volumen MF za rekonstitucijo smo spreminjali z 200  $\mu$ l na 100  $\mu$ l in 80  $\mu$ l. Rezultati so prikazani v preglednicah XII in XIII.

**Preglednica XII:** Rezultati analize standardov s koncentracijami 0, 0.156, 0.625 in 2.5  $\mu$ mol/l, ki smo jih rekonstituirali z 200 in 100  $\mu$ l MF.

c <sub>ST</sub> ( $\mu$ mol/l)	volumen MF za rekonstitucijo ( $\mu$ l)		razmerje površin PD-MDA (100)/PD-MDA (200)
	200	100	
	PD-MDA (200)	PD-MDA (100)	
0	0.11	0.26	2.36
0.156	1.0	2.3	2.30
0.625	3.5	8.6	2.39
2.5	14.8	34.6	2.34

**Preglednica XIII:** Rezultati analize standardov s koncentracijami 0, 0.156, 0.625 in 2.5  $\mu$ mol/l, ki smo jih rekonstituirali s 100 in 80  $\mu$ l MF.

c <sub>ST</sub> ( $\mu$ mol/l)	volumen MF za rekonstitucijo ( $\mu$ l)		razmerje površin PD-MDA (80)/PD-MDA (100)
	100	80	
	PD-MDA (100)	PD-MDA (80)	
0	1.4 <sup>♦</sup>	2.5	1.79
0.156	11.6 <sup>♦</sup>	4.7	0.41
0.625	14.3	17.4	1.22
2.5	51.2	63.8	1.25

<sup>♦</sup> Vrhova na kromatogramu sta bila nesimetrična, zato smo težko določili njuno pravilno površino.

## B. Optimizacija DNPH metode za določanje proste oblike MDA v plazmi

### 4.1.3 Volumen plazme

Začetni volumen plazme, 250  $\mu\text{l}$ , smo povečevali na 500, 750 in 1000  $\mu\text{l}$ . Rezultati analize standardov in plazme so prikazani v preglednicah XIV, XV, XVI in XVII.

**Preglednica XIV:** Rezultati analize standardov in plazme z začetnim volumnom 250  $\mu\text{l}$ , ki smo jih obdelali na način, opisan v poglavju 3.2.3.

	$c_{\text{ST}} (\mu\text{mol/l})$				$V_{\text{plazme}} (\mu\text{l})$
	0	0.156	0.625	2.5	250
<b>PD-MDA</b>	1.1	3.0	8.5	28.2	1.4

**Preglednica XV:** Rezultati analize standardov in plazme z začetnim volumnom 500  $\mu\text{l}$ , ki smo jih obdelali na način, opisan v poglavju 3.2.3.

	$c_{\text{ST}} (\mu\text{mol/l})$				$V_{\text{plazme}} (\mu\text{l})$
	0	0.156	0.625	2.5	500
<b>PD-MDA</b>	0.28	0.8	2.4	7.4	0.3

**Preglednica XVI:** Rezultati analize standardov in plazme z začetnim volumnom 750  $\mu\text{l}$ , ki smo jih obdelali na način, opisan v poglavju 3.2.3.

	$c_{\text{ST}} (\mu\text{mol/l})$				$V_{\text{plazme}} (\mu\text{l})$
	0	0.156	0.625	2.5	750
<b>PD-MDA</b>	1.0	2.9	7.8	26.4	1.3

**Preglednica XVII:** Rezultati analize standardov in plazme z začetnim volumnom 1000  $\mu\text{l}$ , ki smo jih obdelali na način, opisan v poglavju 3.2.3.

	$c_{\text{ST}} (\mu\text{mol/l})$				$V_{\text{plazme}} (\mu\text{l})$
	0	0.156	0.625	2.5	1000
<b>PD-MDA</b>	3.4	9.5	26.5	87.0	3.8

### 4.1.4 Število ekstrakcij

Pri vzorcih z začetnim volumnom 1000  $\mu\text{l}$  smo spreminjali število ekstrakcij z dvakrat na trikrat in štirikrat. Rezultati analize standardov in plazme so prikazani v preglednicah XVIII, XIX in XX.

**Preglednica XVIII:** Rezultati analize standardov in plazme z začetnim volumnom 1000  $\mu\text{l}$  in dvakratno ekstrakcijo.

	$c_{\text{ST}} (\mu\text{mol/l})$				plazemski vzorec
	0	0.078	0.156	0.625	
<b>PD-MDA</b>	3.4	7.6	11.4	40.8	3.8

**Preglednica XIX:** Rezultati analize standardov in plazme z začetnim volumnom 1000  $\mu\text{l}$  in trikratno ekstrakcijo.

	c <sub>ST</sub> ( $\mu\text{mol/l}$ )		plazemski vzorec
	0	0.156	
<b>PD-MDA</b>	4.8	17.9	6.2

**Preglednica XX:** Rezultati analize standardov in plazme z začetnim volumnom 1000  $\mu\text{l}$  in štirikratno ekstrakcijo.

	c <sub>ST</sub> ( $\mu\text{mol/l}$ )				plazemski vzorec
	0	0.078	0.156	0.625	
<b>PD-MDA</b>	21.8	35.7	42.5	123.0	18.8

## 4.2 VALIDACIJA DNPH METODE ZA DOLOČANJE CELOKUPNEGA MDA

### 4.2.1 Izkoristki ekstrakcije

Izkoristke ekstrakcije smo določali po postopku opisanem v poglavju 3.2.4. Rezultati so prikazani v preglednicah XXI, XXII in XXIII.

**Preglednica XXI:** Rezultati analize 225  $\mu\text{l}$  plazme A, ki smo ji dodali 25  $\mu\text{l}$  1%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  oziroma enak volumen posameznega standarda (n=3).

c <sub>ST</sub> ( $\mu\text{mol/l}$ )	PD-MDA			
	1. paralelka	2. paralelka	3. paralelka	povprečje $\pm$ SD
0	31.8	27.2	27.4	28.8 $\pm$ 2.6
3	25.4	40.5	28.2	31.4 $\pm$ 8.0
15	38.9	40.5	37.0	38.8 $\pm$ 1.8
30	40.2	46.2	50.8	45.7 $\pm$ 5.3

**Preglednica XXII:** Rezultati analize vzorcev, ki smo jih dobili z dodatkom 25  $\mu\text{L}$  posameznega standarda k 225  $\mu\text{L}$  1%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

c <sub>ST</sub> ( $\mu\text{mol/l}$ )	3	15	30
<b>PD-MDA</b>	3.9	13.7	25.9

**Preglednica XXIII:** Izračun izkoristka ekstrakcije za tri koncentracije standardov, ki smo jih dodajali k 225  $\mu\text{l}$  plazme A.

c <sub>ST</sub> ( $\mu\text{mol/l}$ )	PD-MDA (dobljena) <sup>a</sup>	PD-MDA (prava) <sup>b</sup>	Izkoristek= $\frac{\text{PD-MDA (dobljena)}}{\text{PD-MDA (prava)}}$
3	31.4	32.7	96.0
15	38.8	42.5	91.3
30	45.7	54.7	83.5

<sup>a</sup> Povprečna površina D-MDA, dobljena pri analizi 225  $\mu\text{l}$  plazme A, ki smo ji dodali 25  $\mu\text{l}$  standarda z ustrežno koncentracijo (preglednica XXI).

<sup>b</sup> Seštevek povprečne površine D-MDA, dobljene pri analizi 225  $\mu\text{l}$  plazme A, ki smo ji dodali 25  $\mu\text{l}$  1%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (preglednica XXI), in površine D-MDA, dobljene pri analizi 225  $\mu\text{l}$  1%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , ki smo ji dodali 25  $\mu\text{l}$  standarda z ustrežno koncentracijo (preglednica XXII).

#### 4.2.2 Linearnost

Za določanje linearnosti smo pripravili standarde MDA s koncentracijami od 0 do 10  $\mu\text{mol/l}$ , tako kot je opisano v poglavju 3.2.4. Način obdelave in analize standardov je prav tako naveden v poglavju 3.2.4. Postopek smo ponovili vse tri dni validacije. Rezultati analize so prikazani v preglednici XXIV.

**Preglednica XXIV:** Rezultati analize standardov MDA.

$c_{ST}$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	Pd-MDA		
	1. dan	2. dan	3. dan
0	1.5	3.5	3.7
0.156	3.2	4.8	4.0
0.313	4.5	6.1	5.1
0.625	7.9	8.2	8.0
1.25	11.1	14.6	13.4
2.5	21.8	23.1	21.3
5	42.7	41.5	41.7
10	81.3	83.2	82.4

Iz koncentracij standardov in odzivov smo določili enačbe dnevnih umeritvenih premic:

- 1. dan:  $y=7.9678x+1.9858$ ;  $r^2=0.9995$
- 2. dan:  $y=7.8998x+3.5296$ ;  $r^2=0.9992$
- 3. dan:  $y=7.8978x+2.8595$ ,  $r^2=0.9993$

Iz dnevnih odzivov smo za vse standarde izračunali še meddnevna povprečja in na njihovi osnovi določili enačbo meddnevne umeritvene premice:

- $y=7.9218x+2.7916$ ;  $r^2=0.9999$

Točnost umeritvene premice za posamezen dan je prikazana v preglednici XXV. Odebeljena vrednost odstopa več, kot je dovoljeno po smernicah.

**Preglednica XXV:** Točnost odzivov derivata MDA za posamezen dan.

c <sub>ST</sub> (μmol/l)	točnost (%)		
	1. dan	2. dan	3. dan
0	-	-	-
0.156	97.7	103.1	92.6
0.313	100.8	104.0	90.6
0.625	<b>118.8</b>	94.6	104.1
1.25	91.5	112.1	106.8
2.5	99.5	99.1	93.4
5	102.2	96.1	98.4
10	99.5	100.9	100.7

#### 4.2.3 Ponovljivost metode

Določili smo znotrajdnevno in meddnevno ponovljivost. Uporabili smo QC vzorce, ki smo jih pripravili po postopku opisanem v 3.2.4. Za vsako koncentracijo smo pripravili pet paralelk. Ponovljivost metode smo nato ovrednotili s standardnim odklikom (SD) in koeficientom variacije (CV) (%). Rezultati so prikazani v preglednicah XXVI, XXVII in XXVIII.

**Preglednica XXVI:** Rezultati analize QC vzorcev.

QC vzorci	1. dan			2. dan			3. dan		
	QCl	QCm	QCh	QCl	QCm	QCh	QCl	QCm	QCh
Pd-MDA	6.4	14.6	68.0	6.7	15.2	68.7	6.5	16.3	66.5
	6.4	13.5	60.3	6.9	14.9	65.6	7.0	16.1	67.8
	6.3	17.0	68.8	6.6	15.7	65.1	7.1	16.0	67.2
	6.7	15.6	71.9	6.6	16.0	65.3	7.5	16.3	67.3
	6.1	15.7	66.7	6.7	15.4	65.2	7.0	16.0	69.9

**Preglednica XXVII:** Znotrajdnevna ponovljivost analize metode.

QC vzorci	Pd-MDA					
	1. dan		2. dan		3. dan	
	povprečje±SD	CV (%)	povprečje±SD	CV (%)	povprečje±SD	CV (%)
QCl	6.4 ± 0.22	3.4	6.7 ± 0.12	1.8	7.0 ± 0.36	5.1
QCm	15.3 ± 1.3	8.6	15.4 ± 0.43	2.8	16.1 ± 0.15	0.94
QCh	67.1 ± 4.3	6.4	66.0 ± 1.5	2.3	67.7 ± 1.3	1.9

**Preglednica XXVIII:** Meddnevna ponovljivost analize metode.

QC vzorci	Pd-MDA	
	meddnevno povprečje±SD	CV (%)
QCl	6.7 ± 0.32	4.8
QCm	15.6 ± 0.46	2.9
QCh	67.0 ± 0.89	1.3

#### 4.2.4 Točnost

Za določanje točnosti smo prav tako uporabili QC vzorce. Določili smo dnevno in meddnevno točnost.

Za določitev dnevne točnosti smo najprej za vsako koncentracijo iz dnevnih odzivov izračunali povprečje. Nato smo iz teh povprečij iz dnevnih umeritvenih premic izračunali koncentracije in določili odstotek ujemanja z dejanskimi koncentracijami analiziranih QC vzorcev. Dnevna točnost je prikazana v preglednici XXIX.

Za določitev meddnevne točnosti pa smo za vsako koncentracijo iz dnevnih povprečij odzivov izračunali meddnevna povprečja in na njihovi osnovi iz meddnevne umeritvene premice izračunali koncentracije. Te koncentracije smo primerjali z dejanskimi in določili odstotek ujemanja. Meddnevna točnost je prikazana v preglednici XXX.

**Preglednica XXIX:** Dnevna točnost analizne metode.

QC vzorci	1. dan			2. dan			3. dan		
	QCl	QCm	QCh	QCl	QCm	QCh	QCl	QCm	QCh
točnost (%)	118.4	105.5	110.5	85.8	98.5	110.0	98.5	113.5	107.4
	118.4	96.3	97.6	91.2	97.0	104.8	112.0	111.8	109.6
	115.7	125.6	111.8	83.1	102.7	103.9	114.7	110.9	108.6
	126.4	113.9	117.0	83.1	105.2	104.3	125.6	113.5	108.8
	110.3	114.8	108.3	85.8	100.2	104.1	112.0	110.9	113.2
<b>povprečje točnosti (%)</b>									
	117.8	111.2	109.0	85.8	100.5	105.4	112.6	112.1	109.5

**Preglednica XXX:** Meddnevna točnost analizne metode.

QC vzorci	QCl	QCm	QCh
točnost (%)	105.4	108.0	108.0

#### 4.2.5 Območje linearnosti

Analizna metoda je linearna v območju od 0.156 do 10  $\mu\text{mol/l}$ . V tem območju namreč koncentracije, ki jih določimo s to metodo, ne odstopajo od pričakovanih za več kot 15% oz. pri meji kvantifikacije za več kot 20%.

#### 4.2.6 Meja kvantifikacije (LOQ)

Limito kvantifikacije po FDA smernicah predstavlja najnižji standard iz umeritvene krivulje, katerega ponovljivost je znotraj 20%, točnost med 80-120%, njegov odziv pa je najmanj petkrat višji od odziva slepega vzorca. Zahtevam po ponovljivosti in točnosti je

vse dni zadostil že standard s koncentracijo 0.156  $\mu\text{mol/l}$ . Ko smo upoštevali še zahtevo, da mora biti odziv standarda najmanj petkrat višji od odziva slepega vzorca, pa je bil prvi dan to standard s koncentracijo 0.625  $\mu\text{mol/l}$ , drugi in tretji dan pa standard s koncentracijo 2.5  $\mu\text{mol/l}$ .

#### 4.2.7 Stabilnost

Postpreparativno stabilnost smo določali po postopku opisanem v poglavju 3.2.4. Rezultati so prikazani v preglednicah XXXI in XXXII.

**Preglednica XXXI:** Postpreparativna stabilnost QC vzorcev.

QC vzorci	čas analize	p <sub>D</sub> -MDA	sprememba p <sub>D</sub> -MDA glede na t <sub>0</sub> (%)
QC1	t <sub>0</sub>	6.1	-
	t <sub>24</sub>	6.5	+6.6
	t <sub>48</sub>	6.6	+8.2
QCm	t <sub>0</sub>	15.7	-
	t <sub>24</sub>	16.0	+1.9
	t <sub>48</sub>	17.1	+8.9
QCh	t <sub>0</sub>	66.7	-
	t <sub>24</sub>	71.5	+7.2
	t <sub>48</sub>	72.6	+8.9

**Preglednica XXXII:** Postpreparativna stabilnost plazemskih vzorcev konj.

plazma konj	čas analize	p <sub>D</sub> -MDA	sprememba p <sub>D</sub> -MDA glede na t <sub>0</sub> (%)
K1	t <sub>0</sub>	17.6	-
	t <sub>12</sub>	17.7	-0.57
	t <sub>23</sub>	17.4	-1.1
K2	t <sub>0</sub>	16.8	-
	t <sub>12</sub>	16.6	+1.2
	t <sub>23</sub>	15.9	+5.4
K3	t <sub>0</sub>	17.2	-
	t <sub>12</sub>	16.1	-6.4
	t <sub>23</sub>	15.3	-11.1
K4	t <sub>0</sub>	23.1	-
	t <sub>12</sub>	21.1	+8.7
	t <sub>23</sub>	20.5	+11.3



### 4.3 VALIDACIJA TBA METODE

#### 4.3.1 Izkoristki ekstrakcije

Izkoristke ekstrakcije smo določali po postopku opisanem v poglavju 3.2.5. Rezultati so prikazani v preglednicah XXXIII, XXXIV in XXXV.

**Preglednica XXXIII:** Rezultati analize 225  $\mu$ l plazme A, ki smo ji dodali 25  $\mu$ l 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> oziroma enak volumen posameznega standarda (n=3).

c <sub>ST</sub> ( $\mu$ mol/l)	PD-MDA			
	1. paralelka	2. paralelka	3. paralelka	povprečje $\pm$ SD
0	0.36	0.36	0.38	0.37 $\pm$ 0.012
0.2	0.41	0.45	0.48	0.45 $\pm$ 0.035
1	0.49	0.61	0.53	0.54 $\pm$ 0.061
2	0.64	0.70	0.65	0.66 $\pm$ 0.032

**Preglednica XXXIV:** Rezultati analize vzorcev, ki smo jih dobili z dodatkom 25  $\mu$ L posameznega standarda k 225  $\mu$ L 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

c <sub>ST</sub> ( $\mu$ mol/l)	0.02	0.1	0.2
PD-MDA	0.24	0.35	0.53

**Preglednica XXXV:** Izračun izkoristka ekstrakcije za tri koncentracije standardov, ki smo jih dodajali 225  $\mu$ l plazme A.

c <sub>ST</sub> ( $\mu$ mol/l)	PD-MDA (dobljena) <sup>a</sup>	PD-MDA (prava) <sup>b</sup>	Izkoristek= $\frac{\text{PD-MDA (dobljena)}}{\text{PD-MDA (prava)}}$
0.2	0.45	0.61	73.8
1	0.54	0.72	75.0
2	0.66	0.90	73.3

<sup>a</sup> Povprečna površina D-MDA, dobljena pri analizi 225  $\mu$ l plazme A, ki smo ji dodali 25  $\mu$ l standarda z ustrežno koncentracijo (preglednica XXXIII).

<sup>b</sup> Seštevek povprečne površine D-MDA, dobljene pri analizi 225  $\mu$ l plazme A, ki smo ji dodali 25  $\mu$ l 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (preglednica XXXIII), in površine D-MDA, dobljene pri analizi 225  $\mu$ L 1% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, ki smo ji dodali 25  $\mu$ L standarda z ustrežno koncentracijo (preglednica XXXIV).

#### 4.3.2 Linearnost

Za določanje linearnosti smo pripravili standarde MDA s koncentracijami od 0 do 10  $\mu$ mol/l, tako kot je opisano v poglavju 3.2.5. Način obdelave in analize standardov je prav tako naveden v poglavju 3.2.5. Postopek smo ponovili vse tri dni validacije. Rezultati analize so prikazani v preglednici XXXVI.

**Preglednica XXXVI:** Rezultati analize standardov MDA.

c <sub>ST</sub> (μmol/l)	PD-MDA		
	1. dan	2. dan	3. dan
0	0.056	0.068	0.071
0.078	0.22	0.25	0.24
0.156	0.36	0.39	0.40
0.313	0.65	0.71	0.72
0.625	1.2	1.3	1.3
1.25	2.3	2.6	2.5
2.5	4.7	5.2	4.8
5	9.4	10.0	9.7
10	18.0	19.6	18.9

Iz koncentracij standardov in odzivov smo določili enačbe dnevnih umeritvenih premic:

- 1. dan:  $y=1.8043x+0.1045$ ;  $r^2=0.9996$
- 2. dan:  $y=1.9562x+0.1273$ ;  $r^2=0.9998$
- 3. dan:  $y=1.8853x+0.1191$ ,  $r^2=0.9999$

Iz dnevnih odzivov smo za vse standarde izračunali še meddnevna povprečja in na njihovi osnovi določili enačbo meddnevne umeritvene premice:

- $y=1.9260x+0.0760$ ;  $r^2=0.9999$

Točnost umeritvene premice za posamezen dan je prikazana v preglednici XXXVII.

**Preglednica XXXVII:** Točnost odzivov derivata MDA za posamezen dan.

c <sub>ST</sub> (μmol/l)	točnost (%)		
	1. dan	2. dan	3. dan
0	-	-	-
0.078	82.0	80.4	82.2
0.156	90.8	86.1	95.5
0.313	96.6	95.2	101.8
0.625	97.1	95.9	100.2
1.25	97.3	101.1	101.0
2.5	101.9	103.7	99.3
5	103.0	100.9	101.6
10	99.2	99.5	99.6

### 4.3.3 Območje linearnosti

Analizna metoda je linearna v območju od 0.078 do 10  $\mu\text{mol/l}$ . V tem območju namreč koncentracije, ki jih določimo s to metodo, ne odstopajo od pričakovanih za več kot 15% oz. pri meji kvantifikacije za več kot 20%.

### 4.3.4 Meja kvantifikacije (LOQ)

Kot limito kvantifikacije po FDA smernicah smo uporabili najnižji standard iz umeritvene krivulje, katerega točnost je bila med 80-120%, njegov odziv pa je bil najmanj petkrat višji od odziva slepega vzorca. Tem zahtevam je vse tri dni ustrezal standard s koncentracijo 0.156  $\mu\text{mol/l}$ .

### 4.3.5 Stabilnost

Postpreparativno stabilnost smo določali po postopku opisanem v poglavju 3.2.5. Rezultati so prikazani v preglednici XXXVIII.

**Preglednica XXXVIII:** Postpreparativna stabilnost vzorcev, ki smo jih dobili z dodatkom 25  $\mu\text{L}$  1%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  oziroma enakega volumna 3, 15 in 30  $\mu\text{M}$  standardov MDA k 225  $\mu\text{L}$  plazme A.

vzorec	čas analize	p <sub>D</sub> -MDA			sprememba p <sub>D</sub> -MDA glede na t <sub>0</sub> (%)
		1. paralelka	2. paralelka	povprečje $\pm$ SD	
225 $\mu\text{L}$ plazme A + 25 $\mu\text{L}$ 1% $\text{H}_2\text{SO}_4$	t <sub>0</sub>	0.56	0.60	0.58 $\pm$ 0.028	-
	t <sub>1.5</sub>	0.56	0.61	0.59 $\pm$ 0.035	+0.86
	t <sub>19</sub>	0.63	0.69	0.66 $\pm$ 0.042	+13.8
225 $\mu\text{L}$ plazme A + 25 $\mu\text{L}$ 3 $\mu\text{M}$ ST	t <sub>0</sub>	1.2	1.3	1.3 $\pm$ 0.071	-
	t <sub>1.5</sub>	1.2	1.4	1.3 $\pm$ 0.14	+4.0
	t <sub>19</sub>	1.2	1.4	1.3 $\pm$ 0.14	+4.0
225 $\mu\text{L}$ plazme A + 25 $\mu\text{L}$ 15 $\mu\text{M}$ ST	t <sub>0</sub>	3.1	3.3	3.2 $\pm$ 0.14	-
	t <sub>1.5</sub>	3.1	3.3	3.2 $\pm$ 0.14	0.0
	t <sub>19</sub>	3.3	3.5	3.4 $\pm$ 0.14	+6.3
225 $\mu\text{L}$ plazme A + 25 $\mu\text{L}$ 30 $\mu\text{M}$ ST	t <sub>0</sub>	5.7	6.3	6.0 $\pm$ 0.42	-
	t <sub>1.5</sub>	5.6	6.3	6.0 $\pm$ 0.50	-0.83
	t <sub>19</sub>	6.0	6.6	6.3 $\pm$ 0.42	+5.0

#### 4.4 MERITVE MDA V PLAZMI KONJ

##### 4.4.1 Določitev celokupne oblike MDA s HPLC z DNPH metodo

Rezultati analize plazemskih vzorcev konj K1-K10 so prikazani v preglednicah XXXIX in XL.

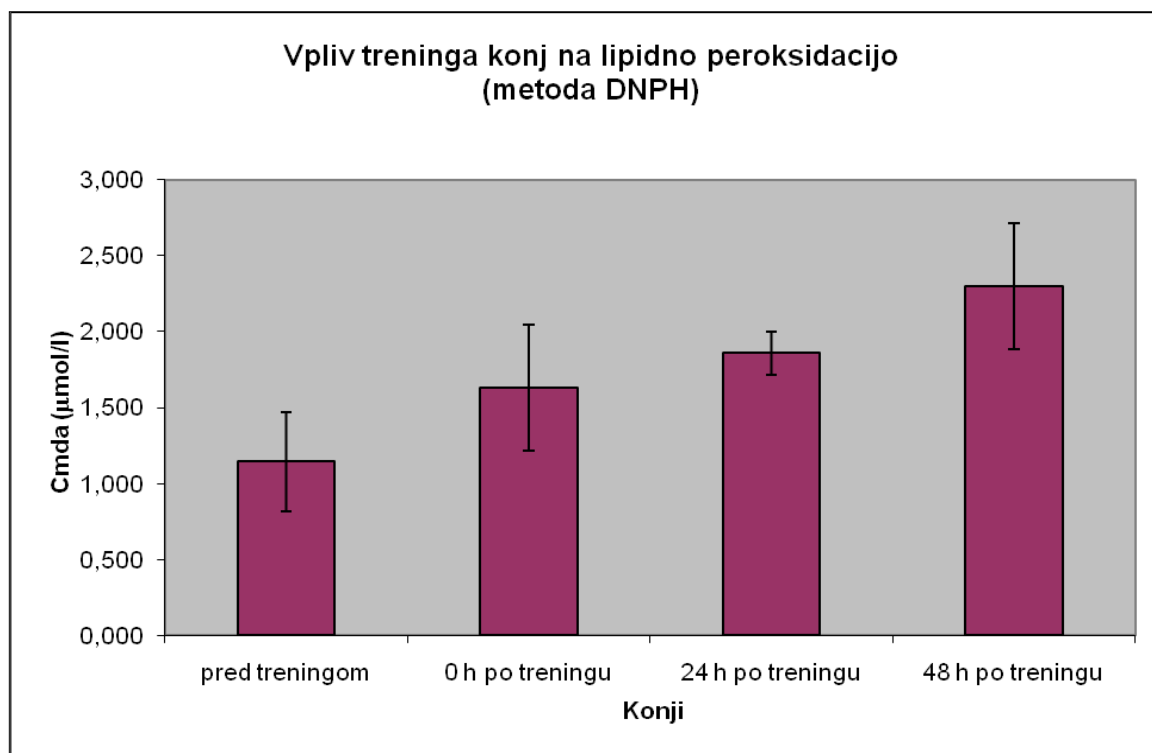
**Preglednica XXXIX:** Rezultati meritev MDA v plazmi konj K1-K10 pred treningom in 0 h, 24 h in 48 h po treningu.

konj	$c_{MDA}^a$ ( $\mu\text{mol/l}$ )			
	pred treningom	0 h po treningu	24 h po treningu	48 h po treningu
K1	1.14	0.88	1.59	2.06
K2	1.49	1.26	1.94	2.49
K3	1.16	2.12	1.85	2.07
K4	1.20	1.98	2.10	1.62
K5	1.76	2.06	2.01	2.84
K6	1.33	1.64	1.90	2.31
K7	0.92	1.84	1.71	2.05
K8	0.87	1.84	1.84	1.97
K9	0.89	1.47	1.84	2.68
K10	0.68	1.22	1.80	2.88

<sup>a</sup> Za vsakega konja je ob posameznem času podana povprečna vrednost dveh meritev.

**Preglednica XL:** Rezultati meritev MDA v plazmi konj K1-K10 pred treningom in 0 h, 24 h in 48 h po treningu, podani kot povprečje povprečnih vrednosti dveh meritev vseh konj s standardnim odklonom in koeficientom variacije.

vzorci	$c_{MDA}$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	SD	CV
pred treningom	1.14	0.324	28.3
0 h po treningu	1.63	0.413	25.3
24 h po treningu	1.86	0.143	7.68
48 h po treningu	2.30	0.416	18.1



**Slika 5:** Grafični prikaz povprečnih plazemskih koncentracij MDA v plazmi konj K1-K10 pred in 0 h, 24 h in 48 h po treningu. Analiza vzorcev z DNPH metodo za določanje celokupnega MDA.

#### 4.4.2 Določitev MDA s TBA metodo

Rezultati analize plazemskih vzorcev konj K1-K10 so prikazani v preglednicah XLI in XLII.

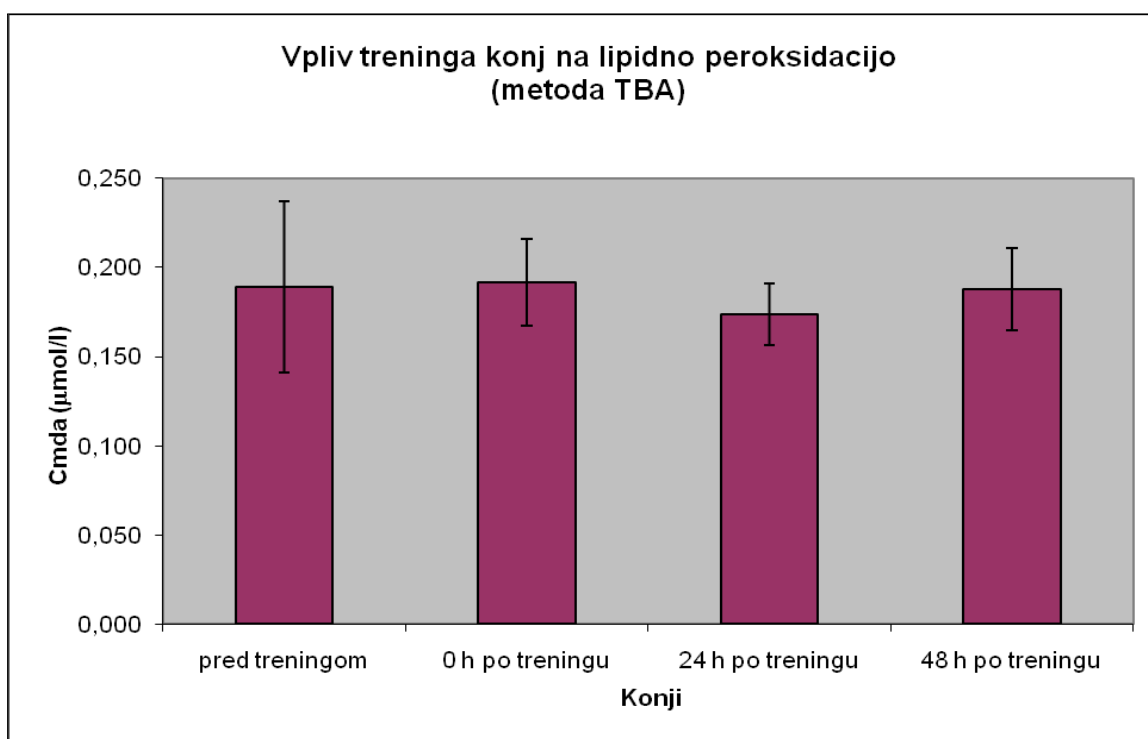
**Preglednica XLI:** Rezultati meritev MDA v plazmi konj K1-K10 pred treningom in 0 h, 24 h in 48 h po treningu.

konj	$c_{MDA}^a$ (µmol/l)			
	pred treningom	0 h po treningu	24 h po treningu	48 h po treningu
K1	0.176	0.157	0.157	0.191
K2	0.302	0.182	0.187	0.142
K3	0.118	0.196	0.164	0.194
K4	0.229	0.193	0.140	0.176
K5	0.172	0.180	0.173	0.196
K6	0.184	0.239	0.180	0.232
K7	0.184	0.164	0.183	0.188
K8	0.174	0.184	0.165	0.170
K9	0.164	0.216	0.188	0.191
K10	0.186	0.206	0.199	0.200

<sup>a</sup> Za vsakega konja je ob posameznem času podana povprečna vrednost dveh meritev.

**Preglednica XLII:** Rezultati meritev MDA v plazmi konj K1-K10 pred treningom in 0 h, 24 h in 48 h po treningu, podani kot povprečje povprečnih vrednosti dveh meritev vseh konj s standardnim odklonom in koeficientom variacije.

vzorci	$C_{MDA}$ ( $\mu\text{mol/l}$ )	SD	CV
<b>pred treningom</b>	0.189	0.0479	25.3
<b>0 h po treningu</b>	0.192	0.0244	12.7
<b>24 h po treningu</b>	0.174	0.0175	10.1
<b>48 h po treningu</b>	0.188	0.0229	12.2



**Slika 6:** Grafični prikaz povprečnih plazemskih koncentracij MDA v plazmi konj K1-K10 pred in 0 h, 24 h ter 48 h po treningu. Analiza vzorcev s TBA metodo.

#### 4.5.4 Določitev proste oblike MDA z LC-MS/MS z DNPH metodo

##### Območje linearnosti in meja kvantifikacije

Metoda je bila linearna v območju od 0.0195 do 0.625  $\mu\text{mol/l}$ . V tem območju namreč koncentracije, ki smo jih določili s to metodo, niso odstopale od pričakovanih za več kot 15% oz. pri meji kvantifikacije za več kot 20%. Kot limito kvantifikacije smo uporabili najnižji standard iz umeritvene krivulje, katerega točnost je bila med 80-120%, njegov odziv pa je bil najmanj petkrat višji od odziva slepega vzorca. Tem zahtevam je ustrezal standard s koncentracijo 0.0195  $\mu\text{mol/l}$ .

*Meritve proste oblike MDA v plazmi konj*

Rezultati analize vzorcev konja K5 so prikazani v preglednici XLIII.

**Preglednica XLIII:** Rezultati meritev MDA v plazmi konja K5 pred treningom in 0 h, 24 h in 48 h po treningu.

<b>konj K5</b>	<b><math>c_{\text{MDA}}^a</math> (<math>\mu\text{mol/l}</math>)</b>	<b>SD</b>	<b>CV</b>
<b>pred treningom</b>	0.0251	0.000329	1.31
<b>0 h po treningu</b>	0.0150	0.00324	21.7
<b>24 h po treningu</b>	0.0151	0.00168	11.1
<b>48 h po treningu</b>	0.0209	0.000893	4.26

<sup>a</sup> Ob posameznem času je podana povprečna vrednost dveh meritev.

## 5 RAZPRAVA

Malondialdehid je eden glavnih sekundarnih produktov peroksidacije polinenasičenih maščobnih kislin in tudi najpogosteje uporabljen kazalec lipidne peroksidacije v bioloških vzorcih. Kot biološki kazalec LP je tudi biološki kazalec oksidativnega stresa, za njegovo kvantifikacijo pa obstajajo številne metode. MDA smo določali v plazmi konj, ki so bili izpostavljeni fizičnemu stresu. Uporabili smo derivatizacijo z 2,4-dinitrofenilhidrazinom (DNPH) in 2-tiobarbiturno kislino (TBA). Pri prvi metodi smo derivate detektirali z UV in masnim detektorjem, pri drugi pa s fluorescenčnim detektorjem. V literaturi smo za spremljanje oksidativnega stresa pri konjih z merjenjem MDA v različnih bioloških vzorcih (plazma, serum, rdeče krvne celice), našli le podatke o določanju MDA z derivatizacijo s TBA (3,26-31). Večkrat sta bili uporabljeni TBA metoda, ki jo je razvil Yagi (20) in TBA metoda, ki jo je razvil Draper s sodelavci (14).

### 5.1 Optimizacija DNPH metode

Optimizirali smo DNPH metodo, ki so jo razvili v diplomski nalogi Šparakl (24). Optimizacija je potekala v smeri koncentriranja vzorca z namenom določitve proste koncentracije MDA v plazmi s HPLC-UV analizo.

Pri prilagoditvi DNPH metode za določanje celokupnega MDA smo najprej zamenjali steklene epruvete (12 ml), v katere naj bi prenesli heksanske frakcije ekstrahiranih vzorcev, z 1.5 ml plastičnimi epruvetkami. Manjši volumen plastičnih epruvetk nam je prišel prav v fazi rekonstitucije vzorcev, saj smo le te lahko rekonstituirali z manjšim volumnom MF, kot bi to lahko storili v steklenih epruvetah, kjer naj bi bil optimalen volumen za rekonstitucijo 200  $\mu$ l. Optimalen volumen za rekonstitucijo v plastičnih epruvetkah smo izbrali tako, da smo naredili poskuse z 200, 100 in 80  $\mu$ l MF in primerjali površine odzivov. Te so morale biti za rekonstitucijo s 100  $\mu$ l MF vsaj dvakrat tolikšne kot za rekonstitucijo z 200  $\mu$ l MF, saj smo tudi vzorec dvakrat skoncentrirali. Poskus smo naredili s štirimi standardi s koncentracijami 0, 0.156, 0.625 in 2.5  $\mu$ mol/l, površine odzivov pa so bile pri rekonstituciji s 100  $\mu$ l MF vedno približno 2.3 krat tolikšne kot pri rekonstituciji z 200  $\mu$ l MF (preglednica XII). Poskus v katerem smo primerjali uspešnost rekonstitucije z 80 in 100  $\mu$ l MF smo ravno tako izvedli s štirimi standardi s koncentracijami 0, 0.156, 0.625 in 2.5  $\mu$ mol/l. Pričakovali smo razmerje 1.25:1 in ga tudi dobili (preglednica XIII). V



tem primeru razmerja površin pri standardih s koncentracijami 0 in 0.156  $\mu\text{mol/l}$  nismo upoštevali, saj so bili vrhovi na kromatogramu nesimetrični in smo težko določili pravo površino vzorcev. Za nadaljnje delo smo izbrali volumen MF 100  $\mu\text{l}$ .

Končni volumen našega vzorca je bil 100  $\mu\text{l}$ , od katerih smo lahko iz 1.5 ml plastične epruvetke odpipetirali približno 90  $\mu\text{l}$ , ki smo jih prenesli v vialo. Da bi lahko isti vzorec injicirali večkrat, smo izbrali volumen injiciranja 20  $\mu\text{l}$ , namesto 50  $\mu\text{l}$ , ki ga uporabljajo v diplomski nalogi Šparakl (24).

Tak način dela nam je bil lažji, zato smo se odločili, da bomo delali po tem prilagojenem postopku.

Sama optimizacija s koncentriranjem vzorca z uporabo manjšega volumna MF za rekonstitucijo ni bila dovolj za določitev prostega MDA v plazmi konj, zato smo poskušali še s spremembo začetnega volumna vzorca in številom ekstrakcij. Volumen plazme A smo povečali z 250 na 500, 750 in 1000  $\mu\text{l}$ , skladno s tem pa smo povečali tudi volumne ostalih reagentov z izjemo heksana. Injicirali smo 50  $\mu\text{l}$  vzorca. Kljub povečanju volumna plazme nam koncentracije prostega MDA ni uspelo določiti. Površine odzivov plazemskih in slepih vzorcev so bile skoraj enake (preglednice XIV, XV, XVI in XVII). Naredili smo še poskuse s 1000  $\mu\text{l}$  plazme in z različnim številom ekstrakcij – dve, tri in štiri s po 2.5 ml heksana. Injicirali smo 80  $\mu\text{l}$  vzorca. Tudi v tem primeru nam koncentracije prostega MDA ni uspelo določiti. Razlike v površini odzivov plazemskih in slepih vzorcev so bile ravno tako premajhne (preglednice XVIII, XIX in XX). Podoben poskus je opisal Pilz s sodelavci (17). Uporabili so 1000  $\mu\text{l}$  človeške plazme, ekstrakcijo so izvedli z dvakrat po 4 ml heksana, vzorce pa so prav tako kot mi analizirali na HPLC-UV sistemu. Prostega MDA v človeški plazmi jim ni uspelo določiti, saj je bil odziv vzorcev nižji od odziva najnižjega standarda v umeritveni krivulji (0,050  $\mu\text{mol/l}$ ) in je približno ustrežal koncentraciji 0.025  $\mu\text{mol/l}$ . Ta koncentracija je podobna koncentraciji prostega MDA, katero smo kasneje v konjski plazmi določili z LC-MS/MS analizo (preglednica XLIII).

## 5.2 Validacija DNPH metode za določanje celokupnega MDA

Validacijo smo izvedli v skladu z FDA smernicami za določanje bioloških vzorcev (25).

Pri določanju izkoristka ekstrakcije smo uporabili vzorce, ki smo jih pripravili iz 225  $\mu\text{l}$  plazme A oziroma 1%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in 25  $\mu\text{l}$  standarda MDA s koncentracijo 3, 15 ali 30  $\mu\text{mol/l}$ . Izbrane koncentracije standardov so ustrezale približno 10, 50 in 100% koncentracije

endogenega MDA v plazmi A. Izkoristek ekstrakcije je pri dodatku 25  $\mu\text{l}$  3  $\mu\text{M}$  standarda MDA znašal 96.0%, pri dodatku enakih volumnov 15 in 30  $\mu\text{M}$  standardov pa 91.3 oziroma 83.5%. Podatkov o določanju izkoristka ekstrakcije derivatiziranega MDA z DNPH v plazmi konj v literaturi nismo našli. Izkoristek ekstrakcije, ki so ga v človeški plazmi določili v diplomski nalogi Šparakl (24), pa je pri dodatku približno 10 in 100% endogenega MDA znašal 111.3% oziroma 86.9%.

Za določanje linearnosti smo pripravili osem standardov MDA s koncentracijami od 0 do 10  $\mu\text{mol/l}$ . Drugi in tretji dan smo imeli pri vseh koncentracijah nekoliko višje odzive kot prvi dan. Najverjetneje zaradi nečistot prisotnih v reagentih. Metoda je vse dni ustrezala zahtevam za določanje linearnosti po FDA smernicah. Le prvi dan je eden od standardov (0.625  $\mu\text{mol/l}$ ) odstopal za več kot dovoljenih 15%, kar pa je še vedno zadostilo zahtevi, da morajo ustrezati najmanj štirje od šestih standardov, ta, ki odstopa, pa ne predstavlja meje kvantifikacije ali najvišje koncentracije v umeritveni krivulji. Determinacijski koeficient ( $r^2$ ) je bil vse dni višji od 0.999. Tudi pri izračunu meddnevne umeritvene premice, je bil  $r^2$  višji od 0.999. Analizna metoda je bila linearna v območju od 0.16 do 10  $\mu\text{mol/l}$ . V tem območju namreč koncentracije, ki smo jih določili s to metodo, niso odstopale od pričakovanih za več kot 15% oziroma pri meji kvantifikacije za več kot 20%. V diplomski nalogi Šparakl (24) so določili linearen odziv v nekoliko nižjem območju, in sicer med 0.078 in 5  $\mu\text{mol/l}$  ( $r^2 > 0.998$ ).

Ponovljivost metode smo določali s QC vzorci. Določili smo znotrajdnevno in meddnevno ponovljivost. Metoda je vse dni ustrezala zahtevam za ponovljivost po FDA smernicah, ki določajo, da koeficient variacije ne sme biti večji od 15%, pri meji kvantifikacije pa ne večji od 20%. Ustrezala je tudi meddnevna ponovljivost.

Točnost metode smo prav tako določali s QC vzorci. Izračunali smo jo na osnovi dnevnih umeritvenih premic, iz meddnevne umeritvene premice pa smo določili tudi meddnevno točnost. Metoda je vse dni ustrezala zahtevam za točnost po FDA smernicah, saj je bilo povprečje določenih vrednosti, ki smo jih izračunali iz odzivov s pomočjo enačb umeritvenih premic, znotraj 15% prave vrednosti, pri meji kvantifikacije pa odstopanje ni bilo večje od 20%. Tudi meddnevna točnost je ustrezala danim zahtevam.

S stališča ponovljivosti in točnosti je zahtevam za mejo kvantifikacije vse dni zadostil že standard s koncentracijo 0.156  $\mu\text{mol/l}$ . Ko smo upoštevali še zahtevo, da mora biti odziv standarda najmanj petkrat višji od odziva slepega vzorca, pa je bil prvi dan to standard s koncentracijo 0.625  $\mu\text{mol/l}$ , drugi in tretji dan pa standard s koncentracijo 2.5  $\mu\text{mol/l}$ . Na

tako visoko LOQ so vplivale težave s kontaminacijo vzorcev z MDA. Izvor kontaminacije z MDA bi lahko bili reagenti ali pa HPLC sistem. Kasneje smo s poskusom, v katerem smo uporabili stare in nove reagente, analizo pa smo izvedli z uporabo LC-MS/MS sistema, nedvoumno dokazali, da je kontaminacija izvirala iz uporabljenih reagentov. Z MDA sta bili namreč kontaminirani tako stara raztopina žveplove(VI) kisline kot stara raztopina perklorne kisline. Posledice kontaminacije reagentov so bili veliki odzivi v slepem vzorcu, ki pa neposredno vplivajo na določitev LOQ. V diplomski nalogi Šparakl (24) so določili mejo kvantifikacije po FDA smernicah 0.16  $\mu\text{mol/l}$ . Mejo kvantifikacije smo nato določili še iz umeritvenih krivulj, ki smo jih naredili v dneh analize vzorcev konj. Tudi tu so bile koncentracije izračunane iz površine odzivov standardov točne in ponovljive med 0.16 in 10  $\mu\text{mol/l}$ . Petkratno vrednost slepega vzorca in s tem LOQ pa bi preračunano predstavljala koncentracija 0.67  $\mu\text{mol/l}$ . Ta meja kvantifikacije je tudi ustrezno nizka, saj smo v vseh vzorcih konj določili plazemske koncentracije MDA višje od 0.67  $\mu\text{mol/l}$ .

Določili smo še stabilnost že pripravljenih vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku, ohlajenem na 5°C. Kot kriterij stabilnosti smo izbrali največ  $\pm 15\%$  odstopanje odziva v času  $t$  od odziva v času 0. Stabilnost QC vzorcev smo določali v časovnem intervalu 48 ur, medtem ko smo določali stabilnost vzorcev konj znotraj 23 ur. QC vzorci so bili stabilni najmanj 48 ur, saj so se koncentracije v tem času povišale za največ 8.9%. Vzorci konj so bili stabilni 23 ur, saj so se koncentracije znižale za največ 11.3%. Ti rezultati se skladajo z rezultati določenimi v diplomski nalogi Šparakl (24), kjer so določali stabilnost derivatiziranih humanih plazemskih vzorcev.

### 5.3 Validacija TBA metode

Določali smo izkoristek ekstrakcije, linearnost, območje linearnosti, mejo kvantifikacije ter stabilnost. Validacijo smo izvedli v skladu z FDA smernicami za določanje bioloških vzorcev (25).

Pri določanju izkoristka ekstrakcije smo uporabili vzorce, ki smo jih pripravili iz 225  $\mu\text{l}$  plazme A oziroma 1%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  in 25  $\mu\text{l}$  standarda MDA s koncentracijo 0.2, 1 ali 2  $\mu\text{mol/l}$ . Izbrane koncentracije standardov so ustrezale približno 10, 50 in 100% koncentracije endogenega MDA v plazmi A. Izkoristek ekstrakcije je bil pri dodatku 25  $\mu\text{l}$  0.2  $\mu\text{M}$  standarda MDA 73.8%, pri dodatku enakih volumnov 1 in 2  $\mu\text{M}$  standardov pa 75.0 oziroma 73.3%. Izkoristki so bili konstantni in ponovljivi.

Za določanje linearnosti smo pripravili deset standardov MDA s koncentracijami od 0 do 10  $\mu\text{mol/l}$ . Metoda je vse dni ustrezala zahtevam za določanje linearnosti po FDA smernicah. Determinacijski koeficient ( $r^2$ ) je bil vse dni višji od 0.999, tudi pri izračunu meddnevne umeritvene premice. Analizna metoda je bila linearna v območju od 0.078 do 10  $\mu\text{mol/l}$ . V tem območju namreč koncentracije, ki smo jih določili s to metodo, niso odstopale od pričakovanih za več kot 15% oziroma pri meji kvantifikacije za več kot 20%. Glede na tehnično dokumentacijo Chromsystems testa (10) naj bi bila metoda linearna v območju med 0.01 in 10  $\mu\text{mol/l}$ . Tudi Seljeskog in sodelavci (11) pa so podobno kot mi določili linearen odziv med 0.16 in 10  $\mu\text{mol/l}$  ( $r^2=0.991$ ).

FDA smernicam za mejo kvantifikacije je vse tri dni ustrezal standard s koncentracijo 0.156  $\mu\text{mol/l}$ . Le v dveh vzorcih smo določili nekoliko nižjo koncentracijo od meje kvantifikacije, zato smo jo opredelili kot ustrezno.

Za določanje stabilnosti smo uporabili vzorce, ki smo jih pripravili iz 225  $\mu\text{l}$  plazme A in 25  $\mu\text{l}$  1%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  oziroma enakega volumna 3, 15 in 30  $\mu\text{M}$  standardov MDA. Določili smo 1.5 in 19 urno stabilnost že pripravljenih vzorcev v avtomatskem vzorčevalniku, ohlajenem na 5°C. Pripravljeni vzorci so stabilni v celotnem času analiziranja, saj se je koncentracija MDA po 19 urah spremenila za največ 13.8%. Po 1.5 ure je ta sprememba znašala največ 4.0%. Kot kriterij stabilnosti smo izbrali največ  $\pm 15\%$  odstopanje odziva v času  $t$  od odziva v času 0.

#### 5.4 Merjenje MDA v plazmi konj

Koncentracija celokupnega MDA, ki smo jo v plazmi konj določali z DNPH metodo in HPLC-UV analizo, se je po treningu s časom povečevala (preglednici XXXIX in XL). Povprečne vrednosti pri desetih konjih pred treningom so znašale 1.14  $\mu\text{mol/l}$ , takoj po treningu 1.63, 24 ur po treningu 1.86 in 48 ur po treningu 2.30  $\mu\text{mol/l}$  (preglednica XL). Porast v koncentraciji MDA, sicer določenega z derivatizacijo s TBA, so takoj po treningu v svojih raziskavah določili tudi Avellini s sodelavci (26), Chiaradia s sodelavci (27), Al-Qudah s sodelavci (28,29), White s sodelavci (30), Marlin s sodelavci (31) in Gondim s sodelavci (3).

Povprečne koncentracije MDA, ki smo jih določili s TBA metodo, se pred in po treningu niso razlikovale. Povprečne koncentracije MDA pri desetih konjih so pred treningom ter 0,

24 in 48 ur po treningu znašale 0.189 ter 0.192, 0.174 oziroma 0.188  $\mu\text{mol/l}$  (preglednica XLII).

Metode DNPH za določanje proste oblike MDA z LC-MS/MS detekcijo nismo validirali. Preverili smo le območje linearnosti ter na osnovi rezultatov ocenili tudi mejo kvantifikacije. Metoda je bila linearna v območju od 0.0195 do 0.625  $\mu\text{mol/l}$ . V tem območju so bili standardi tudi točni (92.7-109.0%). Najnižji standard z ustrežno točnostjo in odzivom višjim od petkratnega odziva slepega vzorca je bil standard s koncentracijo 0.0195  $\mu\text{mol/l}$ . Ta koncentracija je verjetno približno enaka meji kvantifikacije te metode. Koncentracijo prostega MDA smo določali z DNPH metodo in LC-MS/MS detekcijo. Analizirali smo le vzorce konja K5, koncentracije pa so bile pred treningom ter 0, 24 in 48 ur po treningu 0.0251 ter 0.0150, 0.0151 oziroma 0.0209  $\mu\text{mol/l}$  (preglednica XLIII). Rezultati kažejo, da koncentracija proste oblike MDA v plazmi konj, ki so bili izpostavljeni fizičnemu treningu, ne poraste.

Koncentracije MDA, določene s TBA metodo (Chromsystems assay), so nižje kot koncentracije MDA, določene z DNPH metodo za določanje celokupnega MDA, in višje kot koncentracije MDA, določene z DNPH metodo za določanje prostega MDA. Vzrok za prvo je lahko začetna deproteinizacija, ki se pri TBA metodi izvede, pri DNPH metodi za določanje celokupnega MDA pa ne. Vzrok za drugo pa je lahko uporaba drugačnega obarjalnega reagenta pri TBA metodi kot pri DNPH metodi (podatkov o sestavi obarjalnega reagenta iz kita nismo imeli) in/ali pa je posledica tvorbe MDA iz endogenih lipidnih peroksidov zaradi pogojev v katerih poteka derivatizacija pri TBA metodi (visoka temperatura (95°C) in kisel medij). Izvor MDA v plazmi namreč poleg prostega MDA in na proteine vezanega MDA predstavlja tudi MDA, ki se lahko sprosti iz endogenih lipoperoksidov zaradi pogojev, ki jim je izpostavljen vzorec med določanjem MDA (visoka temperatura in nizek pH) (17). Tudi pri DNPH metodi poteka derivatizacija v močno kislem mediju (pH določen s pH papirčki je bil 1) a pri sobni temperaturi, kar naj bi vplivalo na manjšo kislinsko katalizirano tvorbo MDA (18).

Porast v povprečni celokupni koncentraciji MDA, ki smo ga določili z DNPH metodo, se je ujema z rezultati drugih raziskav, iz česar smo zaključili, da je ta DNPH metoda primerna za spremljanje oksidativnega stresa po fizičnem treningu z merjenjem MDA v plazmi konj. Povprečna koncentracija MDA določenega s TBA metodo po treningu ni porastla. Tudi povprečna koncentracija prostega MDA, ki smo jo določali z DNPH LC-MS/MS metodo, po treningu ni porastla.

## 6 SKLEP

Vse tri uporabljene metode (DNPH metoda za določanje celokupnega MDA s HPLC-UV analizo, DNPH metoda za določanje prostega MDA z LC-MS/MS analizo in TBA metoda) so s stališča validacije primerne za določanje MDA v plazmi konj. DNPH metoda s HPLC-UV detekcijo se ni izkazala za dovolj občutljivo, da bi z njo lahko določili koncentracijo prostega MDA v plazmi konj.

Koncentracija MDA, ki smo jo določili po DNPH in TBA metodi, se je bistveno razlikovala. Vzrok različnim koncentracijam MDA so lahko različne metode derivatizacije oziroma različni pogoji, ki so jim vzorci izpostavljeni tekom priprave in analize.

Povprečna celokupna koncentracija MDA, ki smo jo določali z DNPH metodo, je v plazmi konj po fizičnem treningu narastla. Porast se je ujema z rezultati drugih raziskav, iz česar smo zaključili, da je DNPH metoda za določanje celokupne koncentracije MDA primerna za spremljanje oksidativnega stresa v plazmi konj po fizičnem treningu. Prosta koncentracija MDA po treningu v plazmi konja ni porastla. Prav tako po treningu v plazmi konj ni porastla povprečna koncentracija MDA določena s TBA metodo.

## LITERATURA

1. Halliwell B, Gutteridge JMC: Free radicals in Biology and Medicine, 4<sup>th</sup> Ed., Oxford University Press, New York, 2007: 187-340, 488-613.
2. Pečar S: Svetloba, radikali in fotodinamična terapija. Farm Vestn 2008; 59: 135-137.
3. Gondim FJ, Zoppi CC, Silveira LR, Pereira-da-Silva L, Macedo DV: Possible Relationship Between Performance and Oxidative Stress in Endurance Horses. J Equine Vet Sci 2009; 29(4): 206-212.
4. Bresjanac M, Bunc M, Črne-Finderle N, Grubič Z, Kamarič L, Kordaš M, Pavlin R, Ribarič S, Sket D, Sketelj J, Šuput D, Zorec R, Živin M: Izbrana poglavja iz patološke fiziologije, 9. izdaja, Univerza v Ljubljani: Medicinska fakulteta, Ljubljana, 2003: 16-36.
5. Antioksidanti. V Sollner Dolenc M, Pečar S: Vaje iz farmacevtske kemije III, Univerza v Ljubljani: Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 1997: 4-5.
6. M. Abuja P, Albertini R: Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. Clin Chim Acta 2001; 306: 1-17.
7. Spiteller G: Linoleic acid peroxidation – the dominant lipid peroxidation process in low density lipoprotein – and its relationship to chronic diseases. Chem Phys Lipids 1998; 95: 105-162.
8. Niki E, Yoshida Y, Saito Y, Noguchi N: Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. Biochem Biophys Res Comm 2005; 338: 668-676.
9. Mateos R, Bravo L: Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, and proteins). J Sep Sci 2007; 30: 175-191.
10. Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH, München, Nemčija: Instruction Manual for the HPLC Analysis of malondialdehyde in Plasma/Serum. 2003; Order Number 67000.
11. Seljeskog E, Hervig T, Mansoor MA: A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. Clin Biochem 2006; 39: 947-954.

12. Mateos R, Goya L, Bravo L: Determination of malondialdehyde by liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazone derivative. A marker for oxidative stress in cell cultures of human hepatoma HepG2. *J Chrom B* 2004; 805: 33-39.
13. Halliwell B, Whiteman M: Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? *Br J Pharmacol* 2004; 142: 231-255.
14. Draper HH, Squires EJ, Mahmoodi H, Wu J, Agarwal S, Hadley M: A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. *Free Radic Biol Med* 1993; 15: 353-363.
15. Grotto D, Santa Maria L, Valentini J, Paniz C, Schmitt G, Garcia SC, Pomblum VJ, Rocha JB, Farina M: Importance of the lipid peroxidation biomarkers and methodological aspects for malondialdehyde quantification. *Quim Nova* 2009; 32(1): 169-174.
16. Tüközkan N, Erdamar H, Seven I: Measurement of Total Malondialdehyde in Plasma and Tissues by High-Performance Liquid Chromatography and Thiobarbituric Acid Assay. *F rat T p Dergisi* 2006; 11(2): 88-92.
17. Pilz J, Meineke I, Gleiter CH: Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. *J Chrom B* 2000; 742: 315-325.
18. Onyango AN, Baba N: New hypotheses on the pathways of malondialdehyde and isofurans. *Free Rad Biol Med* 2010; 49: 1594-1600.
19. Shibamoto T: Analytical methods for trace levels of reactive carbonyl compounds formed in lipid peroxidation systems. *J Pharm and Biomed Anal* 2006; 41: 12-25.
20. Yagi K: Assay for Blood Plasma or Serum. *Meth Enzymol* 1984; 105: 328-331.
21. Andreoli R, Manini P, Corradi M, Mutti A, Niessen WMA: Determination of patterns of biologically relevant aldehydes in exhaled breath condensate of healthy subjects by liquid chromatography/atmospheric chemical ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003; 17: 637-645.
22. Korchazhkina O, Exley C, Spencer SA: Measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography of malondialdehyde in normal human urine following derivatisation with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *J Chrom B* 2003; 794: 353-362.



23. Cordis GA, Das DK, Riedel W: High-performance liquid chromatographic peak identification of 2,4-dinitrophenylhydrazine derivatives of lipid peroxidation aldehydes by photodiode array detection. *J Chrom A* 1998; 798: 117-123.
24. Šparakl J: Razvoj metode HPLC za vrednotenje lipidne peroksidacije z določanjem malondialdehida v plazmi, diplomska naloga, Univerza v Ljubljani: Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2007.
25. Guidance for industry, Bioanalytical method validation, U.S. Department of health and human services, Food and drug administration, Center for drug evaluation and research, Rockville, MD, maj 2001.
26. Avellini L, Chiaradia E, Gaiti A: Effect of exercise training, selenium and vitamin E on some free radical scavengers in horses (*Equus caballus*). *Comp Biochem Physiol B* 1999; 123: 147-154.
27. Chiaradia E, Avellini L, Rueca F, Spaterna A, Porciello F, Antonioni MT, Gaiti A: Physical exercise, oxidative stress and muscle damage in racehorses. *Comp Biochem Physiol B* 1998; 119: 833-836.
28. Al-Qudah KM, Al-Majali AM: Higher Lipid Peroxidation Indices in Horses Eliminated from Endurance Race Because of Synchronous Diaphragmatic Flutter (Thumps). *J Equine Vet Sci* 2008; 28(10): 573-578.
29. Al-Qudah KM, Al-Majali AM: Status of biochemical and antioxidant variables in horses before and after long distance race. *Revue Méd. Vét.* 2006; 157(6): 307-312.
30. White A, Estrada M, Walker K, Wisnia P, Filgueira G, Valdes F, Araneda O, Behn C, Martinez R: Role of exercise and ascorbate on plasma antioxidant capacity in thoroughbred race horses. *Comp Biochem Physiol B* 2001; 128: 99-104.
31. Marlin DJ, Fenn K, Smith N, Deaton CD, Roberts CA, Harris PA, Dunster C, Kelly FJ: Changes in Circulatory Antioxidant Status in Horses during Prolonged Exercise. *J. Nutr.* 2002; 132:1622S-1627S.