

Středoškolská odborná činnost 2006/2007

Obor 03 – Chemie

Vývoj neinvazivní diagnostiky

asthma bronchiale

-

změny hladin markerů

v denním biorytmu

Autor:

Jan Přech

O8B

Gymnázium Nad Štolou 1

Praha 7

ÚOT VŠCHT Praha

Vedoucí práce:

Ing. Petr Kačer Ph.D.

ÚOT VŠCHT Praha

Praha, březen 2007

Prohlašuji tímto, že jsem předloženou práci vypracoval samostatně pod vedením Ing. Petra Kačera, Ph.D., za podpory lidí uvedených v poděkování a uvedl jsem veškerou použitou literaturu v seznamu literatury.

V Praze, dne 18.3.2007

Jan Přeč, autor

Poděkování

Na tomto místě bych rád poděkoval osobám bez jejichž podpory a pomoci by tato práce nevznikla.

Rád bych poděkoval **Ing. Petrovi Kačerovi Ph.D.** z ÚOT VŠCHT Praha, vedoucímu mé práce za podporu a cenné rady. Dále patří můj velký dík **Kamile Syslové** z ÚOT VŠCHT Praha za pomoc a podporu při práci i bojích s technikou.

MUDr. Jindřišce Lebedové CSc. a **Mgr. Hurtové** z Ústavu pracovního lékařství 1.LF UK děkuji za zajištění odběrů KVV.

Musím poděkovat též **Prof. Ing. Liborovi Červenému DrSc.**, vedoucímu ÚOT VŠCHT Praha, za umožnění práce jeho skupině.

Nemohu opomenout mé spolužačky **Lenku Pokornou, Magdu Chorvátovou a Petru Dupalovou**, které se mnou jako dobrovolnice absolvovaly odběry KVV.

Za všestrannou pomoc a podporu musím poděkovat též mým rodičům.

Můj dík patří též **RNDr. Štěpánce Selingerové** a **Ing. Haně Kačerové** z Gymnázia Nad Štolou, za podporu a pomoc s administrativou.

Obsah

Abstrakt	5
Seznam zkratek	6
1. Úvod	7
2. Kondenzát vydechaného vzduchu	9
3. Sledované látky	
3.1. Leukotrieny	10
3.2. 8-isoprostan	12
3.3. Stabilita leukotrienů	13
4. <i>Asthma bronchiale</i>	14
5. Oxidativní stres	16
6. Analytická instrumentace	
6.1. HPLC/MS	17
6.2. Hmotnostní spektrometr	18
6.3. Použité přístroje, vybavení a chemikálie	20
7. Experimentální část	
7.1. Odběr a zpracování vzorků	21
7.2. Příprava vzorků pro HPLC/MS analýzu	22
7.3. Optimalizace podmínek analýzy	24
7.4. HPLC/MS analýza	25
8. Výsledky a diskuse	26
9. Závěr	30
Literatura	31

Abstrakt

Předkládaná práce je součástí řešení širší problematiky „Vývoj neinvazivní diagnostiky *asthma bronchiale*“, který je realizován na Ústavu organické technologie VŠCHT Praha ve spolupráci s Klinikou nemocí z povolání 1. LF UK a VFN. Cílem tohoto projektu je vyvinout spolehlivou, rychlou a nenáročnou neinvazivní metodu pro diagnózu *asthma bronchiale*, využívající monitorování hladin biomarkerů - leukotrienů v kondenzátu vydechaného vzduchu pomocí vysoce citlivé a selektivní analytické metody - HPLC/MS.

Předkládaná práce si kládla za cíl popsat změny hladin biomarkerů výše zmíněného onemocnění v průběhu 24 hodin. Znalost těchto změn je důležitá pro přesné určení diagnózy bez ohledu na dobu odběru kondenzátu vydechaného vzduchu. Pro zpracování vzorků byla úspěšně aplikována již vyvinutá separační metoda immunoafinitní extrakce a hmotnostně spektrometrické analýzy.

Výsledkem experimentální části je popis vývoje hladin markerů v průběhu 24 hodin. Během dne, kdy je tělo aktivní, dochází k rovnoměrnému růstu hladin markerů a ve spánku k jejich poklesu. Paralelně byl též zkoumán vývoj hladiny 8-isoprostanu jakožto markeru oxidativního stresu. Výsledky byly podobné markerům *asthma bronchiale*.

Abstract

This study is a part of wider research “Development of Noninvasive Diagnostics of *Asthma Bronchiale*“, conducted at the Department of Organic Technology of the Institute of Chemical Technology Prague in a collaboration with the Department of Occupational Diseases of the 1st Faculty of Medicine, Charles University Prague. The aim of the project is to develop a reliable fast and unassuming noninvasive method to diagnose *asthma bronchiale*, using monitoring of leucotrien biomarker levels in the exhaled breath condensate (EBC) by means of the High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry instrumentation.

The presented work tries to describe alterations of the *asthma bronchiale* biomarker levels during 24 hours. Knowledge of the daily shifts is important for the precise diagnose determination aside from a condensate collection time. EAC samples were successfully analyzed with already developed methods utilizing the immunoaffinit extraction and the mass spectrometry analysis.

The result of the experiment can be summarized in the following description of the biomarker level evolution during 24 hours: During daytime, when a body is active, levels of the biomarkers evenly grow, while during sleep they considerably decrease. Daily evolution of 8-isoprostan (an oxidative stress biomarker) level was studied in parallel. The results are similar to the *asthma bronchiale* biomarkers.

Seznam zkratek

KVV – kondenzát vydechovaného vzduchu

LTA₄ – leukotrien A₄

LTB₄ – leukotrien B₄

LTC₄ – leukotrien C₄

LTD₄ – leukotrien D₄

LTE₄ – leukotrien E₄

CysLTs – cysteinylované leukotrieny (LTC₄, LTD₄, LTE₄)

LTB₄-d₄ - [6,7,14,15²H] leukotrien B₄

LTE₄-d₃ - [20,20,20²H] leukotrien E₄

HPLC/MS – vysokoúčinná kapalinová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií

COPD – chronická obstrukční plicní nemoc

GC – plynová chromatografie

ESI – elektrosprejová ionizace

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku

MRM – „multiple reaction monitoring“ používaný mód hmotnostního spektrometru

CID – srážkově indukovaná disociace

1. Úvod

Asthma bronchiale je onemocnění, jehož incidence v moderní populaci neustále roste jako důsledek zvyšujícího se počtu alergenů v životním prostředí. Ze stejného důvodu klesá i věk, kdy dochází k výskytu prvního astmatického záchvatu. Včasná diagnostika uvedeného onemocnění je důležitá z hlediska zahájení účinné terapie a minimalizace poškození pacienta. V současné době v praxi používané diagnostické metody spočívají v kombinaci invazivních a *semi*-invazivních metod, které jsou pro pacienta zatěžující a v případě dětí až stresující záležitostí. Analýza dechového kondenzátu (KVV) je poměrně novou metodou, která představuje alternativní cestu, kterou je možné charakterizovat jako zcela neinvazivní a i pro dětského pacienta nezatěžující diagnostickou metodu. Princip metody spočívá v kvantifikaci specifických látek - „biomarkerů“ pro uvedené onemocnění, které se vyskytují v uvedené tělní tekutině a jejichž koncentrační hladina je v důsledku probíhající zánětlivé reakce v dýchacích cestách a plicích významně zvýšena. K analýze dechového kondenzátu se používají biochemické metody, nebo metody využívající vysoce citlivé a specifické techniky na bázi hmotnostní spektrometrie. V současné době se problematika využití kondenzátu vydechovaného vzduchu jako zdroje biomarkerů celé řady plicních onemocnění nachází ve stavu, kdy byla popsána celá řada metodik jejich stanovení, ovšem výsledky uvedených studií vykazují značný rozptyl, který je dán opomenutím celé řady specifických faktorů, které je nutné respektovat při zpracování a následné analýze této tělní tekutiny.

Předkládaná práce je součástí obsáhlejšího projektu vývoje neinvazivní diagnostické metody pro *asthma bronchiale* a dalších onemocnění (silikóza, azbestóza) jejichž markery jsou podobné markerům *asthma bronchiale*. Výzkum je prováděn na Ústavu organické technologie VŠCHT Praha ve spolupráci s Ústavem pracovního lékařství 1.LF UK.

Do současné doby byla vytvořena metoda pro stanovení biomarkerů zmíněných onemocnění v KVV kombinující tzv. immunoafinitní extrakci - vysoce specifickou separaci biomarkerů bronchiálního astmatu založenou na principu reakce monoklonální protilátky s příslušným markerem – a hmotnostně spektrometrické analýzu – vysoce citlivé a selektivní analytické metody pro kvalitativní a kvantitativní stanovení daných markerů.

Cílem této práce je popsat vývoj hladin markerů v průběhu dne jakožto jeden z důležitých aspektů pro správné vyhodnocení klinických výsledků a stanovení diagnózy. Hladina biomarkerů naměřená v KVV různé denní době se může lišit, což by mohlo vést

ke zkreslení výsledků a tím až k nepřesnému nebo dokonce chybnému stanovení diagnózy.
Tento parametr je tedy nutné brát při stanovení diagnózy v úvahu.

2. Kondenzát vydechovaného vzduchu

Vyšetření vydechovaného vzduchu má dlouhou tradici. Již koncem 18. století jeho složení zkoumal francouzský chemik a lékař Antoine Laurent de Lavoisier. S „analýzou“ vydechovaného vzduchu se řadu let běžně setkávají řidiči při testování na požití alkoholu. Pro dech diabetiků je typický charakteristický zápach způsobený přítomností acetonu, kyseliny β -hydroxymásečné a acetoacetátu..

Vydechovaný vzduch je však podstatně složitější směsí látek, než by se mohlo zdát. Do současnosti bylo ve vydechovaném vzduchu detekováno přes 200 látek a další přibývají. [1] Vydechovaný vzduch má dvě fáze – plynnou a kapalnou. V plynné fázi jsou obsaženy hlavně plyny uvolněné z krve a plyny přítomné ve vdechovaném vzduchu a dále těkavé látky uvolněné při metabolických reakcích v lidském těle. Jde hlavně o oxid dusnatý, oxid uhličitý a oxid uhelnatý, vodu, peroxid vodíku a plynné uhlovodíky (ethan). V kapalně fázi, která je tvořena aerosolovými částicemi strhávanými ze stěn dýchacích cest a plicních sklípků, se nachází voda a mnoho složitých organických látek. Mezi nimi například DNA, hormony (histamin, serotonin) a také velká skupina proteinů a metabolitů kyseliny arachidonové. Právě metabolity kyseliny arachidonové tvoří skupinu látek, která nás zajímá. Některé z těchto látek (8-isoprostan, leukotrieny) jsou totiž citlivými markery a mediátory některých onemocnění - tedy substancemi, které svou přítomností nebo zvýšenou hladinou signalizují nastupující onemocnění ještě dlouho před prvními klinickými příznaky nebo vypovídají o jeho rozsahu. [2,3]

Většinu obsažených látek – jak z plynné, tak z kapalně fáze - lze zkondenzovat dýcháním přes chladicí zařízení. Tím získáme tzv. kondenzát vydechovaného vzduchu (KVV). V 1 ml KVV se nacházejí řádově desítky (1-200) pg pikogramů výše zmíněných metabolitů kyseliny arachidonové. Jejich koncentrace pravděpodobně nejspolehlivěji odráží jejich koncentraci v dýchacích cestách a sledováním jejich hladiny je možné hodnotit rozsah onemocnění a úspěšnost léčby. [2] V jiných pracích byly sledovány hodnoty těchto markerů v různých tělních tekutinách, například v krevní plazmě [3] nebo v moči [4]. Tyto koncentrace však vypovídají spíše o úhrnné tělní produkci než o obsahu v dýchacích cestách.

3. Sledované látky

3.1 leukotrieny

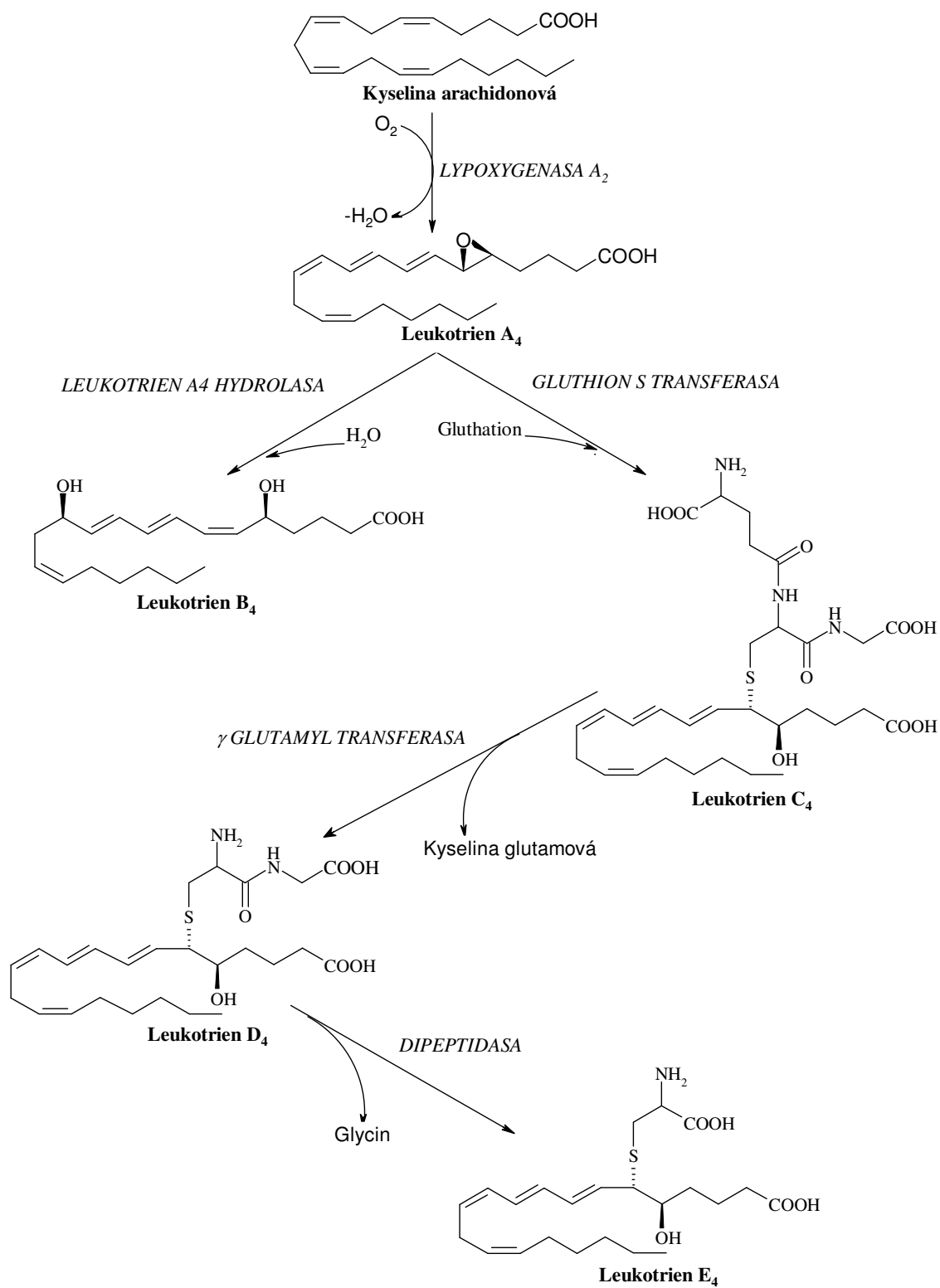
Leukotrieny jsou společně s prostaglandiny, prostacykliny, tromboxany souborně známé jako eikosanoidy (též ikosanoidy - ve všech případech jedná o C₂₀-sloučeniny). Jsou produkovány všemi savčími buňkami kromě červených krvinek a jsou to metabolity kyseliny arachidonové. Podobně jako hormony mají při extrémně nízkých koncentracích značné fyziologické účinky. Zprostředkovávají například:

- Zánětlivou odpověď
- Pocit bolesti a horečku
- Regulaci krevního tlaku
- Indukci srážení krve
- Kontrolu několika reprodukčních funkcí, jako například indukci porodních stahů
- Regulaci cyklu spánku a bdění

Od hormonů se liší tím, že nejsou unášeny krevním řečištěm do místa účinku. Jsou to chemicky a biologicky nestálé látky (některé z nich se rozkládají *in vitro*¹ během několika minut), a díky tomu mají funkci spíše lokálních mediátorů.

Kyselina arachidonová (5,8,11,14-eikosatetraenová kyselina; viz obr. 1) je nenasycená mastná kyselina s 20 uhlíkovými atomy a čtyřmi cis dvojnými vazbami. V těle je vázána ve fosfolipidech v buněčných membránách. Působením enzymu fosfolipázy A₂ je uvolňována do organismu. Činností enzymu 5-lipoxygenázy se kyselina arachidonová přeměňuje na nestabilní epoxidový leukotrien A₄ (LTA₄), který může být dále přeměňován jednou ze dvou možných enzymatických drah. Působením LTA₄ hydrolázy dochází ke vzniku leukotrienu B₄ (LTB₄), případně působením enzymu LTC₄ syntetázy vzniká první člen z tzv. cysteinylovaných leukotrienů (cysLTs) a to leukotrien C₄ (LTC₄). K cysteinylovaným leukotrienům dále řadíme leukotrien D₄ (LTD₄) a leukotrien E₄ (LTE₄). V řadě cysLTs dochází k postupné přeměně v řadě LTC₄ → LTD₄ → LTE₄ následným působením enzymů glutamyltransferázy a dipeptidázy. Cys LTs se zejména uplatňují v alergickém zánětu. Jejich zdrojem jsou žírné buňky a granulocyty. [1]

¹ *in vitro* – lat. „ve skle“, tj. ve zkumavce, za umělých laboratorních podmínek [5].



Obrázek 1: Schéma biosyntézy a přeměn leukotrienů

Cysteinylované leukotrieny LTC₄, LTD₄ a LTE₄ jsou nyní též považovány za složky pomalu reagujících látek anafylaxe², které se uvolňují ze senzitivizovaných plic po imunitní reakci. Tyto látky účinkují ve velmi malých koncentracích (až 10⁻¹⁰ mol/l) a jsou například 10 000-krát účinnější než histamin. Cysteinylované leukotrieny stahují hladké dýchací svalstvo, zvyšují propustnost cév, zužují dýchací cesty a stimulují tvorbu hlenu [6] čili způsobují příznaky, které jsou popisovány v patofyziologii průduškové obstrukce³. Na této skutečnosti je postaven účinek moderních léků proti astmatu, které působí jako vysoce selektivní antagonisté⁴ cysLT₁ receptorů. Určitá koncentrace leukotrienů byla naměřena i v KVV zdravých lidí a rostla přímo úměrně se stupněm postižení bronchiálním astmatem [7]. Na rozdíl od koncentrace vydechovaného LTE₄, koncentrace vydechovaného LTB₄ má rostoucí tendenci u pacientů s COPD⁵ (99 pg/ml) [9] a u pacientů s bronchiectazií⁶ (80 pg/ml) [10] ve srovnání se zdravými lidmi (38 pg/ml) [9]. Koncentrace LTB₄ jsou rovněž zvýšené u fibrotiků (76 pg/ml) [10]. Tyto zvýšené hodnoty potvrzují roli leukotrienů v plicích zánětlivých procesech. LTB₄ lze tedy považovat za marker probíhajícího akutního zánětu.

3.2 8-isoprostan

Další látkou, jejíž hladinu jsem se rozhodl sledovat je 8-isoprostan ze skupiny F2 isoprostanů. Syntéza isoprostanů běží na rozdíl od leukotrienů dvěma cestami: enzymatickou oxidací cyklooxygenázami a působením volných kyslíkových radikálů. Ve větší míře vznikají isoprostany právě druhou cestou, tedy působením volných kyslíkových radikálů - neenzymatickou peroxidací membránových lipidů, obsahujících kyselinu arachidonovou. Z toho je jasné, že isoprostany by mohly posloužit jako velmi citlivý marker oxidativního stresu.⁷

² anafylaxe – prudká alergická reakce na cizorodé bílkoviny, která může být i smrtelná [8].

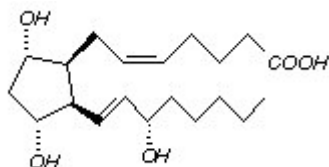
³ obstrukce – překážka, zamezení či ztížení průchodnosti dutým orgánem. Příč.: cizí těleso, kámen, hlen, nádor aj. [5].

⁴ antagonisté – opačně působící (např. lék nebo sval) [5].

⁵ COPD – chronická obstrukční plicní nemoc. Chronické onemocnění, vznikající nejčastěji jako následek chronické bronchitidy, která postupně vedla k obstrukci „ucpávání“ průdušek (opakované záněty, nadměrné množství hlenu“. Dochází k poškození plic (kašel, dušnost....) a někdy též srdce [5]

⁶ bronchiectazie – chorobné a trvalé rozšíření průdušek. někdy je vrozené, častěji vzniká jako následek některých (zejména opakovaných) zánětů. V rozšířených průduškách probíhá téměř stále zánět s infekcí (kašel s hojným vykašláváním, teploty a celkové příznaky chronického zánětu). Podávají se antibiotika a někdy je nutné odstranění bronchiectazií operačně [5]

⁷ oxidativní stres – stav a děje vedoucí k vzniku velkého množství kyslíkových radikálů, které mohou způsobovat poškození buněk a tkání. Oxidativní stres je považován za patogenetický mechanismus při mnohých chorobných stavech (zánětech, ischemiích...) [5]



Obrázek 2: Struktura 8-isoprostanu

8–isoprostan (obrázek 2) byl detekován v KVV zdravých lidí, a to naznačuje, že existuje jistý fyziologický limit míry postižení oxidativním stresem [11]. Podle měření prováděných užitím GC/MS bylo zjištěno, že u zdravých lidí jsou hodnoty 11 pg/ml KVV u mužů a 7 pg/ml KVV u žen [11]. Bylo také zjištěno, že pacienti s astmatem mají vyšší koncentrace 8–isoprostanu ve vydechovaném vzduchu a že hodnoty koncentrací korelují s rozsahem onemocnění [12]. Jak orálně, tak i inhalačně podávané kortikosteroidy (látky běžně užívané při léčbě astmatu) nedokázaly snížit hodnoty koncentrací naměřených u těžkých astmatiků (až 50 pg/ml), to může signalizovat, že léčba kortikosteroidy nesnižuje oxidativní stres [12].

Zvýšené hodnoty 8-isoprostanu byly pozorovány též u kuřáků a pacientů trpících COPD [11]. Podrobnějšímu sledování hladiny 8-isoprostanu se věnoval ve své práci [14] Chytil a zjistil souvislost hladiny 8-isoprostanu s postižením dalšími nemocemi na jejichž patogenezi se podílí oxidativní stres. Konkrétně se jedná o azbestózu, silikózu a mezoteliom pleury (druh rakoviny plic).

3.3 Stabilita leukotrienů

Leukotrieny jsou látky značně nestálé a snadno dochází k jejich degradaci. Je tedy nutné veškeré vzorky, ve kterých jsou obsažené, skladovat při nízké teplotě. Dle [1] bylo zjištěno, že po dobu 2 měsíců při skladování při -80°C nedocházelo k výrazné změně v koncentraci sledovaných látek. Průběh odbourávání za laboratorní teploty byl odlišný u látek vyskytujících se v KVV a v mobilní fázi – závisí mimo jiné na přítomných enzymatických systémech – nicméně rychlost degradace sledovaných biomarkerů byla výrazná a poločas se pohyboval v jednotkách hodin za laboratorní teploty. V matrici KVV byla vedle rozpadu jednotlivých látek (velmi dobře patrného v mobilní fázi) sledována i jejich vzájemná přeměna v řadě $\text{LTC}_4 \rightarrow \text{LTD}_4 \rightarrow \text{LTE}_4$, která je katalyzována v KVV přítomnými enzymovými systémy. Rovněž počet cyklů rozmrazení-zamrazení má negativní vliv na množství cys-LTs detekovaných v KVV. Velmi nízká stabilita leukotrienů v KVV je jeden z nejpravděpodobnějších důvodů pro rozdílné hodnoty uváděné v literatuře.

Výše uvedené vlastnosti týkající se stability za různých teplot platí také pro isoprostany.

4. Asthma Bronchiale

Bronchiální astma se řadí mezi plicní onemocnění, při kterém dochází k intenzivnímu zúžení dýchacích cest v důsledku kontrakcí hladkého svalstva, edému mukózy⁸ a přítomností vazkého hlenu v lumenu⁹ bronchů a bronchiol. Průchodnost dýchacích cest se v krátkých časových intervalech spontánně nebo v důsledku léčby mění v závislosti na působení uvolňovaných místních spazmogenů a vazoaktivních látek (histaminu, leukotrienů a prostaglandinů) v průběhu alergického procesu.

Astma se podle vzniku příčiny rozděluje na asthma atopické a astma neatopické. U atopického astmatu jsou spouštěcím mechanismem alergické reakce xenobiotika. Cizorodými látkami mohou být inhalované částice prachů a pylů, páry, plyny nebo požitá potravinová či léky. Tento druh astmatu způsobuje okamžitá hypersensitivita na daný alergen. To je doloženo i tím, že u více jak 75% astmatiků se projevuje pozitivní kožní odpověď na jeden nebo několik běžných alergenů [13]. K astmatickému záchvatu pak dochází po inhalaci specifického alergenu.

Naproti tomu u neatopického astmatu se nedají určit žádné vnější alergeny, proto se tento proces považuje za endogenní, a astmatický záchvat může být vyvolán chladem, infekcemi, stresem nebo tělesnou námahou.

[14] K vyslovení správné diagnózy bronchiálního astmatu je potřeba provést celou řadu vyšetření. Většina dnes běžně používaných diagnostických metod jsou kombinací *semi*-invazivních a invazivních metod. Při stanovení diagnostiky *asthma bronchiale* se nejprve pacientovi provádí spirometrické¹⁰ měření ventilační funkce plic. Pokud spirometrické vyšetření přináší normální výsledky, následuje bronchoprovokační test nespecifickým podnětem - podáním látek histaminu, nebo acetylcholinu. Bronchoprovokační test velmi často zatěžuje pacienta a může vést až k astmatickému záchvatu. Z tohoto důvodu jsou proti invazivním vyšetřením často vznášeny etické námitky s tím, že lékař by měl člověku obtížně léčit a ne je vyvolávat a to ani v zájmu stanovení diagnózy. Bronchoprovokační test se specifickým podnětem našel místo v pracovním lékařství, kdy je zapotřebí prokázat profesionální původ nemoci. Toto vyšetření se provádí jen na specializovaných pracovištích a

⁸ mukóza – sliznice [5].

⁹ lumen – vnitřek trubicovitého orgánu, zejména cévy, průdušky aj. [5].

¹⁰ spirometrie – metoda určená k vyšetření dechových funkcí plic [5].

vyžaduje zvláštní opatrnost, protože účinek profesionálních dráždivých látek není předvídatelný a může vyvolat i těžkou klinickou reakci.

Analýza dechového kondenzátu je poměrně novou metodou, která představuje alternativní cestu, kterou je možné charakterizovat jako zcela neinvazivní a i pro dětského pacienta nezatěžující diagnostickou metodu. Princip metody spočívá v kvantifikaci specifických látek - „biomarkerů“ pro uvedené onemocnění, které se vyskytují v uvedené tělní tekutině a jejichž koncentrační hladina je v důsledku probíhající zánětlivé reakce v dýchacích cestách a plicích významně zvýšena. K analýze dechového kondenzátu se používají biochemické metody, nebo metody využívající vysoce citlivé a specifické techniky na bázi hmotnostní spektrometrie.

Biomarkery *asthma bronchiale* jsou cysteinylované leukotrieny tj. LTC₄, LTD₄ a LTE₄. Vzhledem k jejich probíhající vzájemné přeměně pozorované i ve vzorku KVV (viz. kapitola 3.1) se jeví nejspolehlivějším stanovení jejich součtu tj. koncentrace těchto látek jako celku a nikoliv koncentrace jednotlivých leukotrienů.

5. Oxidativní stres

Oxidativní stres je proces vedoucí ke vzniku velkého množství volných kyslíkových radikálů.

Mezi choroby, na jejichž patogenezi se významně oxidativní stres podílí, patří mimo jiné azbestóza a silikóza často ústící v rakovinu plic. Oxidativnímu stresu jsou také oproti nekuřákům podstatně výrazněji vystaveni kuřáci.

Volné radikály jsou všeobecně velmi reaktivní molekuly mající nepárové elektrony. Jsou produkovány kontinuálně v buňkách jako produkt jejich metabolismu nebo únikem z mitochondriálního dýchacího cyklu. V mnoha reakcích vznikají ty nejreaktivnější kyslíkové radikály např.: superoxidový anion, peroxidový anion nebo hydroxylový radikál. Buňky samy mají obsáhlou sadu antioxidačních mechanismů, které zabraňují tvorbě těchto radikálů a eliminují jejich ničivý efekt. Reaktivní volné radikály, které vznikají uvnitř buňky, mohou oxidovat biomolekuly, čímž mohou buňku poškodit nebo dokonce zničit. V patogenezi řady nemocí je působení volných radikálů zahrnuto, jenže chybí dostatečně citlivá metoda pro detekci těchto velmi krátce žijících molekul přímo v živém systému. Díky tomuto analytickému problému je řada představ o působení volných radikálů nedokonalá či nevyjasněná. Proto u mnohých onemocnění není stále jasno, zda-li jsou volné radikály příčinou onemocnění nebo zda-li jsou formovány jako důsledek onemocnění. Z tohoto důvodu je dnes nutné nacházet biomarkery pro oxidativní stres, které mohou být využity v objasnění patogeneze chorob nebo mohou pomoci při hledání mechanismů působení různých xenobiotik [15].

8-isoprostan se jeví jako jeden z těchto vhodných markerů a vzhledem k tomu, že je, za pomoci naší metody, možné snadno stanovit jeho hladinu vedle leukotrienů, byl přibrán jako další analyzovaná látka.

6.1 HPLC/MS

Tato podivná zkratka v sobě skrývá tandem dvojice velmi přesných instrumentálních analytických metod. HPLC – High Performance Liquid Chromatography, česky vysokoúčinná kapalinová chromatografie je jednou z velmi přesných a citlivých moderních metod separace látek. Umožňuje dělení většiny organických i anorganických látek a užívá se hlavně pro separaci tepelně nestálých a málo těkavých látek. Na rozdíl od plynové chromatografie (GC - Gas Chromatography) zde hraje, kromě typu a složení kolony, velkou roli také složení mobilní fáze.

MS – Mass Spectrometry, česky hmotnostní spektrometrie je fyzikálně-chemická metoda umožňující určení hmotností atomů a molekul dopadajících ve formě iontů na detektor. Ve spojení s HPLC nebo jiným druhem chromatografie je tato metoda vhodná pro stanovení stopových látek.

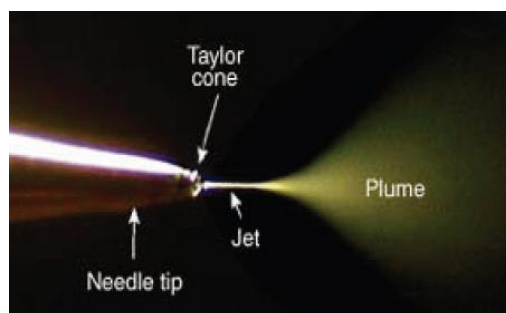
Aby bylo možné látky analyzovat pomocí hmotnostní spektrometrie, je třeba je nejprve převést do plynné fáze a ionizovat je. Vzhledem k tomu, že na chromatografické koloně se látky nacházejí v kapalně fázi je toto spojení náročné, protože u starších typů ionizace (electron impact - ionizace nárazem elektronu nebo chemická ionizace) bylo nutné látky před vlastní ionizací odpařit, což mohl být s ohledem na jejich termickou stabilitu problém. Proto jsou nyní využívány novější metody, které nevyžadují odpaření před vlastní ionizací:

ESI – ionizace elektrosprejem [14]

ESI umožňuje současně odpařit rozpouštědlo a ionizovat látku, proto se velmi dobře hodí právě pro spojení HPLC s MS. Kapičky roztoku jsou vystřikovány při atmosférickém tlaku proti proudu ohřátého dusíku, který pomáhá odpařování rozpouštědla, přičemž je vloženo napětí 3-5 kV mezi výstupní kapiláru (tzv. jehlu) chromatografu a vnější plášť elektrospreje. Díky povrchovému napětí, tlaku a vysokému elektrickému poli vytvořeného na povrchu roztoku vznikají malé nabitě kapičky. Z těchto kapiček se kromě rozpouštědla odpařují plynné ionty studované látky¹¹. Ty jsou dále vtahovány nabitou kapilárou a postupují do analyzátoru.

**Obrázek 3: Funkce ESI.
Jet – proud analytu s rozpouštědlem
Needle tip – hrot jehly**

převzato



¹¹ Jedná se o jev vypařování iontů - *Ion Evaporation* –IE [16]

APCI – chemická ionizace za atmosférického tlaku

Chemická ionizace za atmosférického tlaku má obdobnou instrumentaci jako elektrosprej s tím rozdílem, že dochází k reakci mezi ionizačním plynem a sledovanou látkou – nejde tedy o přímou ionizaci - a stejně jako ESI se nejčastěji používá při spojení s kapalinovou chromatografií.

Zejména díky těmto ionizačním technikám bylo umožněno analyzovat látky vyšších molekulových hmotností, jejichž analýza byla před tím dost obtížná nebo dokonce nemožná. Hmotnostní spektrometrie tak opouští čistě chemické obory a bývá stále častěji využívána všude tam, kde je nutné analyzovat různé biologické materiály, ve kterých se studované látky vyskytují v koncentracích řádově pg/ml. Již dnes je tato technika využívána například v toxikologii, při analýze metabolitů drog v tělních tekutinách nebo při analýze proteinů.

6.2 Hmotnostní spektrometr

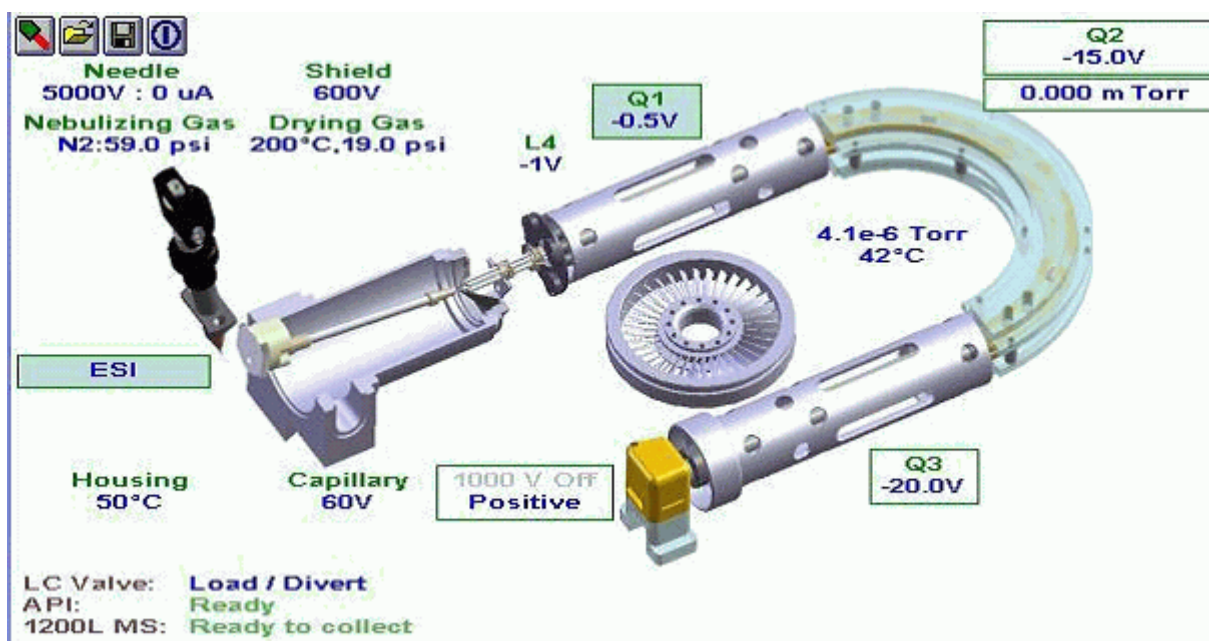
Nyní bych se rád věnoval podrobnějšímu popisu instrumentace HPLC/MS. Budu vycházet z mnou používaného přístroje Varian 1200L. Základními jednotkami jsou pumpy mobilní fáze, vlastní HPLC kolona, často se zařazenými předkolumnami a postkolumnami, a vlastní hmotnostní spektrometr. Velmi užitečným pomocníkem je také autosampler a celé měření samozřejmě řídí počítač. Mobilní fáze je ze zásobních lahví čerpána pumpami přes



Obrázek 4:
Hmotnostní
spektrometr
Varian 1200 L
používaný pro
analýzy
s připojeným
ionizačním
modulem pro
APCI (při
analýzách
však byl
užíván ESI)
foto: autor

degasser (odplyňovač) a v šestihlavém ventilu je k ní napichován vzorek. Následně mobilní fáze se vzorkem pokračuje na předkolonu a kolonu. Za kolonou je zařazena ještě hlava pro přímé napíchnutí vzorku (direct inject), kterou je možné ovládat ručně a je tedy možné napíchnout vzorek i bez průchodu kolonou přímo do hmotnostního spektrometru. Tato hlava ústí do iontového zdroje (ESI nebo APCI) a do hmotnostního spektrometru (obrázek 4).

Hmotnostní spektrometr se skládá z nasávací kapiláry (capillary), trojitého kvadrupólu (Q1, Q2, Q3), jehož funkce závisí na zvoleném modu, a citlivého detektoru (zlatá krabice). Uvnitř spektrometru je neustále udržováno vakuum pomocí turbomolekulární pumpy (kruh uprostřed). Na obrázku 5 můžete vidět schéma získané z ovládacího softwaru.



Obrázek 5: Schéma hmotnostního spektrometru. Převzato z ovládacího softwaru Varian.

6.3 Použité přístroje vybavení a chemikálie

Přístroje

Odběr KVV: Kondenzátor vydechovaného vzduchu (EcoScreen, Jaeger, Germany)

HPLC/MS: Systém vysoce účinné kapalinové chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem sestávající z:

- dusíkový generátor (M 365, Peak Scientific, UK)
- autosampler (automatický dávkovač) (Auto Sampler 410, Varian, USA)
- vysokotlaké pumpy pro HPLC (Pro Star 210, Varian, USA)
- HPLC kolona (Thermo Hypercarb: 100x2,1 mm, part. size 5 μ m, Thermo, USA)
- hmotnostní spektrometr (1200 L, Varian, USA)
- dávkovač pro direct inject (Pump 11, Harvard Apparatus, USA)

Rozpouštědla

Metanol LC/MS grade (Riedel de Haën, Německo)

Voda LC/MS grade (Riedel de Haën, Německo)

Acetonitril LC/MS grade (Riedel de Haën, Německo)

Roztok NH₃ ve vodě 28 % (Aldrich, USA)

Plyny

Vzduch technický (SIAD, ČR)

Argon technický (SIAD, ČR)

Dusík technický (SIAD, ČR)

Standardy

Leukotrien B₄ (Cayman Chemical, USA)

[6, 7, 14, 15 ²H] Leukotrien B₄ (Cayman Chemical, USA)

[20,20,20 ²H] Leukotrien E₄ (Biomol, USA)

8-isoprostan (Cayman Chemical, USA)

[3,3,4,4 ²H] 8-isoprostan (Cayman Chemical, USA)

Cysteinyl leukotriens (Biomol, USA)

Sorbenty

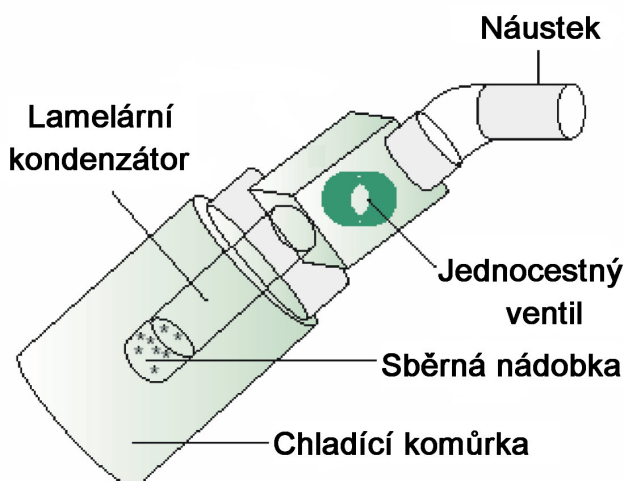
Imunoafinitní sorbent pro cysteinylované leukotrieny (Cayman Chemical, USA)

Imunoafinitní sorbent pro 8-isoprostan (Cayman Chemicals, USA)

7.1 Odběr a zpracování vzorků

Pro analýzu byly získány 3 úplné sady vzorků a jedna neúplná (chybí večerní a půlnoční vzorek), odebrané v průběhu jednoho dne. Vzorky byly odebrány za pomoci přístroje EcoScreen (Jaeger, Německo) na Ústavu pracovního lékařství 1.LF UK v Praze. První odběr byl proveden v 7 hodin ráno, druhý v půl jedné odpoledne, třetí v šest hodin večer a čtvrtý o půlnoci. Zmíněné časy nejsou s ohledem na dobu potřebnou k odebrání KVV přesné.

Na obrázku 6 můžete vidět schéma kondenzátoru vydechovaného vzduchu. Kondenzátor se skládá z náustku, jednocestného ventilu pro separaci vdechovaného a vydechovaného vzduchu (kondenzátorem prochází pouze vydechovaný vzduch), chladiče, který užívá protiproudý chladičí okruh, který umožňuje provádět odběr při -20°C , a pneumotachografu – přístroje, který zaznamenává celkový objem vydechnutého vzduchu, průměrný objem jednoho výdechu a také stopuje čas.



Obrázek 6: Schéma kondenzátoru vydechovaného vzduchu. Převzato z [1]

Pro odběr byla zvolena doba 15 minut. Za tuto dobu byly získány 2 – 3 ml KVV. Na obrázku 7 můžete vidět kondenzátor vyjmutý z chladičího zařízení a na obrázku 8 vlastní průběh odběru. Nároky na pacienta při odběru jsou minimální. Pacient pouze klidně dýchá, přičemž je vyloučeno dýchání nosem a nesmí dojít ke kontaminaci slinami. Bezprostředně po odběru byla ještě změřena spirometrie.

Vzorek byl ihned po odebrání zmražen na -80°C . Skladování za takto nízkých teplot je klíčová pro uchování sledovaných markerů, protože v matrici KVV může probíhat jednak

degradace molekul v důsledku vysoké (laboratorní) teploty, ale také jejich další přeměny díky přítomným enzymatickým systémům.



Obrázek 7 (vlevo): Kondenzátor se sběrnou nádobkou vyjmutý z chladicí komůrky
Obrázek 8 (vpravo): Průběh odběru KVV.

2x foto: autor

7.2 Příprava vzorků pro HPLC/MS analýzu

Zamražené vzorky byly v termosce převezeny z 1.LF UK na VŠCHT, kde byla zahájena jejich příprava pro analýzu. Vzhledem k velmi nízké koncentraci leukotrienů v KVV (1 – 200pg/ml) bylo nutné látky před vlastní analýzou separovat a zakonzentrovat.

Ve stadiu přípravy je nyní separace pomocí tzv. imunomagnetické separace. Jde o metodu, kdy v prvním kroku je připravena magnetická částice (kulovitá mikročástice Fe_2O_3 , pokrytá inertním polymerem na bázi polyurethanu) Dynabead 280 M (DYNAL, Norsko) aktivovaná tosylovými reaktivními skupinami, jejímž prostřednictvím je k povrchu navázána monoklonální protilátka (anti-cys-leukotrien). Tyto částice jsou následně přidány ke KVV a téměř okamžitě probíhá reakce mezi leukotrieny a jejich antigeny.

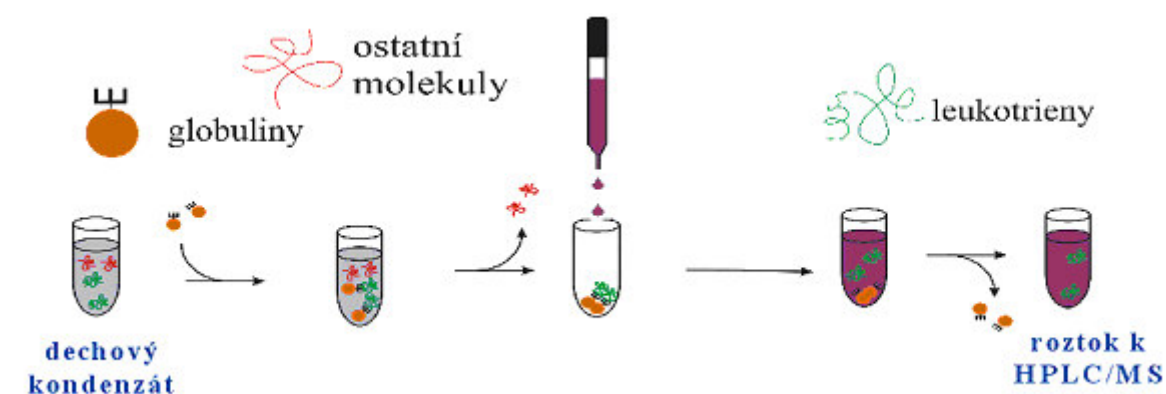
Pro zpracování byla ovšem zvolena starší osvědčená metoda separace pomocí imunoafinitního sorbentu [1]. Základem této metody je vznik komplexu antigen-protilátka. Základní charakteristikou reakce mezi antigenem a protilátkou je její vysoká specifita. Tedy pokud je k dispozici specifická protilátka – monoklonální protilátka, může být při použití vhodné laboratorní techniky provedena extrakce sledovaného antigenu z biologického vzorku kvantitativně a téměř exklusivně (minimální podíl nespecifických reakcí).

Vývoj dále popsané metody analýzy vzorků byl předmětem dřívější práce Kamily Syslové [1] a Lukáše Chytila [14] na ÚOT VŠCHT.

Při zpracování vzorků jsem použil následující postup: Ihned po rozmrznutí bylo k 1 ml vzorku přidáno 250 pg deuterovaných vnitřních standardů 8-isoprostanu-d₄, LTB₄-d₄ a LTE₄-d₃ (Biomol, USA). Deuterované látky mají stejné chemické a fyzikální vlastnosti, ale liší se pouze molekulovou hmotností, čehož se s výhodou využívá při hmotnostně-spektrometrických analýzách. Díky přidání tohoto známého množství značené látky můžeme na konci při analýze vyhodnotit ztráty způsobené pobytem vzorků při laboratorní teplotě během extrakce a současně vyloučíme náhodnou chybu.

Následně bylo k 1 ml vzorku s vnitřními standardy přidáno 50μl suspenze cysteinyl leukotriens affinity sorbents a 50μl suspenze 8-isoprostane affinity sorbents (Cayman Chemicals, USA). Vzorky byly 60 minut protřepávány na laboratorní třepače a následně 10 minut odstředovány. KVV nad sorbentem byl opatrně odsát a znehodnocen. Následně byl sorbent promyt 1ml destilované vody, 5 minut třepán a opět 10 odstředován. Promytí bylo ještě jednou zopakováno. Po odsátí vody po druhém promytí bylo přidáno 0,5ml ledového metanolu pro uvolnění komplexů a opět byl vzorek 5 minut protřepáván a 10 minut odstředován. Methanol nad sorbentem byl přenesen do čisté polypropylenové zkumavky a přidání metanolu bylo ještě jednou zopakováno. Zbylý sorbent byl znehodnocen. Metanolvé extrakty byly spojeny a metanol byl odpařen jemným proudem dusíku.

Zbytek po odpaření metanolu byl zmražen (-80°C) do doby, než bylo přikročeno k HPLC/MS analýze.



Obrázek 9: Schéma immunoafinitní extrakce použité pro zpracování vzorků.

7.3 Optimalizace podmínek analýzy

Pro analýzu byl použit hmotnostní spektrometr 1200 L s trojitým kvadrupólem vyrobený firmou Varian (USA). Chromatografické dělení bylo uskutečněno za použití kolony Hypercarb Thermo (100 x 2,1 mm x 5 µm) s mobilní fází acetonitril:voda:amoniak = 70 : 30 : pH=11 při isokratickém uspořádání a průtoku 200 µl/min. Byla použita elektrosprejová ionizace (ESI) v negativním modu a velmi citlivý a selektivní tzv. MRM (Multiple Reaction Monitoring) mod. Jeho principem je izolace specifického analytu (měřené látky) na prvním kvadrupólu, jeho podrobení srážkově-indukované disociaci (CID) na druhém kvadrupólu a detekci charakteristického fragmentu na třetím kvadrupólu.

Vzhledem k tomu, že použitý hmotnostní spektrometr nedávno před mými měřeními nahradil starší stroj (kvůli technickým problémům) téměř shodné konstrukce – bylo nutné provést znovu optimalizaci staré metody. Tato optimalizace byla provedena pomocí komerčně dostupných standardních vzorků leukotrienů a 8-isoprostanu bez použití chromatografické kolony. Podmínky na hmotnostním spektrometru byly optimalizovány z hlediska dosažení maximální citlivosti stanovení na následující hodnoty: napětí na kapiláře -70 V, tlak kolizního plynu (argon) využívaného pro srážkově-indukovanou disociaci (CID) 0.2 Pa. Kolizní energie a specifické fragmenty jakožto výsledky série optimalizačních experimentů jsou uvedeny v tabulce 1 pro každý jednotlivý analyt.

Tabulka 1 Relativní hmotnosti specifických fragmentů a kolizní energie pro jednotlivé biomarkery

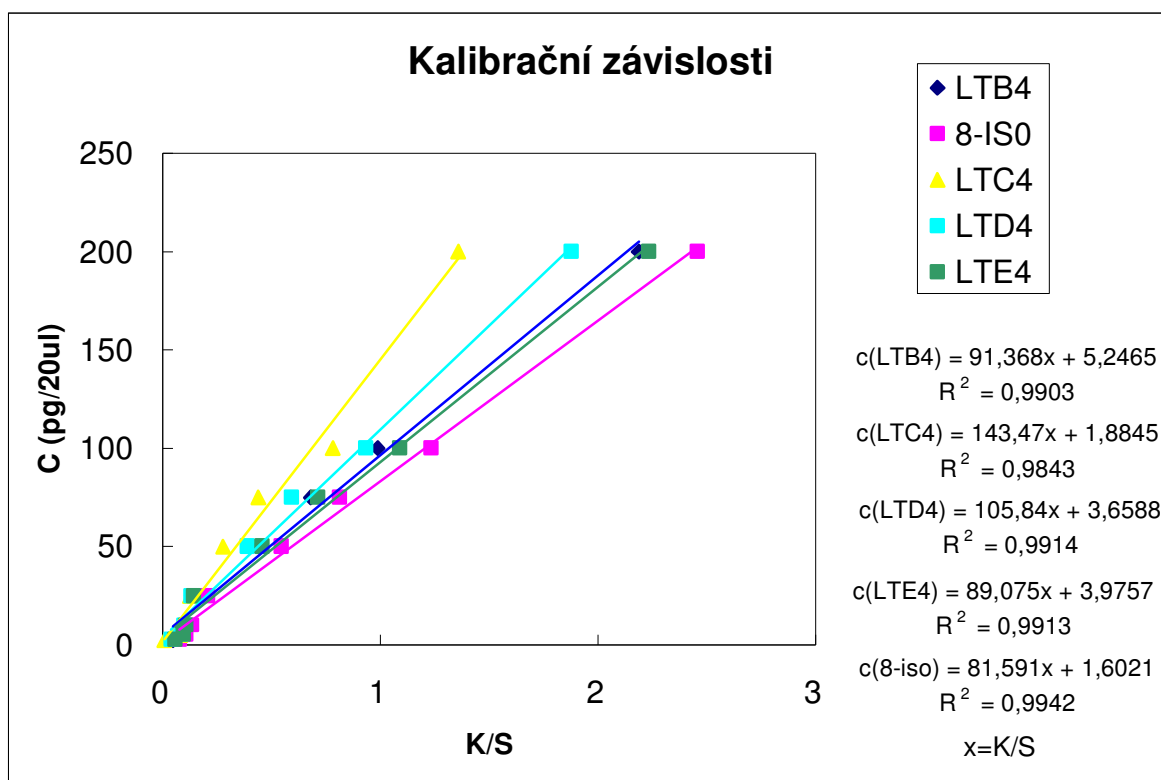
Analyt	CID	Kolizní energie (eV)
<i>LTB₄</i>	335,1 → 279,4	19
<i>LTB₄-d₄</i>	339,1 → 198,1	19
<i>LTC₄</i>	624,3 → 271,3	22
<i>LTD₄</i>	495,2 → 265,1	19
<i>LTE₄</i>	438,2 → 333,0	19
<i>LTE₄-d₃</i>	441,2 → 336,5	19
<i>8-isoprostan</i>	353,1 → 184,0	28
<i>8-isoprostan-d₄</i>	357,1 → 197,6	28

Další parametry přístroje byly převzaty z původní metody: napětí na jehle ESI: -4500 V, teplota sušícího plynu (dusík) 300°C. Napichované množství vzorku bylo 20μl.

7.4 HPLC/MS analýza

Před vlastní analýzou byly zamražené vzorky rozpuštěny v 50μl mobilní fáze a následně bylo přikročeno k vlastní analýze. Byla provedena kalibrace se standardními hodnotami koncentrací leukotrienů: 2,5 pg/20μl, 5 pg/20μl, 10 pg/20μl, 25 pg/20μl, 50 pg/20μl, 75 pg/20μl, 100 pg/20μl a 200 pg/20μl a s jednotnou koncentrací deuterovaných standardů leukotrienů (100 pg/20μl). Následně byly naměřeny vzorky a opět byla provedena kalibrace. Výsledkem byly chromatogramy se známými plochami píků pro jednotlivé analyty a jejich deuterované protějšky.

Na základě poměrů (K/S) integrovaných ploch píků (použit software Varian WS Workstation) obyčejných (označeny K) a deuterovaných leukotrienů (označeny S) resp. 8-isoprostanu a známých koncentrací napichovaných roztoků byly vytvořeny kalibrační přímky (obrázek G10). Následně byly z rovnic těchto přímek vypočteny hodnoty koncentrací v KVV sledovaných osob.



Obrázek G10: Kalibrační přímky pro jednotlivé leukotrieny a 8-isoprostan

8. Výsledky a diskuse

Získané výsledky shrnuje tabulka 3. Jednotlivým osobám, které se podrobily výzkumu, byla pro usnadnění práce přiřazena čísla 01 – 04. Podobně odběry jsou značeny podle pořadí čísla 1 – 4. V tabulce 2 jsou bližší údaje o zkoumaných osobách, které mohou být užitečné pro interpretaci výsledků. Vzorky KVV byly odebrány v běžný pracovní den.

Tabulka 2: Zkoumané osoby

Osoba	pohlaví, věk	Podrobnosti
01	žena, 19	náběh na astma, sport: karate, nekuřák
02	žena, 19	zdravá, doma se kouří – vystavení oxidativnímu stresu
03	žena, 19	zdravá, sport: lehká atletika, nekuřák
04	muž, 18	léčený pylový alergik, sport: aerobik, nekuřák

Tabulka 3: Naměřené koncentrace biomarkerů v 1ml KVV

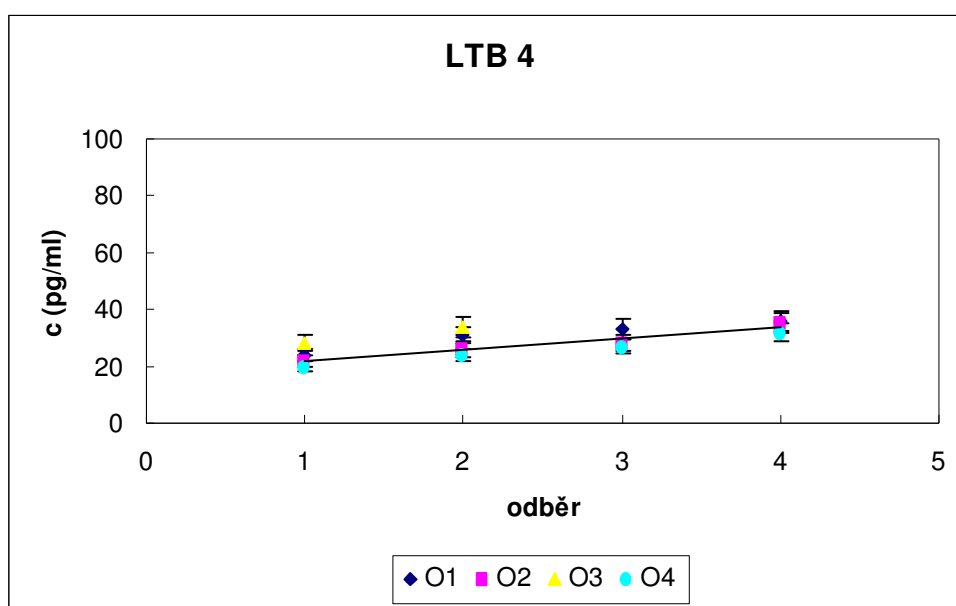
	8-isoprostan		cysLTs			
	LTB ₄ (pg/ml)	(pg/ml)	LTC ₄ (pg/ml)	LTD ₄ (pg/ml)	LTE ₄ (pg/ml)	(pg/ml)
01_1	24	25	65	23	26	114
01_2	31	29	68	25	34	127
01_3	33	31	73	28	36	137
01_4	36	36	74	31	39	144
02_1	22	51	44	11	24	79
02_2	26	57	47	12	25	84
02_3	28	65	53	15	28	96
02_4	35	69	55	19	31	105
03_1	28	29	30	15	30	75
03_2	34	33	34	13	33	80
04_1	20	28	33	18	26	77
04_2	24	33	35	25	29	89
04_3	27	36	41	29	31	101
04_4	32	38	42	34	35	111

Hodnoty LTB₄ jsou u všech osob přibližně stejné a na nízké hodnotě, což značí, že žádná ze zkoumaných osob netrpí akutním zánětem. Podobně je tomu i u cysteinylolvaných leukotrienů. Pouze u osoby 01 jsou mírně zvýšené, což koresponduje s jejím náběhem na astma, nemělo by se však jednat o nic vážného, což odpovídá realitě. Pro srovnání, koncentrace sumy cysLTs osoby 01 se pohybuje kolem 130 pg/ml, zatímco u osob více postižených astmatem se pohybuje kolem 160 pg/ml a u zdravých osob se pohybuje kolem 90 pg/ml [1]. Hodnoty 8-isoprostanu jsou mírně zvýšené u osoby 02, což odpovídá

její zvýšené expozici cigaretovému kouři jakožto prokázanému původci oxidativního stresu. Opět uvádím pro srovnání, že průměrná koncentrace zdravých osob je 40 pg/ml, u osoby O2 je tato koncentrace v průměru 60 pg/ml a u osob postižených silikózou se pohybuje v průměru kolem 120 pg/ml, jsou ale zaznamenávány i hodnoty blížící se 160 pg/ml [14].

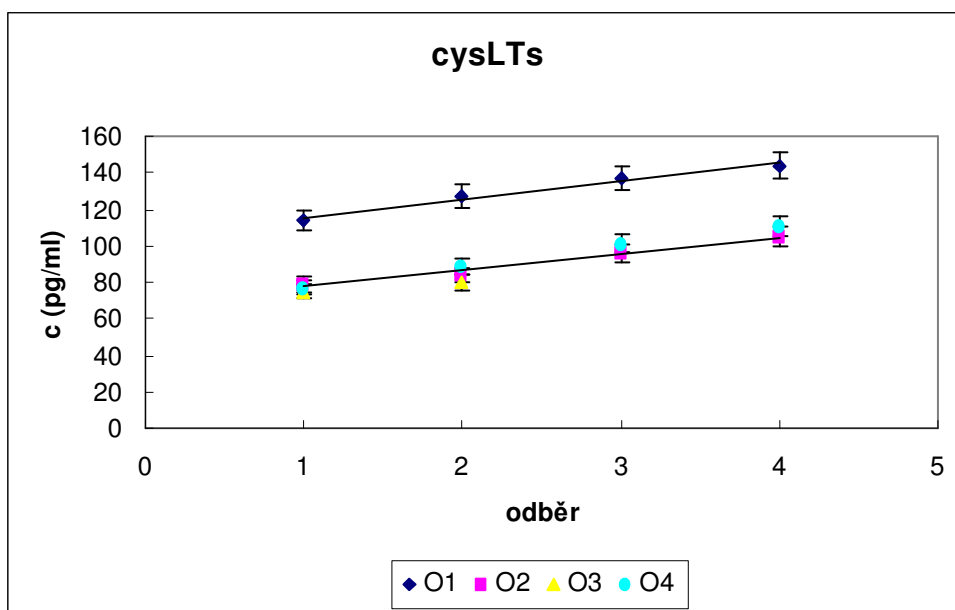
Poněkud lépe budou výsledky vidět v grafickém znázornění na obrázcích G11 – G13.

V grafech jsou na vodorovné ose vynesena pouze čísla odběrů. Intervaly mezi odběry byly stejné. Časy odběrů byly: 1. 7:00, 2. 12:30, 3. 18:00, 4. 23:30.



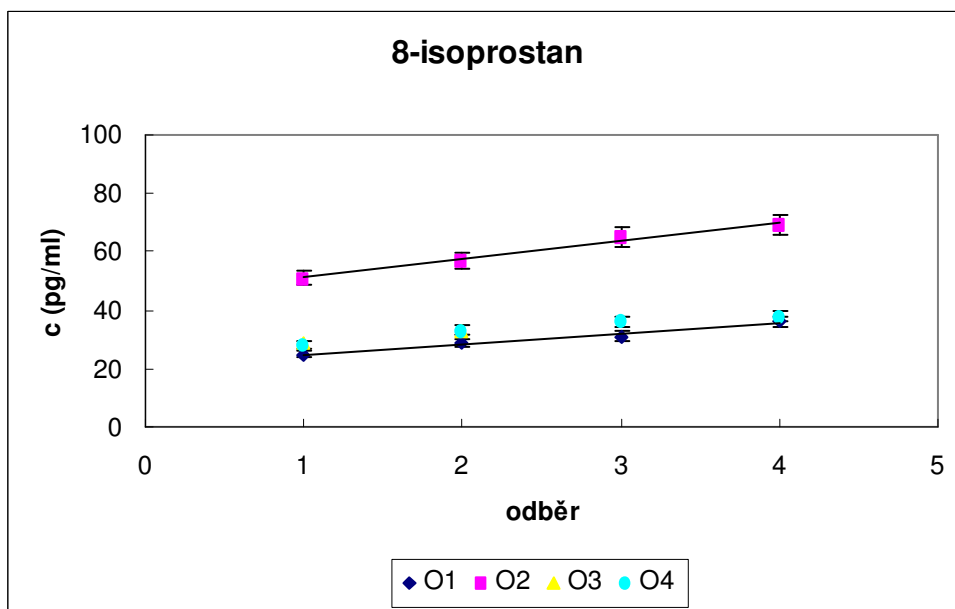
Obrázek G11: Vývoj hladiny LTB₄

Rozdíl koncentrací LTB₄ mezi ránem a večerem činí v průměru 11 pg/ml, což je vzhledem k jeho nízké koncentraci nárůst o 46%.



Obrázek G12: Vývoj hladiny cysLTs

Dílčí hodnoty jednotlivých cysLTs mohou být mírně zavádějící vzhledem k běžící přeměně $LTC_4 \rightarrow LTD_4 \rightarrow LTE_4$, komentuji proto součet koncentrací cysLTs, který je při stanovení diagnózy směrodatný. Tento součet vzrostl u zdravých osob průměrně o 30 pg/ml a o stejnou hodnotu vzrostl i u osoby 01. Procentuálně tedy vzrostl o 40% resp. 26%.



Obrázek G13: Vývoj hladiny 8-isoprostanu

Koncentrace 8-isoprostanu měla na rozdíl od leukotrienů u zdravých osob i u osoby 02 shodný procentuální nárůst a to 35%. Značně se však liší absolutní čísla: nárůst o 10 pg/ml u zdravých osob a o 18 pg/ml u osoby 02.

Jak můžete vidět na grafech, hladiny markerů během dne mírně rostou. To je pravděpodobně projevem aktivity organismu a též vnějších vlivů, kterým je organismus v běžném pražském pracovním dni vystaven. Poněkud překvapivé je, že maximum koncentrace markerů nastává až v pozdních večerních hodinách a nikoliv během odpoledne, nebo navečer, jak jsem očekával. Toto značí, že hladina markerů ostře klesá ve spánku, kdy člověk dýchá klidně, tělo je v útlumu a regeneruje.

9. Závěr:

Cílem předkládané práce bylo objasnit vývoj koncentrací leukotrienů a 8-isoprostanu v KVV jakožto markerů *asthma bronchiale* resp. postižení oxidativním stresem v průběhu dne. Pro extrakci z KVV a stanovení koncentrací sledovaných markerů byla použita metoda immunoafinitní separace v kombinaci s HPLC/MS analýzou. Zjištěné výsledky ukazují, že koncentrace markerů rostou od rána do pozdního večera o 10 – 20 pg/ml, což činí 25 - 40% ranních hodnot. Vývoj koncentrace lze popsat lineární závislostí. V průběhu spánku potom dochází k propadu koncentrace na původní hodnotu. Poklesy koncentrací spojené se spánkem mohou být předmětem dalšího výzkumu.

Výše zmíněný rozdíl mezi ranním a večerním odběrem dobře koresponduje i se starším méně podrobným screeningem provedeným v počáteční fázi vývoje diagnostiky.

Vývoj diagnostiky bude dále směřovat k vytvoření modelového biochipu na bázi immunomagnetické separace sledovaných markerů a odstartování větší klinické studie, která by potvrdila možnost zavedení této metody do praxe.

Literatura

- [1] Syslová K.: Vývoj neinvazivní diagnostiky *asthma bronchiale* metodou kombinující immunoafinitní separaci s hmotnostně spektrometrickou detekcí, soutěž „O cenu Shimadzu2006“ (2006).
- [2] Montuschi P., Barnes J. P., Trends in Pharmacological Sc. 23 (2002) 232
- [3] Takamoto M., Yano T., Shintani T., Hiraku S., J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis 13 (1995) 1465.
- [4] Suzuki N., Hishinuma T., Abe F., Omata K., Ito S., Sugiyama M., Mizugaki M., Prostaglandins and other Lipid Mediators 62 (2000) 395.
- [5] Vogurka M., Hugo J., Praktický slovník medicíny, Maxdorf (1998).
- [6] Busse W. W., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 157 (1998) 210.
- [7] Hanazawa T., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 162 (2000) 1273.
- [8] Voet D., Voet J. G., Biochemie, Victoria Publishing (1995).
- [9] Montuschi P., Clinica Chimica Acta 356 (2005) 22-34.
- [10] Nowak D., Free Radic. Biol. Med. 15 (2001) 178.
- [11] Montuschi P., Am. J. Resp. Crit. Care Med. 162 (2000) 1175.
- [12] Montuschi P., Am. J. Respir. Crit Care Med. 160 (1999) 216.
- [14] Chytil L.: Analýza dechového kondenzátu metodou HPLC/MS, diplomová práce ÚOT VŠCHT Praha (2006).
- [15] Zwert L. L., Meermann J. H. N., Commandeur N. M., Vermeulen N. P. E., Free Radic. Biol. Med. 26 (1999) 202.
- [16] Gaskell S. J.: J. Mass Spectrom. 32 (1997) 677.
- [17] http://www.vscht.cz/eds/knihy/uid_es-002/hesla/kyselina_arachidonova.html (23.2.2007).
- [18] <http://www.pediatricopropraxi.cz/pdfs/ped/2003/04/13.pdf> (23.2.2007).