

## HPLC STANOVENIE OXIDAČNÉHO POŠKODENIA DNA V PERFUZÁTOCH PEČENE POTKANOV VPLYVOM PRÍDAVKU MEDI

CSILLA MIŠLANOVÁ<sup>a,b</sup>, ANTON KEBIS<sup>c</sup>,  
JANA PRÍBOJOVÁ<sup>a</sup> a MARTINA  
VALACHOVIČOVÁ<sup>a</sup>

<sup>a</sup> *Fakulta ošetrovateľstva a zdravotníckych odborných štúdií, Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave, Limbová 12, 833 03 Bratislava,* <sup>b</sup> *Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, 842 15 Bratislava,* <sup>c</sup> *Fakulta verejného zdravotníctva, Slovenská zdravotnícka univerzita v Bratislave, Limbová 12, 833 03 Bratislava*  
mislanova@fns.uniba.sk

Došlo 15.8.14, prepracované 24.4.15, prijaté 4.5.15.

Kľúčové slová: elektrochemická detekcia, HPLC, 8-oxodG, pečeň, poškodenie DNA

### Úvod

V eukaryotických organizmoch je kyslík čiastočne redukovaný na formu reaktívnych kyslíkových foriem (ROS). Niektoré z nich majú nespárený elektrón, čoho výsledkom je vznik radikálov, vrátane hydroxylového radikálu (OH•) a superoxidového aniónu (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). Voľné ROS môžu spôsobiť rozsiahle poškodenie všetkých hlavných skupín biochemických makromolekúl, vrátane peroxidácie lipidov, fragmentácie bielkovín a modifikácie DNA<sup>1,2</sup>. Najreaktívnejší voľný kyslíkový radikál je hydroxylový radikál, ktorý môže spôsobiť poškodenie biomolekúl. Je obtiažne objasniť presné mechanizmy a význam oxidačného poškodenia. Jedným z dôležitých faktorov obtiažnosti je nedostatok presnosti a správnosti pri meraní oxidačnej DNA. Oxidácia guanínu v molekule DNA počas prípravy vzorky je vážnym artefaktom. Pre eliminovanie tohto problému je nevyhnutná štandardizácia protokolu, ako aj redukcia variability a chýb pri rôznych spôsoboch úpravy vzorky. Európska štandardná komisia pre oxidačné poškodenie DNA (ESCODD) vznikla v roku 1997 s 27 analytickými laboratóriami ako členmi. Komisia bola zameraná predovšetkým na vyriešenie metodologických problémov a zlepšenie správnosti a špecificity meraní 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanozínu (8-oxodG), produktu oxidácie 2-deoxyguanozínu (2-dG), ktorý je najčastejším sledovaným markerom oxidačného poškodenia DNA<sup>3-6</sup>.

Prechodné kovy sú schopné zúčastňovať sa na reakciách, pri ktorých sa tvoria voľné radikály. Je známe, že vytváranie vysoko reaktívnych hydroxylových radikálov je možné len v prítomnosti prechodných kovov (zvyčajne Fe

alebo Cu) a hydroperoxidu. Meď a železo sa spolu s peroxidom vodíka zúčastňujú Fentonovej a iných reakcií, počas ktorých sa tvoria potenciálne reaktívne kyslíkové formy, ktoré môžu poškodzovať DNA a vytvárať modifikácie zahrnuté v mutagenézi, karcinogenézi, stárnutí a niektorých degeneratívnych ochoreniach<sup>7-9</sup>. Len neviazané ióny kovov sú toxické. Meď a železo sú esenciálne stopové prvky, ktoré začínajú byť celistvými zložkami dôležitých enzýmov a makromolekúl buniek<sup>10,11</sup>. Na rozdiel od železa, koncentrácie medi nielen v krvi, ale aj v jednotlivých orgánoch, sú udržiavané na konštantnej úrovni a môžu indikovať prítomnosť robustných mechanizmov pre homeostázu. V dôsledku expozície vysokému množstvu medi môže dôjsť k poškodeniu buniek a ich zložiek najmä prostredníctvom reaktívnych foriem kyslíka<sup>12</sup>.

Výsledky analýz 8-oxodG vo vzorkách ako sú tkanivá či bunky sú často vzťahované na nemodifikovanú bázu (8-oxodG/2-dG) a vyžadujú enzymatické štiepenie DNA pre uvoľnenie a meranie voľnej formy 8-oxodG. Merania tohto typu predstavujú oxidačné poškodenie v špecifickom mieste odberu vzorky v čase odberu<sup>13</sup>. Alternatívou je analýza 8-oxodG ako produktu opravy v moči<sup>14-16</sup>, ktorý pravdepodobne odráža stupeň oxidačného poškodenia DNA v celom organizme. Autori Peoples a Karnes<sup>17</sup> predstavili súčasné analytické metódy s prihliadnutím na predúpravu vzorky a inštrumentáciu pre analýzu 8-oxodG v moči.

Analytické metódy pre meranie biomarkerov oxidačného poškodenia sa zamerali na dosiahnutie citlivej detekcie a zdokonalenie postupov predúpravy vzorky. Priame postupy zahŕňajú chromatografické metódy<sup>18</sup>, ako vysokoúčinná kvapalinová chromatografia (HPLC) s rôznymi spôsobmi detekcie: laserovo-indukovaná fluorescencia<sup>19</sup>, elektrochemická<sup>20-23</sup> alebo hmotnostná spektrometria<sup>24-28</sup>; plynová chromatografia s hmotnostnou spektrometriou (GC-MS)<sup>2,4,29</sup>. Medzi alternatívne (enzymatické) metódy patrí napr. jednoduchá gélová elektroforéza buniek<sup>23</sup> alebo metódy založené na princípe enzýmom značeného imunisorbentu (ELISA)<sup>29-31</sup>.

V predloženej práci bola aplikovaná HPLC metóda s použitím analytickej kolóny Purospher® STAR C18e v sériovom zapojení elektrochemickej a spektrofotometrickej detekcie pre simultánne stanovenie 8-oxodG a 2-dG. Stupeň oxidačného poškodenia bol vyjadrený ako molárny pomer koncentrácií 8-oxodG a 2-dG po prídavku medi k perfuzátom pečene u potkanov. Cieľom našej práce bolo zistiť, či je toxicita medi v perfuzátoch pečene potkanov spojená s oxidačným poškodením DNA na vybranom modeli poškodenia pečene spôsobenej intoxikáciou meďou a ischémiou/reperfúziou.

### Experimentálna časť

#### Chemikálie a materiály

Analytické štandardy 8-oxo-2'-deoxyguanozín a 2'-deoxyguanozín boli dodané firmou Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Bezvodý dihydrogén fosforečnan draselný

(Suprapur), metanol HPLC čistoty, kyselina fosforečná (85%, p.a.) boli dodané firmou Merck (Darmstadt, Nemecko). Enzymy a roztoky tlmivých roztokov boli pripravené použitím ultračistej deionizovanej vody (vodivosť  $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ ) zo systému Simplicity UV185 (Millipore, Bedford, USA). Anestetika, hydrochlorid xylazínu ( $10 \text{ mg kg}^{-1}$ ) a hydrochlorid etamínu ( $120 \text{ mg kg}^{-1}$ ) boli z firmy Spofa a Léčiva (Praha, Česká republika). Všetky ostatné chemikálie a roztoky boli analytickej čistoty a boli používané bez ďalšieho čistenia.

### Prístroje

Pre HPLC analýzy bol použitý chromatografický systém HP 1200 (Agilent, USA) s kvartérnou pumpou, automatickým dávkovačom, s termostatovaním kolón, DAD detektorom v sérii zapojenom s coulometrickým detektorom Coulochem II (ESA, USA) s ochrannou celou typu 5020 a vysoko citlivou analytickou celou typu 5011A. Pre zber a vyhodnotenie údajov bol použitý program HP 3D Chemstation (Agilent, USA).

### Chromatografické podmienky

Na analýzu bola použitá analytická kolóna Purospher® STAR C18e ( $150 \times 4,6 \text{ mm}$ , I.D.,  $5 \mu\text{m}$ , Merck, Darmstadt, Nemecko) s predkolónou Purospher® STAR C18e ( $4 \times 4 \text{ mm}$ , I.D.,  $5 \mu\text{m}$ , Merck, Darmstadt, Nemecko). Použitou mobilnou fázou bol  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  fosforečnanový tlmivý roztok, pH 5,5 a metanol (92:8, v/v) pri prietoku mobilnej fázy  $0,6 \text{ ml min}^{-1}$  a teplote kolóny  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ; dávkované množstvo vzorky bolo  $50 \mu\text{l}$ . Vlnová dĺžka pre detekciu 2-dG bola  $254 \text{ nm}$  a potenciály na coulchemickom detektore boli nasledovné:  $+100 \text{ mV}$  pre ochrannú celú,  $+150 \text{ mV}$  a  $+400 \text{ mV}$  pre kanály E1 a E2 analytickej cely.

### Priprava tlmivých roztokov

*Homogenizačný tlmivý roztok (HB)* so zložením  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  Tris-HCl,  $0,4 \text{ mmol l}^{-1}$  NaCl,  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  deferoxamín mezylát (DF) bol pripravený v deionizovanej vode a pH 8,0 bolo upravené s HCl. Pred použitím bol pridaný Triton X-100 (Merck, Darmstadt, Nemecko), na výslednú objemovú koncentráciu 0,5 %.

*Ribonukleázový tlmivý roztok (RB)* pozostával z  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  Tris-HCl,  $0,4 \text{ mmol l}^{-1}$  NaCl v deionizovanej vode a pH bolo upravené na 8,0 s HCl.

*Hydrolyzačný tlmivý roztok:* a)  $1 \text{ mol l}^{-1}$  octan sodný s obsahom  $45 \text{ mmol l}^{-1}$   $\text{ZnCl}_2$  v deionizovanej vode, pH 4,8 bolo upravené s kyselinou octovou; b)  $1,5 \text{ mol l}^{-1}$  Tris-HCl roztok s pH 8,0 v deionizovanej vode.

### Priprava roztokov enzýmov

RNáza T1 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a RNáza IIIA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) boli pripravené s koncentráciou  $10^3 \text{ U ml}^{-1}$  a  $1 \text{ mg ml}^{-1}$ ; enzy-

my boli nariadené v roztoku RB a zohrievané 15 min vo vodnom kúpeli pri  $80 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Proteináza K (Roche Diagnostic GmbH, Mannheim, Nemecko) bola dodaná ako roztok pripravený pre priame použitie; P1-nukleáza – výsledná koncentrácia  $1100 \text{ U ml}^{-1}$ ; Alkalínfosfatáza (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) Grade I bola rozpustená v  $100 \text{ mmol l}^{-1}$  Tris-HCl s pH 8,0 na výslednú koncentráciu  $750 \text{ U ml}^{-1}$ . Aliquoty enzýmov boli uskladnené pri  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### Priprava zásobných roztokov štandardov

Roztoky štandardov 8-oxodG a 2-dG boli pripravené rozpustením približného množstva v deionizovanej vode. Presné koncentrácie štandardných roztokov 8-oxodG ( $500 \text{ nmol l}^{-1}$ ) a 2-dG ( $1 \text{ mmol l}^{-1}$ ) boli vypočítané zo známeho molárneho absorpčného koeficienta ( $10 \mu\text{mol l}^{-1}$  8-oxodG má absorbančiu 0,123 AU a  $10 \mu\text{mol l}^{-1}$  2-dG má absorbančiu 0,130 AU). Pracovné roztoky štandardov boli pripravené denne čerstvé riedením zásobných roztokov s  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  roztokom Tris-HCl, pH 7,3.

### Metódy

#### *Izolácia DNA zo vzoriek pečene*

Pre extrakciu a hydrolyzu DNA bol použitý postup doporučený autormi Ravanat a spol.<sup>33</sup>. K približne 300 mg pečene sa pridalo 4 ml ľadového HB s Triton X-100. Po homogenizácii v sklenenej homogenizačnej skúmavke po dobu cca 1 min bol homogenát v 15ml polypropylénovej skúmavke centrifugovaný pri  $1200 \text{ g}$  pri  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 10 min. Supernatant bol premytý 5 ml HB bez Tritonu-X a centrifugovaný 5 min pri  $1200 \text{ g}$  pri  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  a pelety boli rozpustené intenzívnym trepaním v 1 ml HB a výsledný objem bol doplnený tlmivým roztokom na 4,7 ml. Pridalo sa  $300 \mu\text{l}$  10% SDS a po premiešaní sa zmes inkubovala 10 min pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Potom sa pridalo  $200 \mu\text{l}$  enzýmu RNáza IIIA a  $10 \mu\text{l}$  enzýmu RNáza T1, zmes sa jemne premiešala a inkubovala 30 min pri  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Zmes bola ochladená na izbovú teplotu a prenesená do sklenených skúmaviek, pridal sa rovnaký objem (ako objem zmesi) chloroform:izoamylalkohol (24:1) a zmes sa intenzívne trepala 20 s. Zmes sa centrifugovala pri  $2400 \text{ g}$  10 min pri izbovej teplote. Postup bol opakovaný s hornou vodnou vrstvou.

Potom sa vodná vrstva preniesla do 15ml centrifugačnej skúmavky a zmeral sa presný objem (X). Pridalo sa Y ml 6 M-NaCl, pričom  $Y=0,311 \times X$ , roztok sa premiešal 10 s a centrifugoval 10 min pri  $2000 \text{ g}$  pri izbovej teplote. Supernatant bol opatrne preliaty do 50ml skúmavky a ochladený na ľade po dobu 15 min. Bol pridaný dvojnásobný objem ľadového etanolu, roztok sa jemne premiešal a nechal stáť na ľade 10 min. Etanol bol odpipetovaný a vzniknutá DNA bola trikrát premývaná 20 ml 70% ľadového etanolu. Zvyškový etanol bol odpipetovaný a DNA sa preniesla do mikroskúmavky, vysušila sa pod prúdom dusíka, pridalo sa  $400 \mu\text{l}$   $10 \text{ mmol l}^{-1}$  Tris-HCl, pH 7,3 a nechalo sa premiešavať cez noc v tme.

### Hydrolyza DNA

DNA sa rozpúšťala 2 h pri 37 °C, zmerala sa absorbancia pri 260 nm a 280 nm, pričom pomer absorbancií 260/280 nm bol mierou čistoty DNA. Absorbancia pri 260 nm bola použitá pre výpočet koncentrácie DNA, pričom 1 AU je ekvivalentná 50 µg ml<sup>-1</sup>. Pred hydrolyzou bol objem vzorky DNA upravený s 10 mmol l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 7,3 tak, aby 400 µl obsahovalo 140 µg DNA. Pridalo sa 10 µl zmesi 1 mol l<sup>-1</sup> octan sodný, 45 mmol l<sup>-1</sup> ZnCl<sub>2</sub>, pH 4,8 a 14 µl enzýmu P1 nukleáza (1100 U ml<sup>-1</sup>). Po premiešaní a inkubácii 1 h pri 37 °C sa pridalo 40 µl 1,5 mol l<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH 8,0 a 14 µl alkalínofosfatázy (750 U ml<sup>-1</sup>), zmes sa premiešala a inkubovala 30 min pri 37 °C. Potom sa roztok centrifugoval 5 min pri 10 000 g pri 4 °C a supernatant bol dávkaný do HPLC systému.

### Zvieratá a odber pečene

Samce potkana Wistar (250–310 g) boli zakúpené z Velaz Co (Praha, Česká republika). Počas experimentu mali v podmienkach konvenčného chovu prístup ku krmivu a vodovodnej vode *ad libitum*. Štúdia bola schválená etickou komisiou pracoviska (SZU) a Štátnou veterinárnou a potravinovou správou Slovenskej republiky. Pred operačným zákrokom bol zvieratám intraperitoneálne podaný ketamín/xylazín (120/10 mg kg<sup>-1</sup>). Odber pečene sa vykonal v celkovej anestézii zvierat podľa Kukana<sup>34</sup>.

### Perfúzia pečene

Izolovaná pečeň bola perfundovaná 60 min cez portálnu žilu v recirkulačnom perfúznom systéme bezkrvným Krebs-Henseleitovým roztokom (pH 7,4, s obsahom glukózy 10 mmol l<sup>-1</sup>) saturovaným 95 % O<sub>2</sub> a 5 % CO<sub>2</sub>. Meď (CuSO<sub>4</sub>) bola do perfúzneho roztoku pridaná na začiatku perfúzie v koncentrácii 0,00; 0,01 a 0,03 mmol l<sup>-1</sup>. Na konci perfúzie sa pečeň jemne osušila, odvážila a časť tkaniva z ľavého bočného laloku bola odobratá a zmrazená v tekutom dusíku pomocou predchladených Wollenbergových klieští. Zmrazené tkanivo sa následne uskladnilo pri teplote -70 °C až do analýz 8-oxodG a dG.

### Validácia HPLC metódy

Vo všeobecnosti, validovaná analytická metóda znamená, že poskytuje spoľahlivé a reprodukovateľné výsledky, pričom sú definované a overiteľné parametre a hlavné operačné podmienky. Hlavné parametre validácie sú uvedené v tab. I.

### Linearita

Kalibračné krivky boli pripravené v rozsahu 0,5–5,0 nmol l<sup>-1</sup> (0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 2,5; 3 ;5) pre 8-oxodG a 60 až 300 µmol l<sup>-1</sup> (60; 80; 100; 150; 175; 200; 250; 300) pre 2-dG. Jednotlivé body kalibračnej krivky boli zostrojené s prídavkom malého množstva analytov s narastajúcou koncentráciou ku vzorke DNA hydrolyzátu v pečeni. Kalibračné krivky boli vyhodnotené lineárnou regresnou analýzou najmenších štvorcov plochy pík, získané ako funkcia koncentrácie 8-oxodG a 2-dG. Parametre kalibrač-

nej krivky dosiahli nasledovné hodnoty:  $y \text{ (mAU)} = 359,2 \text{ (mAU nmol l}^{-1}\text{)} x + 132,6 \text{ (mAU)}$  pre 8-oxodG a  $y \text{ (mAU)} = 720,2 \text{ (mAU } \mu\text{mol l}^{-1}\text{)} x + 818,2 \text{ (mAU)}$  pre 2-dG. Korelačné koeficienty boli > 0,99 pre oba analyty.

### Presnosť a správnosť

Pre stanovenie vnútrodnovej presnosti a správnosti metódy boli vyhodnotené 4 opakované analýzy kalibračných štandardov hydrolyzáto DNA. Medzidňové parametre boli stanovené meraním kalibračných štandardov 4 rôzne dni v priebehu týždňa. Koeficienty variácie CV% (pre presnosť) a relatívne chyby RE% (pre správnosť) boli vyjadrené ako odhady štandardných a absolútnych chýb vypočítaných pre súbory s počtom vzoriek menších ako sedem. Hodnoty CV a RE nižšie ako 10 % pre všetky koncentrácie boli považované za akceptovateľné<sup>35,36</sup>.

### Opakovateľnosť plochy píku

Relatívne chyby (vypočítané ako odhad relatívnej štandardnej odchýlky) boli vypočítané z 20 dávkaní analytov v „spikovanej“ vzorke hydrolyzátu pečene pre dve koncentračné úrovne C1 (0,5 nmol l<sup>-1</sup> pre 8-oxodG a 2 µmol l<sup>-1</sup> pre 2-dG) a C2 (2 nmol l<sup>-1</sup> pre 8-oxodG a 60 µmol l<sup>-1</sup> pre 2-dG).

Opakovateľnosť retenčného času bola vypočítaná z 20 dávkaní štandardu a blanku hydrolyzátu pečene pre koncentráciu C2.

### Stanovenie limitu detekcie (LOD) a kvantifikácie (LOQ)

Limit detekcie pre dávkaný objem 50 µl hydrolyzátu DNA bol vypočítaný z pomeru analytického signálu

Tabuľka I

Parametre validácie pre HPLC stanovenie 8-oxodG a 2-dG

Parametre	8-oxodG	2-dG
Koncentrácia	0,5–5 nmol l <sup>-1</sup>	60–300 µmol l <sup>-1</sup>
Vnútrodnová presnosť a správnosť		
RE %	1,5–4,3	0,8–1,9
CV %	1,2–3,2	0,7–3,5
Medzidňová presnosť a správnosť		
RE %	2,1–6,1	1,0–5,2
CV %	1,9–5,8	1,2–4,9
Opakovateľnosť		
RE %		
– retenčného času	0,4	0,3
– plochy píku		
C1(0,5 nmol l <sup>-1</sup> 8-oxodG 60 µmol l <sup>-1</sup> 2-dG)	4,4	1,5
C2(2 nmol l <sup>-1</sup> 8-oxodG 200 µmol l <sup>-1</sup> 2-dG)	2,2	1,6
LOD	0,2 nmol l <sup>-1</sup>	12 µmol l <sup>-1</sup>
LOQ	0,5 nmol l <sup>-1</sup>	39 µmol l <sup>-1</sup>

píku (výška píku) voči šumu ( $S/N=3$ ) počas analýzy ( $n=10$ ) blanku hydrolyzátu DNA a signálu vzorky hydrolyzovanej DNA „spikovanej“ známou koncentráciou analytu. Limit kvantifikácie bol stanovený ako koncentrácia najnižšieho kalibračného štandardu (pri pomere odozvy výšky píku voči šumu nulovej línie  $S/N=10$ ) vzhľadom na odporúčania IUPAC<sup>37</sup> pre relatívnu štandardnú odchýlku  $RSD=10\%$ .

## Výsledky a diskusia

### Optimalizácia podmienok detekcie

Individuálna analýza štandardov 8-oxodG a 2-dG je dôležitá, pretože 2-dG nevyhnutne obsahuje malé množstvo 8-oxodG. Pre meranie 8-oxodG bola požadovaná citlivá detekcia a elektrochemická (coulometrická) detekcia sa javila byť vhodným prístupom. Testovaný a vybraný

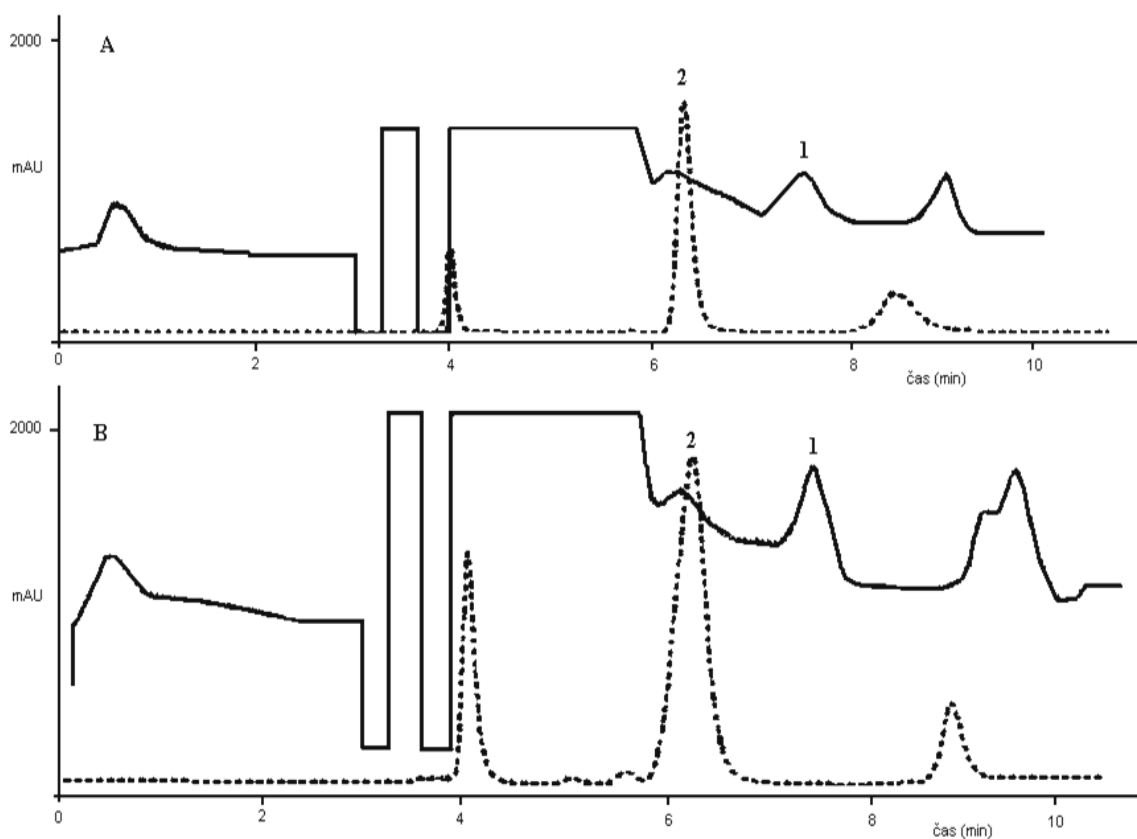
Tabuľka II

Meranie pomeru koncentrácií 8-oxodG/ $10^6$  2-dG vo vzorkách DNA v pečeni potkanov po spracovaní s  $\text{CuSO}_4$  (priemer  $\pm$  RSD,  $n=4$ )

Koncentrácia $\text{CuSO}_4$ ( $\text{mmol l}^{-1}$ ) pridaná k perfuzátu	8-oxodG ( $\text{nmol l}^{-1}$ )/ $10^6$ 2-dG ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )
0 (kontrola)	$13,8 \pm 0,5$
0,01	$22,5 \pm 0,5$
0,03	$30,8 \pm 0,4$

optimálny potenciál +400 mV bol rovnaký ako bol použitý v publikovaných prácach ESCODD<sup>3,5,6</sup>.

Jedným z dôležitých faktorov počas coulometrickej detekcie je odstránenie problémov, ktoré súvisia s redukciou signálu pozadia na minimum (príprava čer-



Obr. 1. Reprezentatívny chromatogram HPLC stanovenia 8-oxodG (1) a 2-dG (2) vo vzorkách DNA z hydrolyzátoov pečene simultánnou coulochemickou (plná čiara -) a UV (prerušovaná čiara - - -) detekciou; A – Chromatogram získaný po dávkovaní 50  $\mu\text{l}$  vzorky hydrolyzovanej DNA z kontrolnej vzorky pečene; B – Chromatogram získaný po dávkovaní 50  $\mu\text{l}$  vzorky hydrolyzovanej DNA zo vzorky pečene po prídavku 0,03  $\text{mol l}^{-1}$   $\text{CuSO}_4$ ; Chromatografické podmienky: Analytická kolóna: Purospher® STAR C18e (150  $\times$  4,6 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$ , Merck). Predkolóna: Purospher® STAR C18e (4  $\times$  4 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$ , Merck). Mobilná fáza: 50  $\text{mmol l}^{-1}$  fosforečnanový tlmivý roztok, pH 5,5 a metanol (92:8, v/v); prietok: 0,6  $\text{ml min}^{-1}$ . Detekcia: coulochemická (E1 +150 mV, E2 +400 mV pre oba kanály analytickej cely; +100 mV pre ochrannú celu) pre 8-oxodG; DAD pri 254 nm pre 2-dG

stvej mobilnej fázy tlmivého roztoku denne; filtrovanie mobilnej fázy použitím 0,2  $\mu\text{m}$  nylon filtra pod vákuom atď.). Je známe, že v prípade príspevkov matrice ku kontrolným vzorkám musia byť zvolené kalibračné postupy so štandardnými prídavkami analytov ku vzorke.

### Meranie poškodenia DNA

Sagripant a Kraemer<sup>38</sup> predpokladali, že väzbové miesta ionov medi na DNA sú v blízkosti zvyškov guanidínu. Potvrđilo sa, že tvorba DNA-Cu (I) komplexu v aeróbných vodných roztokoch vyvoláva poškodenie DNA spôsobené meďou v podmienkach *in vitro* aj *in vivo*<sup>39</sup>. Výsledky vyjadrené ako pomer koncentrácií 8-oxodG/10<sup>6</sup> 2-dG vo vzorkách pečene po prídavkoch rôznych koncentrácií CuSO<sub>4</sub> sú uvedené v tab. II. Z výsledkov vyplýva zvýšenie (okolo 50 %) množstva oxidovaných báz (vyjadrené pomerom) v závislosti od koncentrácie iónu v perfuzáte. Reprezentatívny chromatogram coulochemickej detekcie 8-oxodG a UV detekcie 2-dG v jadrovej DNA získanej zo vzorky pečene po spracovaní s 0,03 mmol l<sup>-1</sup> CuSO<sub>4</sub> je znázornený na obr. 1B.

Ako vidieť z hodnôt v tab. II, namerané pomery koncentrácií 8-oxodG/10<sup>6</sup> 2-dG vo vzorkách hydrolyzátov z kontrolnej pečene (bez prídavku CuSO<sub>4</sub>) dosiahli relatívne vysoké hodnoty (viď chromatogram na obr. 1A). Je možné predpokladať, že pozorovaný problém môže mať niekoľko príčin.

Strubelt a spol.<sup>40</sup> a Deters a spol.<sup>41</sup> zistili, že meď je toxická v izolovaných perfuzátoch pečene potkanov a jej toxicita je sprevádzaná peroxidáciou lipidov v tkanivách. Tieto zistenia vyvolali záujem preskúmať, či je toxicita medi v perfuzátoch pečene spojená s oxidáciou proteínov a oxidačným poškodením DNA. Model izolovaných perfuzátov pečene je považovaný za citlivý systém pre štúdium chemicky indukovanej hepatotoxicity.

Vzhľadom k tomu, že naša štúdia bola zameraná na výskum vplyvu medi v perfuzáte izolovanej pečene na oxidačné poškodenie DNA, fyzická manipulácia s pečenoú počas odberu a reperfüzie je nevyhnutná. Tento fakt môže prispievať k neočakávaným vysokým hodnotám oxidačného poškodenia DNA v kontrolných vzorkách pečene. Je to v zhode so zisteniami autorov Schemmera a spol.<sup>42</sup>, ktorí zistili, že už jemná manipulácia s pečenoú *in situ*, ktorá je pri odbere pečene nevyhnutná a spočíva v dotýkaní sa pečene, v ťahaní za laloky a v pohybovaní s lalokmi pečene, spôsobuje poruchy mikrocirkulácie v pečeni. Mikrocirkulačné poruchy spôsobujú hypoxiu, ktorá vedie k aktivácii Kupfferových buniek, k tvorbe voľných radikálov a tiež k reperfüznému poškodeniu po hypotermickej prezervácii<sup>43</sup>. Okrem toho, ďalším príspevkom k poškodeniu DNA je čas, ktorý je potrebný pre manipuláciu so vzorkou tkaniva počas izolácie a extrakcie DNA.

### Záver

Prezentovaná metóda bola validovaná vzhľadom na linearitu, presnosť a správnosť. HPLC metóda s použitím

Purospher® STAR C18e ako analytickej kolóny (s coulometrickou a UV detekciou) sa osvedčila ako vhodná metóda pre simultánne meranie 8-oxodG a 2-dG v jadrovej DNA. Úprava vzorky pred hydrolyzou DNA je kritickým krokom pri meraní 8-oxodG v biologických vzorkách, a preto jej musí byť venovaná značná pozornosť. Bol testovaný postup s prídavkom rôznych koncentrácií CuSO<sub>4</sub> k perfuzátom pečene. Výsledky z HPLC analýz 8-oxodG a 2-dG poukazujú na zvýšenú tvorbu oxidovaných báz so zvyšovaním koncentrácie medi.

V našej štúdií bol pozorovaný problém so vznikom vysokého množstva oxidovanej bázy v kontrolných vzorkách pečene. Tento fakt bol zohľadnený aj počas procesu validácie vzhľadom na LOD, LOQ ako aj opakovateľnosť plochy píku a retenčného času. Limit detekcie je 0,2 nmol l<sup>-1</sup> pre 8-oxodG a 12  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pre 2-dG. Limit kvantifikácie je 0,5 nmol l<sup>-1</sup> pre 8-oxodG a 39  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pre 2-dG.

Vysoký príspevok matrice k poškodeniu DNA (vyjadrenému ako pomer koncentrácií 8-oxodG/10<sup>6</sup> 2-dG) môže súvisieť s artefaktmi, ktoré sa tvoria počas prípravy vzorky (časovo náročná úprava vzorky pred hydrolyzou DNA), ako aj manipulácie s pečenoú *in situ*. Opatrná manipulácia, vynechanie oxidačných činidiel a /alebo prídavok antioxidantov môže zredukovať problém, ale stále zostáva nutnosť pre ďalší konsenzus v meracích technikách a podmienkach. Získané výsledky poukázali na to, že došlo k oxidačnému poškodeniu už pri manipulácii s pečenoú, ešte pred aplikáciou CuSO<sub>4</sub> a koncentrácia CuSO<sub>4</sub> vyššia ako 0,03 mmol l<sup>-1</sup> spôsobila totálne poškodenie pečene, čo sa prejavilo úplným zastavením prietoku perfuzátu. Ak meď spôsobuje oxidačné poškodenie DNA, mohla by ovplyvniť aj expresiu cytokínov a metalloproteínázy, pretože je známe, že bunková odozva na oxidačný stres zahŕňa zmeny v štruktúre génovej expresie. Ale táto problematika by mohla byť námetom pre ďalšie naše experimenty.

*Táto publikácia bola vytvorená realizáciou projektu „Výskum zdravotných efektov rastlinnej potravy a možnosti redukcie zdravotných rizík“, ITMS č. 26240220022, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj, financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja. Poďakovanie patrí aj občianskemu združeniu Rozum a zdravie, o.z. za čiastočnú finančnú podporu.*

### LITERATÚRA

1. Roszkowski K., Jozwicki W., Blaszczyk P., Mucha-Malecka A., Siomek A.: *Medical Sci. Monitor.* 17, 329 (2011).
2. Valavanidis A., Vlachogianni T., Fiotakis C.: *J. Environ. Sci. Health* 27, 120 (2009).
3. ESCODD (European Standards Committee on Oxidative DNA Damage): *Free Radical Res.* 36, 239 (2002).
4. Riis B., ESCODD: *Free Radical Res.* 36, 649 (2002).
5. ESCODD: *Free Radical Biol. Med.* 34, 1089 (2003).
6. ESCODD, Gedik C. M., Collins A.: *FASEB J.* 19, 82

- (2005).
7. Valko M., Morris H., Cronin M. T.: *Curr. Med. Chem.* **12**, 1161 (2005).
  8. Jomova K., Valko M.: *Toxicology* **283**, 65 (2011).
  9. Valko M., Rhodes C. J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M.: *Chem.-Biol. Interact.* **160**, 1 (2006).
  10. Carmichael P. L., Hewer A., Osborne M. R., Strain A. J., Phillips D. H.: *Mutat. Res.* **326**, 235 (1995).
  11. Alexandrova A., Kebis A., Mišřanová C., Kukan M.: *Exp. Toxicol. Pathol.* **58**, 255 (2007).
  12. Linder M.: *Mutat. Res.* **733**, 83 (2012).
  13. Wu L. L., Chiou C. C., Chang P. Y., Wu J. T.: *Clin. Chim. Acta* **339**, 1 (2004).
  14. Mistry V., Teichert F., Sandhu J. K., Singh R., Evans M. D., Farmer P. B., Cooke M. S.: *Methods Mol. Biol.* **682**, 279 (2011).
  15. Weimann A., Belling D., Poulsen H. E.: *Free Radical Biol. Med.* **30**, 757 (2001).
  16. Lengger C., Schoch G., Topp H.: *Anal. Biochem.* **287**, 65 (2000).
  17. Peoples M. C., Karnes H. T.: *J. Chromatogr., B* **827**, 5 (2005).
  18. Ravanat J. L.: *Free Radical Res.* **46**, 479 (2012).
  19. Azadnia A., Campbell R., Sharma M.: *Anal. Biochem.* **218**, 444 (1994).
  20. Domijan A. M., Peraica M.: *Arch. Industr. Hyg. Toxicol.* **59**, 277 (2008).
  21. Kelly M. C., White B., Smyth M. R.: *J. Chromatogr., B* **863**, 181 (2008).
  22. Loft S., Poulsen H.: *J. Mol. Med.* **75**, 67 (1997).
  23. Gedik C. M., Wood S. G., Collins A. R.: *Free Radical Res.* **29**, 609 (1998).
  24. Lee K. F., Chung W. Y., Benzie I. F.: *Clin. Chim. Acta* **411**, 416 (2010).
  25. Boysen G., Bcollins L., Liao S., Luke A. M., Pachkowski B. F., Watters J. L., Swenberg J. A.: *J. Chromatogr., B* **878**, 375 (2010).
  26. Hu C. W., Chao M. R., Sie C. H.: *Free Radical Biol. Med.* **48**, 89 (2010).
  27. Singh R., McEwan M., Lamb J. H., Santella R. M., Farmer P. B.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **17**, 126 (2003).
  28. Malayappan B., Garrett T. J., Segal M., Leeuwenburgh C.: *J. Chromatogr., B* **1167**, 54 (2007).
  29. Cooke M. S., Barregard L., Mistry V., Potdar N., Rozalski R., Gackowski D., Siomek A., Foksinski M., Svoboda P., Kasai H., Konje J. C., Sallsten G., Evans M. D., Olinski R.: *Biomarkers* **14**, 103 (2009).
  30. Garratt L. W., Mistry V., Singh R., Sandhu J. K., Sheil B., Cooke M. S., Sly P. D., on behalf of ARESTCF: *Free Radical Biol. Med.* **48**, 1460 (2010).
  31. Yoshida R., Ogawa Y., Kasai H.: *Cancer Epidemiol., Biomarkers Prev.* **11**, 1076 (2002).
  32. Kasai H., Nishimura S.: *Nucleic Acid Res.* **12**, 2137 (1984).
  33. Ravanat J. L., Douki T., Duez P., Gremaud E., Herbert K., Hofer T., Lasserre L., Saint-Pierre C., Favier A., Cadet J.: *Carinogenesis* **23**, 1911 (2002).
  34. Kukan M.: *Handbook of Drug Metabolism* (Woolf T. F., ed.); 1. vyd. Marcel Dekker, New York 1999.
  35. Jenke D.: *J. Liq. Chromatogr.* **19**, 719 (1996a).
  36. Jenke D.: *J. Liq. Chromatogr.* **19**, 737 (1996b).
  37. Currie L. A.: *Pure Appl. Chem.* **67**, 1699 (1995).
  38. Sagripant J. L., Kraemer K. H.: *J. Biol. Chem.* **264**, 1729 (1989).
  39. Drouin R., Rodriguez H., Gao S.W., Gebreyes Z., Connor T. R., Holmquist G. P., Akman S. A.: *Free Radical Biol. Med.* **21**, 261 (1996).
  40. Strubelt O., Kremer J., Tilse A., Keogh J., Pentz R., Younes M.: *J. Toxicol. Environ. Health* **47**, 267 (1996).
  41. Deters M., Siegers C. P., Strubelt O.: *Toxicology* **128**, 63 (1998).
  42. Schemmer P., Connor H. D., Arteel G. E., Raleigh J. A., Bunzendahl H., Mason R. P., Thurman R. G.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **290**, 235 (1999).
  43. Lemaster J. J., Thurman G. R.: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **37**, 327 (1997).
- C. Mišřanová<sup>a,b</sup>, A. Kebis<sup>c</sup>, J. Příbojová<sup>a</sup>, and M. Valachovičová<sup>a</sup>** (<sup>a</sup>*Faculty of Nursing and Professional Health Studies, Slovak Medical University in Bratislava*, <sup>b</sup>*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Natural Sciences, Comenius University, Bratislava*, <sup>c</sup>*Faculty of Public Health, Slovak Medical University in Bratislava*):
- HPLC Determination of Oxidative DNA Damage in Rat Liver Perfusates Influenced by Addition of Copper**
- HPLC determination of a background level of 8-oxodG and 2-dG in rat liver after addition of copper to perfusate was developed. The reversed phase analytical column Purospher® STAR C18e with 50 mmol L<sup>-1</sup> phosphate buffer, pH 5.5 and methanol (92:8, v/v) mobile phase was applied for the analysis. The validation of the HPLC method according to linearity, accuracy and precision was carried out. Oxidative DNA damage (expressed as concentration ratio of 8-oxodG/10<sup>6</sup> 2-dG) was determined by the simultaneous measuring of 2-dG with UV detection followed by coulochemical detection of 8-oxodG.
- The procedure using a model of liver damage caused by intoxication with copper and ischemia / reperfusion with addition of various concentrations of CuSO<sub>4</sub> to the perfused rat livers was tested. The aim of this study was to decide whether the toxicity of copper in liver perfusates is related to protein oxidation and oxidative DNA damage. The high contribution to the DNA damage can be related to the physical liver manipulation during harvest and reperfusion as well as to artefacts induced during the sample preparation (time-consuming sample handling during DNA isolation and extraction). The obtained results pointed out that the DNA damage occurred already during liver handling even before application of CuSO<sub>4</sub>, whereby concentration of CuSO<sub>4</sub> higher than 0.03 mmol L<sup>-1</sup> caused a total liver damage, which led to a complete stop of the flow of the perfusate.