

PŘÍPRAVA POLYMERNÍCH IMUNOČÁSTIC PRO SEPARACI BIOMARKERŮ OXIDAČNÍHO STRESU Z TĚLNÍCH TEKUTIN

ANNAMARIE NÉMETHOVÁ^{a,*}, KAMILA
SYSLOVÁ^a, DANIELA PELCLOVÁ^b a PETR
KAČER^a

^a Ústav organické technologie, Vysoká škola chemicko-
technologická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6 –
Dejvice, ^b Klinika nemocí z povolání, 1. lékařská fakulta,
Universita Karlova, Na Bojišti 1, 120 00 Praha 2
Petr.Kacer@vscht.cz

Došlo 18.7.11, přijato 12.1.12.

Klíčová slova: polymerní imunočástice, oxidační stres,
8-*iso* Prostaglandin F_{2α}, LC-ESI-MS

Úvod

Pro úspěšnou léčbu pacienta je nutná správná a včas-
ná diagnóza onemocnění. O úspěšnosti terapie rozhoduje
řada faktorů. Mezi nejdůležitější lze zařadit včasný pří-
chod pacienta k ošetřujícímu lékaři a poté stanovení rychlé
a správné diagnózy. Vyšetření a následná léčba se dnes
řídí zobecněnými postupy a jen velice málo se přihlíží
k individuálnímu stavu organismu jedince a jeho specifick-
ým vlastnostem (věk, pohlaví, výška, váha, strava, život-
ní prostředí, ad.), což může u závažnějších onemocnění
mít i fatální následky. Nedostatky těchto postupů při vyšet-
ření a následné samotné terapii se snaží řešit tzv. persona-
lizovaná medicína.

Personalizovaná medicína využívá genomických
a molekulárních analýz tělních tekutin (moč, plasma, kon-
denzát vydechaného vzduchu, mozkomíšni mok) a tkání¹.
Pro její širší rozšíření do rutinní lékařské praxe je
potřeba vyhledat specifické látky charakteristické pro kon-
krétní onemocnění tzv. „biomarkery“² a vytvořit vhodnou
standardizovanou analytickou metodu pro jejich detekci
a kvantifikaci. V nedávné době byly pro řadu nemocí
vytipovány vhodné biomarkery, vznikající v průběhu kon-
krétního patologického procesu. Jedním z obecných me-
chanismů tvorby biomarkerů je děj, označovaný jako oxi-
dační stres. Jedná se o důsledek nežádoucích oxidačních
procesů v buňce vyvolaných reaktivními kyslíkovými čás-
ticemi (ROS). Ty vznikají různými neřízenými reakcemi

molekulového kyslíku v aerobních buňkách a mají tenden-
ci odtrhnout elektron od dalších molekul, zejména nenasy-
cených mastných kyselin, popř. bočních řetězců aminoky-
selin. Touto reakcí se sice ROS může stabilizovat, ale
z cílové molekuly vzniká opět reaktivní radikál (dochází
tak k řetězové reakci)³. Jedním z hlavních biomarkerů
oxidačního stresu vznikající působením ROS na nenasyce-
né mastné kyseliny (kyselinu arachidonovou) je 8-*iso*
Prostaglandin F_{2α} (8-*isoprostan*; 8-*iso* PGF_{2α}). V řadě prací
bylo popsáno stanovení 8-*iso* PGF_{2α} v různých tělních
tekutinách (krevní plasma, moč, kondenzát vydechané-
ho vzduchu, mozkomíšni mok atd.) s využitím analytic-
kých metod, jako je RIA (Radioimmunoassay)⁴, EIA
(Enzyme Immunoassay)^{5–9}, ELISA (Enzyme Linked
Immunosorbent Assay)¹⁰, případně GC-MS^{11,12} nebo LC-
MS^{13,14}.

Předkládaná práce se zabývá přípravou a charakteri-
zací pórovitých polymerních imunočástic vhodných
k separaci biomarkerů oxidačního stresu z tělních tekutin
jako mezikroku k přípravě tzv. diagnostického proužku,
který by se měl stát vhodnou pomůckou pacientů pro
orientační stanovení biomarkerů v moči. Principem je pří-
prava polymerních imunočástic, v jejichž struktuře jsou
imobilizovány vysoce specifické protilátky proti zvoleným
antigenům (biomarkerům). Zvolené protilátky, primární
imunoglobuliny produkované B-lymfocyty, jsou přiroze-
nou součástí imunitního systému³. Jedná se o glykoprotei-
ny, složené ze dvou lehkých a dvou těžkých řetězců spoje-
ných disulfidickými můstky, přičemž na nich lze formálně
rozlišit dvě podoblasti: variabilní část a konstantní část.
Variabilní oblast je zakončena jedinečnou strukturou ra-
men, do kterých antigen zapadá jako klíč do zámku^{15,16}.
Konstantní oblast lze modifikovat, aniž by došlo
k ovlivnění vazebné schopnosti protilátky vůči danému
antigenu, a využít ji tak k imobilizaci na různé nosiče¹⁷.
Této skutečnosti bylo využito při vývoji porézního poly-
merního materiálu, v jehož struktuře jsou zakotveny uve-
dené protilátky tak, aby nedošlo ke ztrátě jejich biologické
aktivity. V ideálním případě vnitřní porézní struktura poly-
meru splňuje podmínky nemožnosti průchodu protilátky
z polymerního materiálu do biologické matrice a zároveň
snadné difuze biomarkeru k zakotvené protilátce
s minimálním difuzním omezením.

Experimentální část

Chemikálie

Polyvinylalkohol (PVA); PVA 17-99, PVA 40-88,
PVA 20-98, PVA 4-88 (Sigma-Aldrich, USA), poly-
ethylenglykol (PEG); PEG 1000, PEG 1305-1595, PEG
570-630 (Sigma-Aldrich, USA), deionizovaná voda

* Annamarie Némethová získala s touto prací 1. místo v soutěži O cenu firmy Merck 2011 za nejlepší studentskou vědec-
kou práci v oboru analytická chemie.

(VŠCHT Praha), imunoafinitní sorbent pro 8-*iso* PGF_{2α} (IgG proti 8-*iso* PGF_{2α} zakotvený na Sepharose 4B) (Cayman Chemical, USA), 8-*iso* Prostaglandin F_{2α} (Cayman Chemical, USA), 8-*iso* Prostaglandin F_{2α-d4} (Cayman Chemical, USA), dihydrogenfosforečnan sodný monohydrát (Fluka, Švýcarsko), hydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Riedel de Haen, Německo), borátový pufr o pH 9 (Fluka, Švýcarsko), síran sodný (Aldrich, USA), triethylamin (Aldrich, USA), 3,5-di-*terc*-4-butylhydroxytoluen (BHT; Aldrich, USA), acetonitril (pro LC-MS, Fluka, Švýcarsko) a voda (pro LC-MS, Fluka, Švýcarsko).

Přístroje a pomůcky

LC-ESI-MS

LC-ESI-MS analýzy byly realizovány na systému vybaveném dvěma vysokotlakými pumpami Varian ProStar 210 (Varian, USA), degasérem, autosamplerem Varian 410 (Varian, USA) a hmotnostním spektrometrem s elektrosprejovou ionizací a trojitým kvadrupólem Varian 1200L (Varian, USA).

K chromatografické separaci 8-*iso* PGF_{2α} bylo použito mobilní fáze o isokratickém složení acetonitril:voda (70:30 v/v) s pH upraveným triethylaminem na hodnotu 11 a kolony se stacionární fází tvořenou porézním grafitovým uhlíkem (Hypercarb Thermo, 2,1 × 100 mm, zrnitost stacionární fáze 5 μm, Thermo Electron Corporation, USA). Průtok mobilní fáze činil 150 μl min⁻¹. Chromatografická kolona byla temperována na 30 °C. Na kolonu bylo nastříkáváno 20 μl vzorku. Při hmotnostně-spektrometrické analýze bylo využíváno negativní elektrosprejové ionizace (ESI⁻) v SRM (Selected Reaction Monitoring) módu s kolizně indukovanou disociací (CID). Jako monitorovací reakce pro 8-*iso* PGF_{2α} bylo použito 353 → 193 (Q1→Q3) (energie CID 27,5 eV) a pro 8-*iso* PGF_{2α-d4} 357 → 197 (Q1→Q3) (energie CID 27,5 eV). Parametry hmotnostního spektrometru byly optimalizovány na následující hodnoty: napětí na kapiláře -70 V, tlak kolizního plynu argonu 0,2 Pa, napětí na sprejovací jehle -3000 V, teplota sušícího plynu 300 °C (dusík tlak 117 kPa), tlak zmlžovacího plynu 300 kPa (vzduch). Data byla měřena a zpracovávána programem Varian MS Workstation verze 6.52 (Varian, USA).

Příprava polymerních imunočástic

PEG (PEG 1000; 150 mg) byl rozpuštěn v deionizované vodě (3,9 ml) a za současného zahřívání (95–98 °C) byl postupně přimícháván PVA (PVA 17-99; 1 g). Směs byla zahřívána, dokud nedošlo k vyčefení roztoku. Po ochlazení směsi na teplotu 35 °C byl do viskózního gelu vnesen imunoafinitní sorbent (0,5 ml). Následujícím krokem byla samotná příprava polymerních částic, která spočívala v nanášení uniformních kapek dávkovacím zařízením tak, aby byla zajištěna jednotná velikost připravených imunočástic. Imunočástice byly vysušeny na definovanou hmotnost a promyty fosfátovým pufrům (koncentrace

0,1 M, pH 7,4). Promytím imunočástic v daném pufru došlo k jejich rebobtnání. Takto připravené polymerní imunočástice byly skladovány ve fosfátovém pufru s přídavkem azidu sodného (0,02% w/w). Imunočástice byly před samotným použitím pro separaci biomarkerů z tělních tekutin promyty fosfátovým pufrům a následně vodou.

Separace biomarkerů

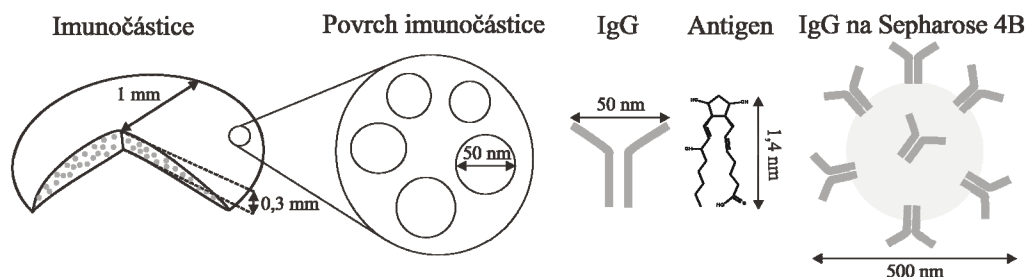
Imunoseparace byla realizována následujícím postupem: 250 mg imunočástic bylo přidáno k 1 ml moči, kde došlo k vytvoření komplexu mezi antigenem a protilátkou. Imunočástice s vytvořeným komplexem byly separovány z biologické matrice kombinací centrifugace a dekantace. Separované imunočástice, obsahující komplex antigen – protilátka, byly po promytí vodou vloženy do 500 μl roztoku glycinu (100 mM), čímž došlo k rozvolnění komplexu a uvolnění antigenu (sledovaný biomarker) do roztoku, který byl použit pro HPLC/MS analýzu. Polymerní imunočástice byly po regeneraci (opakované promytí fosfátovým pufrům; 3 × 1 ml) znovu použity k další separaci bez výraznější ztráty vazebné kapacity.

Výsledky a diskuse

Příprava polymerní imunočástice

Polymerní imunočástice, jako nástroj pro rychlou a efektivní separaci látky (např. biomarkeru patologického procesu) z komplexní biologické matrice (moč, plazma, mozkomíšni mok, dechový kondenzát atd.), byly připraveny s cílem využití principu vysoce selektivní a specifické reakce antigen – protilátka. Podstatou je imobilizace vysokomolekulární protilátky proti 8-*iso* PGF_{2α} (IgG proti 8-*iso* PGF_{2α}) do polymerní matrice, aniž by ztratila svoji biologickou funkci. Klíčovým parametrem je ovšem povrchová struktura polymerní imunočástice, která musí splňovat nejen požadavek na nemožnost průchodu protilátky z jádra do okolního prostředí (biologická matrice), kde se biomarker vyskytuje, ale rovněž musí umožnit průchodu antigenu – biomarkeru (8-*iso* PGF_{2α}) k protilátce bez významných difuzních omezení. Možností, jak snížit nároky na požadavek jemného ladění parametru velikosti pórů v polymerní struktuře, je využít zvýšení rozdílu ve velikosti obou klíčových molekul (antigen vs. protilátka) zakotvením protilátky na vhodný polymerní nosič. Toto bylo realizováno využitím protilátky zakotvené na Sepharose 4B (viz obr. 1).

První fáze přípravy imunočástic spočívá v přípravě polymerního roztoku skládajícího se z PVA, PEG a vody při teplotě 95–97 °C. V této fázi dochází k zesíťování PVA. Po ochlazení směsi na teplotu 35–37 °C jsou přimíchány protilátky na Sepharose 4B. Polymerní roztok je při teplotě 35–37 °C nanášen na polyethylenové destičky ve tvaru čoček. Povrch připravených čoček je vysušen, aby nedocházelo k jejich rozpouštění při následném kroku – rebobtnání ve fosfátovém pufru, kdy dochází k vymývání



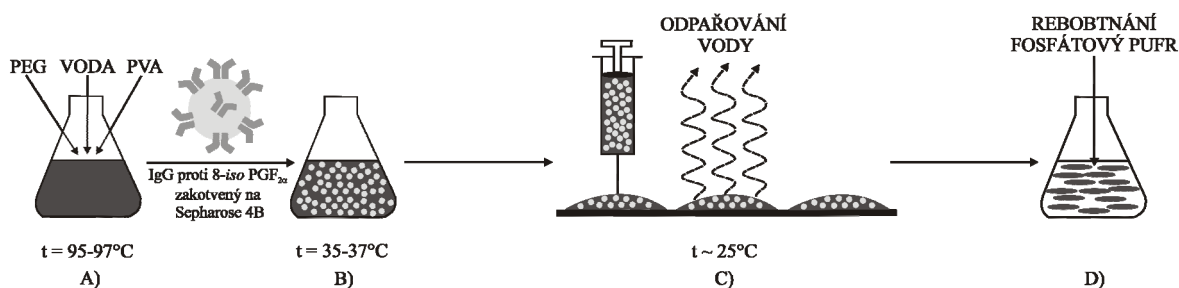
Obr. 1. Schéma imunočástice

PEG z povrchu čočky a vzniku pórovité struktury (viz obr. 2). Takto připravené čočky se používají k separaci biomarkeru z komplexní matrice. Polymerní imunočástice, skládající se ze zakotvené protilátky na Sepharose 4B imobilizované v polymerní porézní matici, byly připraveny s cílem optimalizace všech parametrů přípravy, které zásadním způsobem ovlivňují vlastnosti imunočástice a tím následně celý separační proces izolace biomarkeru z komplexní matrice, kterou v tomto případě byla moč, ale stejně tak by jí mohla být i jiná biologická matrice (krevní plazma, mozkomíšni mok, kondenzát vydechovaného vzduchu atd.). Parametry přípravy se zásadním vlivem na strukturu a vlastnosti polymerních imunočástic, kterým byla věnována pozornost, byly: (1) typ PVA a PEG, ve smyslu jejich molekulárních vlastností; (2) optimální poměr výchozích surovin (PVA, PEG a voda); (3) množství odpařené vody při gelaci imunočástic a (4) použitý roztok pro rebohtnění imunočástic. Při optimalizaci parametrů byly monitorovány vlastnosti, které by mohly způsobit denaturaci protilátky (např. pH, přítomnost solí ad.).

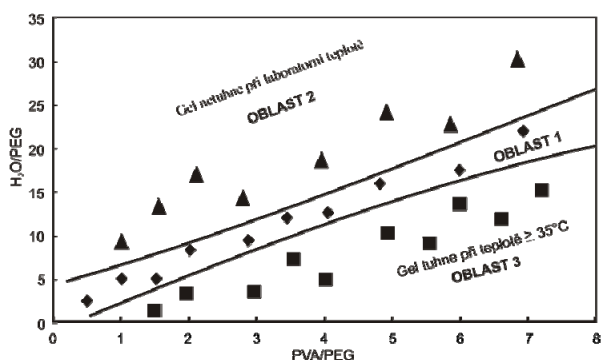
Primárním úkolem bylo nalezení poměru výchozích látek, při kterém je možné připravit sol, do kterého jsou přidány protilátky při teplotě 35–37 °C, kdy nehrozí jejich teplotní denaturace a zároveň dochází k tvorbě stabilního gelu. Experimentálně bylo zjištěno, že optimální množství vody vzhledem k PVA (za konstantního množství PEG)

pro přípravu polymerního gelu lze vyjádřit lineární závislostí: množství vody = $2,82 \times$ množství PVA + 2,05. Daná závislost množství vody na množství PVA při přípravě gelu vymezuje v grafu (viz obr. 3) tři oblasti: (1) oblast optimálního složení gelu a oblasti (2) a (3) s neideálním poměrem PVA a vody. V oblasti (2) nedochází ke vzniku gelu a reaktanty zůstávají přítomny ve formě nepravého roztoku (solu). V oblasti (3) se vytváří vysoce viskózní gel již při vyšší teplotě a tím neumožňuje přidání protilátek při teplotě 35–37 °C. Jako optimální pro přípravu imunočástic byl zvolen poměr jednotlivých složek PVA (17-99) : PEG (1000) : deionizovaná voda 20 : 3 : 77.

K přípravě polymerních částic bylo použito několika typů PVA lišících se viskozitou a mírou hydrolyzy acetátových skupin při přípravě PVA z polyvinylacetátu: PVA 4-88 (viskozita 4 Pa s – míra hydrolyzy polyvinylacetátu 88 mol.%), PVA 40-88, PVA 20-98 a PVA 17-99. Použité PVA se lišily rozdílnou rozpustností ve vodě, která je závislá na stupni hydrolyzy PVA. Při nižší míře hydrolyzy acetátových skupin PVA (88) nebylo možné imunočástice připravit, protože docházelo k jejich rozpouštění při rebohtnění. Při sledování vlivu použitého druhu PEG (PEG 570-630, PEG 1000 a PEG 1305-1395; číselné hodnoty vyjadřují molekulovou hmotnost PEG v g mol^{-1}) lišícího se průměrnou molekulovou hmotností, která ovlivňuje viskozitu PEG, byly připraveny polymerní imunočástice se



Obr. 2. Schéma přípravy imunočástic. Do připravené polymerní matrice (A) jsou přimíchány protilátky zakotvené na Sepharose 4B (B). Vzniklá matrice je nanášena ve formě čoček na PE podklad, kde dochází k vysušení povrchu imunočástice (C). Vysušené imunočástice jsou rebohtnány (D)



Obr. 3. Stanovení optimálního poměru výchozích látek (PVA, PEG a vody) pro přípravu gelu; ♦ – optimální poměr surovin; ■ – gel tuhne při teplotě $\geq 35^{\circ}\text{C}$; ▲ – gel netuhne při laboratorní teplotě

stejným poměrem jednotlivých složek jako při optimalizaci druhu PVA. Gel vyrobený z PEG o větší molekulové hmotnosti (PEG 1305-1395) vykazoval velmi vysokou viskozitu. Pokud bylo použito PEG 570-630, měl gel viskozitu příliš nízkou. V obou krajních případech nebylo možné z vyrobeného gelu připravit imunočástice (docházelo k ztuhnutí gelu při teplotě vyšší než 37°C (PEG 1305-1395), anebo k tvorbě gelu při laboratorní teplotě vůbec nedošlo (PEG 570-630)).

Dalším sledovaným parametrem při přípravě matrice byl vliv množství odpařené vody při sušení imunočástic po gelaci na jejich kvalitu. Při malém množství odpařené vody v rozmezí od 10 do 50 hm.% docházelo při reobtnání částic k jejich rozpouštění. Jako optimální množství odpařené vody z gelu, který byl nanesen ve formě čoček na PE podložku, byl zvolen interval 60–70 hm.%. V tomto rozmezí bylo dosahováno stabilního povrchu imunočástice, kdy došlo k vymytí PEG z povrchu imunočástice a vytvoření pórů (při vyšším úbytku vody > 70 hm.% nedocházelo k vymytí PEG), ale nebylo sledováno rozpouštění PVA jako při odpaření menšího množství vody (< 60 hm.%).

Dalším experimentálně hodnoceným parametrem byl vliv složení použitého roztoku k reobtnání polymerních částic po jejich formulaci a vysušení. Bylo zjištěno, že roztok musí mít vhodné pH, aby nedošlo ke ztrátě biologické aktivity protilátek. Rovněž bylo zjištěno, že pH má výrazný vliv na stabilizaci povrchu polymerních částic a vznikající morfologii polymeru, kdy jemným laděním hodnoty pH lze ovlivňovat difuzní vlastnosti připraveného materiálu. Zkoumanými roztoky byla voda, roztok síranu sodného, fosfátový a borátový pufr. Jako optimální se osvědčil fosfátový pufr (pH 7,4).

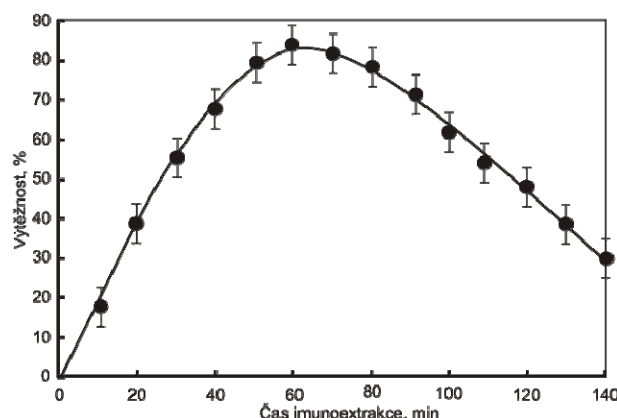
LC-ESI-MS analýza

Funkčnost imunočástic byla ověřena jejich testováním při separaci biomarkeru oxidačního stresu 8-iso PGF_{2 α} přítomného v moči, přičemž jeho obsah byl stanoven

HPLC-MS metodou. Optimální množství imunočástic potřebné pro separaci 8-iso PGF_{2 α} z moči, stejně jako čas imunoextrakce, byly experimentálně stanoveny. Jako optimální čas imunoextrakce byla stanovena doba 60 min (viz obr. 4). Po uplynutí této doby dochází ke snižování detegovaného množství 8-iso PGF_{2 α} , které je způsobeno jeho teplotní labilitou za laboratorních podmínek¹³. Vazebná kapacita připravených imunočástic byla nastavena a následně experimentálně stanovena, s ohledem na fyziologické případně patologické hladiny 8-iso PGF_{2 α} v moči, které se v klinických vzorcích pohybují v intervalu 10 až 100 pg ml⁻¹. Závislost množství separovaného 8-iso PGF_{2 α} na jeho původně přítomném množství v biologické matrici má charakter adsorpční isotermy, na které je možné formálně vymezit dvě oblasti (viz obr. 5). V lineární oblasti se s rostoucím množstvím biomarkeru v matrici přímoúměrně zvyšuje i množství vzniklého komplexu antigen-protilátka (zvětšená pracovní oblast). V nelineární oblasti se při vyšším přítomném množství 8-iso PGF_{2 α} projevuje nedostatečné množství volných protilátek přítomných v imunočástici. Práce v lineární oblasti je žádoucí s ohledem na správnost metody.

Validace metody

Pro 8-iso PGF_{2 α} byla sestrojena kalibrační závislost koncentrace 8-iso PGF_{2 α} na podílu plochy 8-iso PGF_{2 α} a vnitřního standartu 8-iso PGF_{2 α} -d₄. Získané experimentální body byly v rozmezí limitu kvantifikace až 500 pg zpracovány metodou lineární regrese s přesností $\geq 0,9994$ (Pearsonův korelační koeficient). Správnost, přesnost a výtěžnost jsou shrnuty v tab. I a byly určeny limity detekce a kvantifikace pro extrakci imunočásticemi: LOD = 8 pg ml⁻¹, LOQ = 10 pg ml⁻¹.

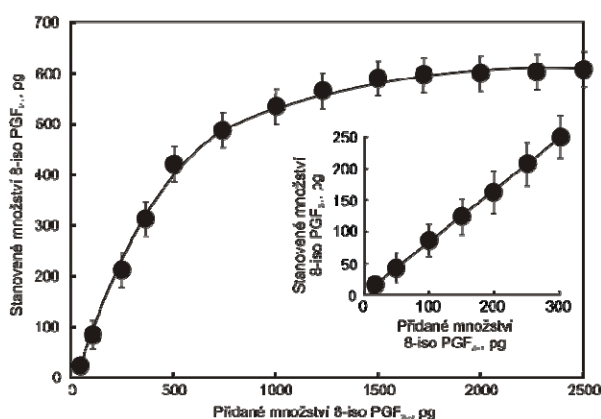


Obr. 4. Stanovení optimálního času extrakce připravenými imunočásticemi ($n=5$)

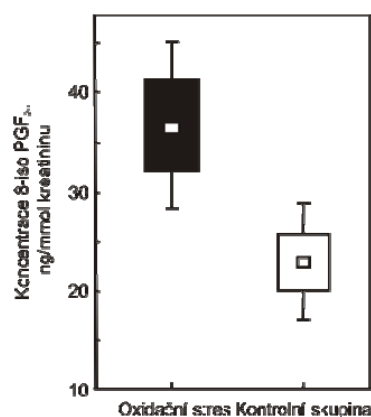
Tabulka I

Hodnoty validace pro 8-iso PGF_{2α} (n = 5)

Přítomné množství [pg]	Detegované množství [pg]	SD (pg) ^a	Přesnost RSD ^b [%]	Správnost RE ^c [%]	Výtěžnost [%]
25	21,0	2,0	9,5	-16,0	84,0
50	47,8	4,1	8,6	-4,4	95,6
100	87,3	6,3	7,2	-12,9	87,3
250	214,5	9,5	4,3	-14,2	85,8

^a SD – směrodatná odchylka, ^b RSD – relativní směrodatná odchylka, ^c RE – relativní chyba

Obr. 5. Stanovení vazebné kapacity imunočástic (množství imunočástic – 250 mg, n=5)

Obr. 6. Klinická studie (pacienti s azbestózou a silikózou vs. kontrolní skupina) pro biomarker oxidačního stresu 8-iso PGF_{2α}

Klinická studie

Samotný klinický experiment se skládal z diferenciální diagnostiky biomarkeru oxidačního stresu 8-iso PGF_{2α} u jedinců s plicními formami onemocnění indukovaných oxidačním stresem, silikózou a azbestózou (20 jedinců, věk 68±8, průměrná doba působení asbestu nebo křemíku 15±6 let, nekuřáci) a jedinců kontrolní skupiny (13 jedinců, věk 65±7, nekuřáci). Vyvinutá metoda byla použita pro analýzu klinických vzorků moči. Tyto vzorky byly odebírány mezi 8. a 12. hodinou. Vzorky moči byly odstředěny a k 1 ml moči byl přidán vnitřní standard 8-iso PGF_{2α-d4} (250 pg) a antioxidant (100 μg BHT). U vzorků moči byla stanovena hladina kreatininu (Creatinine Assay Kit; Cayman Chemical, USA), který slouží k standardizaci individuální odlišnosti v produkci moči u jednotlivých jedinců. Mezi skupinou zahrnující pacienty s diagnózou azbestózy případně silikózy na straně jedné a kontrolní skupinou byl prokázán statisticky významný rozdíl v hladinách 8-iso PGF_{2α} v moči (viz obr. 6).

Závěr

Byly vytvořeny porézní polymerní imunočástice určené k separaci biomarkerů z tělních tekutin. Jejich funkčnost byla potvrzena klinickou studií. Výhodou těchto polymerních částic je snadná manipulace, jednoduchá příprava, vysoká efektivita a biokompatibilita materiálu s tělními tekutinami (nedochází k degradaci protilátek). Na této problematice se bude dále intenzivně pracovat ve snaze vyvinout tzv. diagnostický proužek, který by sloužil jako orientační pomůcka nejen pro lékaře, ale i pro laickou veřejnost. Cílem je vytvořit nástroj personalizované medicíny, který by jedincům s predispozicí k určitým onemocněním dovoľoval monitorovat přítomnost specifických biomarkerů ve snadno odeberatelných tělních tekutinách (moč, sliny ad.). Nákladný analytický detekční systém by měl být nahrazen kolorimetrickou indikací, která se projeví v polymerním materiálu v případě pozitivní reakce protilátka–biomarker (vyvážení barviva z protilátka v důsledku vyšší afinity biomarkeru k protilátce) a tím dá jasný signál k návštěvě lékaře.

Tato práce byla finančně podporována Interní grantovou agenturou Ministerstva zdravotnictví ČR (IGA MZ NS/10298-3/2009). Ráda bych na tomto místě poděkovala ing. Radku Stloukalovi, Ph.D. (LentiKat's a.s.) za odbornou podporu.

Seznam zkratek

8-iso PGF _{2α}	8-iso Prostaglandin F _{2α}
BHT	3,5-di- <i>tert</i> -4-butyhydroxytoluen
IgG	imunoglobulin G
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
PEG	polyethylenglykol
PVA	polyvinylalkohol

LITERATURA

- Lesko L.: Clin. Pharmacol. Ther. 81, 807 (2007).
- Pang-ning Teng T., Bateman W. N., Hood L. B.; Conrads P. T.: J. Proteom. Res. 9, 6091 (2010).
- Koříček M.: *Biochemické pojmy – výkladový slovník*; VŠCHT Praha, Praha 2004.
- Lindgren J. A., Hammarström S., Goetz E. J.: FEBS Lett. 152, 83 (1983).
- Hanazawa T., Kharitonov S. A., Barnes P. J.: Am. J. Respir. Crit. Care Med. 162, 1175 (2001).
- Antczak A., Montuschi P., Kharitonov S. A., Gorski P., Barnes P. J.: Am. J. Respir. Crit. Care Med. 166, 301 (2002).
- Baraldi E., Carraro S., Alinovi R., Pesci A., Ghiso L., Bodini A., Piacentini G., Zacchello F., Zanconato S.: Thorax 58, 505 (2003).
- Csoma Z., Kharitonov S. A., Balint B., Bush A., Wilson N. M., Barnes P. J.: Am. J. Respir. Crit. Care Med. 166, 1345 (2002).
- MacFarlane A. J., Dworski R., Sheller J. R., Pavord I. D., Barry Kay A., Barnes N. C.: Am. J. Respir. Crit. Care Med. 161, 1553 (2000).
- Čáp P., Chládek J., Pehal F., Malý M., Petrů V., Barnes P. J., Montuschi P.: Thorax 59, 456 (2004).
- Effros R. M., Miller J., Dubbing M., Shaker R., v knize: *New Perspectives in Monitoring Lung Inflammation. Analysis of Exhaled Breath Condensate* (Montuschi P., ed.), kap. 12. CRC Press, Boca Raton 2005.
- Monoclonal Antibodies. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 7. vyd. [Online]; Wiley, staženo 15.2.2009.
- Syslová K., Kačer P., Kuzma M., Najmanová V., Fenclová Z., Vlčková Š., Lebedová J., Pelclová D.: J. Chromatogr., B 877, 15 (2009).
- Syslová K., Kačer P., Kuzma M., Klusáčková P., Fenclová Z., Lebedová J., Pelclová D.: J. Chromatogr., B 867, 1 (2008).
- Šilhánková L.: *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii*. VŠCHT Praha, Praha 2008.
- Fukal L., Holubová B.: *Imunochemie a imunoanalýza*. VŠCHT Praha, Praha 2007.
- Turková J.: J. Chromatogr., B 722, 11 (1999).

A. Némethová^a, K. Syslová^a, D. Pelclová^b, and P. Kačer^a (^a Department of Organic Technology, Institute of Chemical Technology, Prague; ^b Department of Occupational Medicine, 1st Faculty of Medicine, Charles University in Prague): **Preparation of Polymer Immunoparticles as a Tool for Separation Oxidative Stress Biomarkers from Body Fluids**

The work deals with preparation and characterization of polymer immunoparticles used as a separation tool for biomarkers from biological fluids like urine, plasma etc. Polymer immunoparticles consist of antibodies immobilized in a polyvinyl alcohol and polyethylene glycol matrix. Prepared immunoparticles, containing monoclonal antibodies against 8-iso Prostaglandin F_{2α}, were used as a tool for a preliminary separation of 8-iso Prostaglandin F_{2α} (a marker of oxidative stress) from complex biological matrix (urine) before a highly specific and precise detection and quantification by LC-ESI-MS method. The developed method was characterized by high precision and accuracy. Functionality of the method was tested in a clinical study where urine concentration levels of 8-iso Prostaglandin F_{2α} in patients with diagnosis of asbestosis or silicosis (oxidative stress induced diseases) and control group were compared.