

MONITOROVÁNÍ MALONDI- ALDEHYDU U PACIENTEK S KARCINOMEM DĚLOHY A VAJEČNÍKŮ POMOCÍ HPLC

JANA MATĚJČKOVÁ^a, MARTIN SAMEC^b,
MARTIN JAČEK^a a PETR TŮMA^a

^a Ústav biochemie, molekulární a buněčné biologie,
3. lékařská fakulta, Univerzita Karlova, Ruská 87, 100 00
Praha 10, ^b Gynekologicko-porodnická klinika 3. LF UK
a FNKV, Šrobárova 50, 100 34 Praha 10
petr.tuma@lf3.cuni.cz

Došlo 17.3.10, přijato 25.8.10.

Klíčová slova: malondialdehyd, HPLC, derivatizace,
oxidativní stres, karcinom

Úvod

Z poznatků zjištěných v posledních letech vyplývá, že vliv oxidativního stresu na zdraví jedince je mnohem rozsáhlejší než se původně předpokládalo a oxidativní stres je v současnosti považován za prvotní příčinu celé řady onemocnění¹. Z těchto důvodů je věnována velká pozornost hledání souvislostí mezi výskytem specifických biomarkerů oxidativního poškození biomakromolekul a vznikem konkrétního onemocnění².

Hlavním biomarkerem oxidativního poškození biomembrán je malondialdehyd (MDA)³. Působením reaktiv-

ních forem kyslíku dochází k lipoperoxidaci řetězců poly-
nenasyčených mastných kyselin, v první fázi vznikají hydro-
peroxydy a v další fázi dochází ke štěpení uhlíkové kost-
ry a uvolňování jednoduchých organických molekul,
z nichž nejvýznamnější je malondialdehyd¹. Uvolněný
MDA je reaktivní molekula, která se váže přes aminovou
a thiolovou skupinu na proteiny a nukleové kyseliny a tím
je poškozuje. Z těchto důvodů se MDA nalézá v tkáních
především jako vázaný a jen v malém množství ve volné
formě, přičemž z klinického hlediska je nejdůležitější sta-
novení celkového MDA⁴.

V dosud provedených klinických studiích byl vysoký
obsah MDA nalezen u kuřáků⁵ a u pacientů s rakovinou
prsů a plic⁶ s tím, že obsah MDA vzrůstá v pokročilých
stádiích nádoru. Zvýšené hladiny MDA byly prokázány
i u pacientů s diabetes mellitus⁷, u neurodegenerativních
nemocí (Alzheimerova a Parkinsonova choroba)⁸ a také
u preeklampsie⁹, která se v těhotenství projevuje otoky,
vysokým krevním tlakem a proteinurií. Právě vztah mezi
MDA a dalšími gynekologickými poruchami je sledován
v tomto článku.

Používané metody pro stanovení volného i celkového
obsahu MDA v lidské krevní plasmě jsou shrnuty
v tabulce I. Hladina volného MDA se měří v plasmě po
předchozí deproteinizaci přidávkou kyseliny chloristé¹⁰
nebo acetonitrilu¹¹. Pro stanovení celkového obsahu MDA
se vzorek odebrané plasmu derivatizuje i s přítomnými
proteiny¹⁰ nebo derivatizačnímu kroku předchází alkalická
hydrolyza plasmu¹². Rutinní metodou pro stanovení volné-
ho i celkového malondialdehydu v klinických vzorcích je
fotometrické stanovení s kyselinou thiobarbiturovou^{13,14}.
MDA vytváří reakci s kyselinou thiobarbiturovou barevný
produkt, který se stanovuje fotometricky při vlnové délce
532 nm (cit.¹⁵). Uvedená metoda je značně nespecifická,
protože kyselina thiobarbiturová poskytuje pozitivní reakci
i s dalšími látkami přítomnými v biologickém materiálu
(monosacharidy, mnohé aminokyseliny, pyrimidiny, puri-

Tabulka I

Přehled používaných metod pro stanovení malondialdehydu v lidské krevní plasmě

Metoda – detekce	Derivatizační činidlo	LOD [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Lit.
Fotometrie – UV/VIS	kyselina thiobarbiturová	0,1	14
HPLC – UV/VIS	kyselina thiobarbiturová	0,05	10
HPLC – UV/VIS	kyselina thiobarbiturová	0,07	17
HPLC – FD	kyselina thiobarbiturová	0,01	18
GC – MS	fenylhydrazin	5 pmol	19, 20
GC – MS/ECD	2,4,6-trichlorofenylhydrazin	0,4 (MS) 0,03 (ECD)	21
HPLC – UV/VIS	2,4-dinitrofenylhydrazin	0,025	12
HPLC – UV/VIS	diaminonafalen	0,00005	24
HPLC – UV/VIS	–	0,012	25
CE – UV/VIS	–	0,4	11
CE – UV/VIS	–	12,6	26

ny, žlučová barviva)¹⁶. Z těchto důvodů je vhodné derivatizaci vzorku s kyselinou thiobarbiturovou kombinovat s následnou HPLC separací vzniklých produktů^{10,17,18}.

Specifičtějšími derivatizačními činidly pro MDA jsou fenylhydrazin^{19,20} a jeho deriváty (2,4,6-trichlorofenylhydrazin²¹, 2,4-dinitrofenylhydrazin^{12,22,23}) nebo diaminonafalen²⁴. Po derivatizaci vzorku následuje HPLC separace s UV/VIS detekcí^{12,22–24} nebo se využívá kombinace GC s hmotnostní detekcí^{19,20} nebo detektorem elektronového záchytu (ECD)²¹. Pomocí těchto metod lze dosáhnout LOD kolem 0,01 $\mu\text{mol l}^{-1}$, který je dostatečně nízký pro monitorování volného i celkového MDA v krevní plasmě.

V literatuře je popsána i přímá separace MDA pomocí HPLC²⁵ a kapilární elektroforézy^{11,26} bez předchozí derivatizace. MDA se deteguje ve své nativní formě při vlnové délce 267 nm. Přímé elektroforetické stanovení je málo citlivé a pro měření celkového obsahu MDA v plasmě musí být kombinováno s prekoncentrací vzorku¹¹.

Tento článek je zaměřen na optimalizaci derivatizačních podmínek pro reakci MDA s 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH) a na vývoj rychlé HPLC metody pro stanovení vzniklého derivátu MDA-DNPH. Vyvinuté stanovení je využito pro monitorování hladin celkového obsahu MDA v krvi pacientek s karcinomem dělohy a vaječníků.

Experimentální část

Chemikálie a příprava roztoků

Veškeré použité chemikálie byly čistoty p.a.: 1,1,3,3-tetrametoxipropan (99 %, Sigma Aldrich), (3-dimethylamino)-2-methyl-2-propenal (99 %, Sigma Aldrich), 2,4-dinitrofenylhydrazin (DNPH, 99 %, Sigma Aldrich), acetonitril (99 %, LachNer), kyselina sírová (96 %, Lachema), kyselina chloristá (70 %, Lachema), hexan (LachNer), hydroxid sodný (LachNer), aceton (Lachema) a ethanol (LachNer).

Zásobní roztok malondialdehydu o koncentraci 10 mmol l^{-1} byl připraven hydrolyzou 412 μl 1,1,3,3-tetrametoxipropanu v 250 ml 1% H_2SO_4 při pokojové teplotě po dobu 2 h. Vzhledem k nestálosti byl zásobní roztok MDA připravován každý den analýzy čerstvý. Jako interní standard byl použit methylmalondialdehyd (MeMDA)²⁷, který byl připraven reakcí 0,5 g (3-dimethylamino)-2-methyl-2-propenalu s 0,2 g pevného NaOH v objemu 700 μl vody. Reakce byla provedena v uzavřené skleněné zkumavce ve vodní lázni při teplotě 75 °C po 45 min. Reakční směs byla následně odpařena do sucha proudem dusíku při teplotě 40 °C a odparek byl rozpuštěn v 8 ml směsi aceton/ethanol (1:1, v/v); výsledná koncentrace MeMDA je 5 mmol l^{-1} . Takto připravený MeMDA byl uchováván při teplotě –20 °C. Přesná koncentrace standardního roztoku MDA byla zjištěna měřením absorbance při 267 nm (molární absorpční koeficient 31 800 $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$) a standardního roztoku MeMDA při 274 nm (molární ab-

sorpční koeficient 29 900 $\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$)¹⁹. Zásobní roztok derivatizačního činidla (2,4-dinitrofenylhydrazinu, DNPH) o koncentraci 5 mmol l^{-1} byl připraven rozpuštěním pevné substance v 2 M-HCl a uchováván v lednici.

Instrumentace pro HPLC

Chromatografická měření byla provedena na přístroji pro HPLC (Schimadzu, Japonsko) v sestavě: pumpa LC-10ADvp, autosampler SIL-10ADvp a UV/VIS detektor SPD-10Avp. K separaci derivatizovaného MDA byla použita kolona Ascentis Express C18, 100 × 3 mm, velikost částic 2,7 μm , (Sigma-Aldrich), která byla během separace termostátována na teplotu 30 °C. Separace probíhala izokraticky s mobilní fází o složení acetonitril/voda (40:60, v/v, k vodné fázi bylo přidáno 3,6 ml kyseliny octové na 930 ml vody). Průtoková rychlost činila 0,4 ml min^{-1} . Mezi jednotlivými analýzami byla kolona promývána směsí acetonitril/voda (85:15, v/v) po dobu 5 min rychlostí 0,4 ml min^{-1} a následně ekvilibrována promytím mobilní fází po dobu 6,5 min. K dávkování vzorku byla použita dávkovací smyčka o objemu 5 μl . Odezva detektoru byla zaznamenávána při vlnové délce 307 nm. Pro ovládání přístroje a vyhodnocení chromatogramů byl použit program LC Solution verze 1.11SP1 (Schimadzu).

Derivatizace modelového vzorku MDA

Ředěním zásobního roztoku MDA (10 mmol l^{-1}) bylo připraveno 6 kalibračních roztoků MDA v koncentračním rozmezí 1–20 $\mu\text{mol l}^{-1}$. K přípravě standardu bylo použito 100 μl roztoku MDA, který byl smíchán se 100 μl interního standardu (MeMDA, 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$) a 400 μl 1,5 mol l^{-1} NaOH. Směs byla zahřívána ve skleněné vialce při teplotě 60 °C po dobu 60 min. Po vychladnutí bylo ke směsi přidáno 200 μl 35% HClO_4 . Vzorek byl následně derivatizován přidávkem 50 μl 5 mM DNPH při teplotě 60 °C po dobu 30 min. K vychladlému vzorku byly přidány 2 ml hexanu, směs byla 8 min intenzivně protřepávána a poté centrifugována 3 min při zrychlení 1780 g. Extrakce do hexanu byla ještě jednou opakována. Veškerý odebraný supernatant byl vysušen do sucha proudem dusíku při teplotě 40 °C a získaný odparek byl v konečné fázi rozpuštěn v 250 μl mobilní fáze a použit k HPLC analýze.

Příprava krevní plasmy pro stanovení MDA

Vzorky krve byly získány od 11 pacientek s indikací karcinomu dělohy a vaječníků (Gynekologicko-porodnická klinika Fakultní nemocnice Královské Vinohrady) a 7 zdravých kontrol ženského pohlaví. Vzorky nesrážlivé krve (odběrová nádoba Vacuette s antikoagulantem EDTA) byly po odebrání centrifugovány a oddělená plasma byla zmrazena a dlouhodobě skladována při teplotě –20 °C.

K HPLC stanovení bylo použito 100 μl rozmražené plazmy, které byly smíchány se 100 μl interního standardu (MeMDA o koncentraci 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$) a se 400 μl 1,5 mol l^{-1}

NaOH v nádobce Eppendorf²³. Takto připravená směs pro alkalickou hydrolyzu biologického materiálu byla zahřívána při teplotě 60 °C po dobu 60 min. Po vychladnutí bylo ke směsi přidáno 200 μl 35% HClO_4 . Směs byla protřepána a centrifugována po dobu 4 min při zrychlení 10 500 g . Veškerý odebraný supernatant byl přenesen do skleněné vialky a derivatizován DNPH podle stejného postupu jako modelový vzorek.

Statistické zpracování a vyhodnocení dat

Všechna chromatografická měření modelových vzorků i biologického materiálu byla provedena třikrát a výsledná hodnota je uváděna jako průměr \pm směrodatná odchylka (SD). Pro statistické vyhodnocení získaných dat a pro zobrazení chromatogramů byl použit program Origin 8.0 (OriginLab Corporation, Northampton, USA). Limit detekce byl počítán z výšky píku odpovídající trojnásobku šumu základní linie UV detektoru při 307 nm; šum byl zaznamenáván po dobu 1 min a má hodnotu 0,02 mV (peak to peak).

Výsledky a diskuse

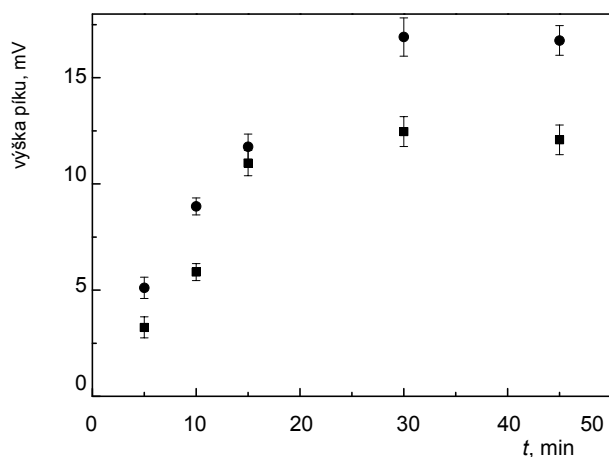
Optimalizace derivatizačních podmínek

Pro derivatizaci MDA byl použit 2,4-dinitrofenylhydrazin, který reaguje s karbonylovou skupinou za vzniku stabilního hydrazonu²⁸. Použití DNPH je mnohem specifitější než derivatizace kyselinou thiobarbiturovou a vzniklé produkty lze následně snadněji separovat pomocí GC nebo HPLC. Další předností derivatizace DNPH je dostatečně rychlý průběh i za mírných podmínek (teplota, pH). Jelikož se v literatuře uváděná doba i teplota derivati-

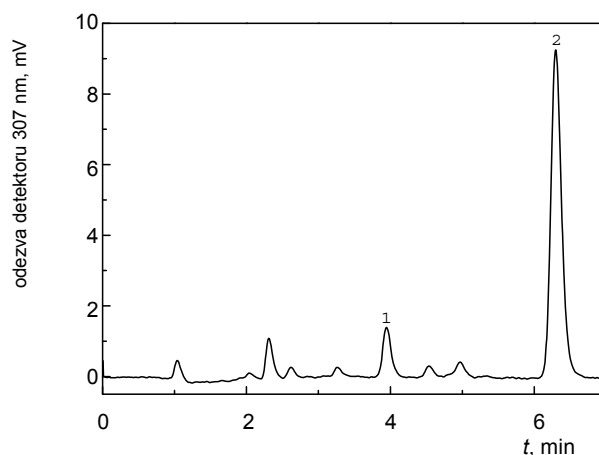
zace značně liší, byl v prvním kroku měřen výtěžek derivatizace v hydrolyzované plasmě při teplotě 60 °C v závislosti na čase. Z obr. 1 vyplývá, že k úplné derivatizaci MDA i interního standardu MeMDA dochází po 30 min. Podobné výsledky byly získány i pro modelovou směs obou aldehydů. Doba derivatizace 30 min byla použita ve všech dalších experimentech. Rozdílné výšky píků MDA a MeMDA v poměru k použité koncentraci jsou dány jinými absorpčními maximy vzniklých derivátů (MDA-DNPH maximum při 307 nm, MeMDA-DNPH maximum při 322 nm).

Optimalizace separačních podmínek v HPLC

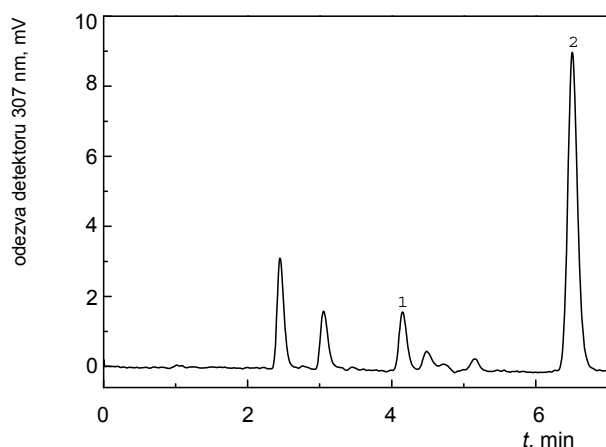
K separaci MDA-DNPH a MeMDA-DNPH byla použita krátká separační kolona 100×3 mm, která umožňuje rychlou analýzu. Při optimalizaci separačních podmínek byl sledován vliv: a) průtoku mobilní fáze v rozmezí 0,3 až 0,7 ml min^{-1} , b) složení mobilní fáze acetonitril : H_2O v rozmezí 20:80 až 50:50 (v/v) s přidávkou 3,6 ml kyseliny octové na 930 ml vody a c) dávkované množství vzorku (dávkovací smyčka na 5 μl a 10 μl). Při vysoké rychlosti průtoku mobilní fáze i při vysokém zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi je analýza rychlá, ale MDA-DNPH se neodděluje od ostatních komponent plasmu. Při nízkém průtoku mobilní fáze i při nízkém obsahu acetonitrilu se doba analýzy prodlužuje, pík MDA-DNPH se rozšiřuje a klesá citlivost stanovení. Z těchto důvodů bylo zvoleno optimální složení mobilní fáze acetonitril: H_2O (40:60, v/v, přidavek 3,6 ml kyseliny octové na 930 ml vody) s konstantním průtokem 0,4 ml min^{-1} . Pro úplné oddělení MDA-DNPH od ostatních komponent plasmu je nutné použít malé nádvávkované množství vzorku (5 μl), což souvisí s použitím



Obr. 1. Závislost výšky píku MDA (■) a MeMDA (●) na době derivatizace DNPH. Vzorek: krevní plasma; koncentrace MDA 12,4 $\mu\text{mol l}^{-1}$ a MeMDA 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Ostatní experimentální podmínky viz Experimentální část



Obr. 2. Chromatogram modelového vzorku MDA ($2,5 \mu\text{mol l}^{-1}$) po derivatizaci DNPH. Stacionární fáze: Ascentis Express C18; mobilní fáze: acetonitril: H_2O (40:60, v/v, přidavek 3,6 ml kyseliny octové na 930 ml vody); průtok 0,4 ml min^{-1} ; dávkovaný objem 5 μl ; interní standard: MeMDA, 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Identifikace píků: 1 – MDA, 2 – MeMDA



Obr. 3. Chromatogram krevní plasmy po derivatizaci DNPH se stanovenou koncentrací malondialdehydu $5,6 \mu\text{mol l}^{-1}$. Experimentální podmínky a identifikace píků viz obr. 2

krátké kolony. Za těchto experimentálních podmínek dochází k úplnému oddělení MDA-DNPH i MeMDA-DNPH od ostatních látek přítomných v modelovém vzorku (obr. 2) i v krevní plasmě (obr. 3). Nespecifikované píky v chromatogramu modelového vzorku odpovídají vedlejším produktům derivatizační reakce¹².

Citlivost, limit detekce a opakovatelnost stanovení

Parametry kalibrační závislosti vypočtené z plochy a výšky píku jsou pro modelový vzorek MDA a krevní plasmu shrnuty v tabulce II. Pro sestavení kalibrační závislosti v plasmě byla použita metoda přidavků standardu

Tabulka II
Parametry kalibrační závislosti HPLC stanovení MDA

Parametr	Modelový vzorek	Plasma
Testovaný rozsah, $\mu\text{mol l}^{-1}$	1 – 20	1 – 10
		<i>Plocha píku</i>
Citlivost, $\text{mV s } \mu\text{mol}^{-1} \text{ l}$	$1,968 \pm 0,026$	$1,768 \pm 0,061$
Úsek, mV s	$0,257 \pm 0,136$	–
<i>R</i>	1,000	0,998
		<i>Výška píku</i>
Citlivost, $\text{mV } \mu\text{mol}^{-1} \text{ l}$	$0,224 \pm 0,002$	$0,222 \pm 0,004$
Úsek, mV s	$-0,054 \pm 0,018$	–
<i>R</i>	1,000	0,999
LOD, $\mu\text{mol l}^{-1}$	0,27	0,27
LOD, mg l^{-1}	0,02	0,02

Tabulka III
Retenční čas, rozlišení píků a opakovatelnost HPLC stanovení MDA ve vzorku plasmy s koncentrací $7,7 \mu\text{mol l}^{-1}$ ($n = 10$)

Parametr	Hodnota
Retenční čas, min	$4,19 \pm 0,0$
CV – retenční čas, %	0,0
Plocha píku, mV s	$15,2 \pm 0,4$
CV – plocha píku, %	2,7
Rozlišení MDA/MeMDA	$8,8 \pm 0,1$

MDA k biologickému materiálu. Kalibrační závislosti vykazují vysoký stupeň linearitu pro plochu i výšku píku MDA v obou testovaných vzorcích. Limit detekce (LOD) $0,27 \mu\text{mol l}^{-1}$ je dostatečně nízký pro stanovení biomarkeru MDA v reálných vzorcích krve.

Krátká doba separace MDA do 4,5 min umožňuje zpracovávat rozsáhlé soubory vzorků, které jsou vyžadovány při klinických studiích, viz tabulka III. Opakovatelnost stanovení s koeficientem variace (CV) pro retenční čas 0,0 % a pro plochu píku 2,7 % je vyhovující a odpovídá opakovatelnosti běžných chromatografických stanovení spojených s derivatizací vzorku. Také oddělení píků MDA a MeMDA s hodnotou rozlišení přibližně 9 je dostatečné.

Hladiny biomarkeru MDA u pacientek s karcinomem

Hladiny MDA v krevní plasmě byly sledovány u pacientek s indikovaným karcinomem dělohy a vaječníků. V rámci této studie jsou oba typy karcinomů posuzovány společně v rámci jedné skupiny. Nalezená hladina MDA u pacientek s karcinomem je $11,8 \pm 1,5 \mu\text{mol l}^{-1}$; u zdravých kontrol je koncentrace MDA $6,9 \pm 1,8 \mu\text{mol l}^{-1}$, viz

Tabulka IV

Celkový obsah malondialdehydu v krevní plasmě u pacientek s karcinomem dělohy a vaječníků a u zdravých kontrol

Parametr	Karcinom	Kontroly
Počet jedinců	11	7
Průměr ± SD, $\mu\text{mol l}^{-1}$	11,8 ± 1,5	6,9 ± 1,8
Rozmezí, $\mu\text{mol l}^{-1}$	9,9–13,7	4,3–9,0

tabulka IV. Tento rozdíl je statisticky významný na hladině významnosti 0,05, což bylo prokázáno použitím ANOVA i *t*-testu. 1,7krát vyšší hladina MDA u pacientek s karcinomem v porovnání se zdravými kontrolami je způsobena zvýšenou mírou oxidačního stresu v průběhu karcinogeneze, která se projeví zvýšenou lipoperoxidací.

Závěr

2,4-Dinitrofenylhydrazin je vhodným derivatizačním činidlem pro analýzu biomarkeru lipoperoxidace MDA. Vzniklý derivát MDA lze snadno oddělit pomocí HPLC od ostatních komponent krevní plasmy a doba analýzy nepřesahuje 4,5 min (bez vnitřního standardu). Citlivost a opakovatelnost stanovení je dostatečná pro monitorování hladiny MDA v reálných vzorcích krevní plasmy. Z provedené klinické studie vyplynulo, že výskyt karcinomu dělohy a vaječníků je spojen s vyšším oxidačním stresem, jehož důsledkem jsou zvýšené hladiny MDA v krvi. MDA se může stát jedním z biomarkerů pro včasné monitorování gynekologických karcinomů.

Tato práce byla podporována MŠMT České republiky (výzkumný záměr č. MSM0021620814).

Seznam zkratk

MDA	malondialdehyd
MeMDA	methylmalondialdehyd
DNPH	2,4-dinitrofenylhydrazin
LOD	limit detekce
CE	kapilární elektroforéza
ECD	detektor elektronového záhytu
FD	fluorescenční detekce
VIS	viditelné záření

LITERATURA

- Štípek S.: *Antioxidanty a volné radikály ve zdraví a v nemoci*. Grada Publishing, Praha 2000.
- Atkinson A. J., Colburn W. A., DeGruttola V. G., DeMets D. L., Downing G. J., Hoth D. F., Oates J. A., Peck C. C., Schooley R. T., Spilker B. A., Woodcock J., Zeger S. L.: *Clin. Pharmacol. Therap.* 69, 89 (2001).
- Nielsen F., Mikkelsen B. B., Nielsen J. B., Andersen H. R., Grandjean P.: *Clin. Chem.* 43, 1209 (1997).
- Esterbauer H., Schaur R. J., Zollner H.: *Free Radic. Biol. Med.* 11, 81 (1991).
- Lykkesfeldt J.: *Clin. Chim. Acta* 380, 50 (2007).
- Esme H., Cemek M., Sezer M., Saglam H., Demir A., Melek H., Unlu M.: *Respirology* 13, 112 (2008).
- Slatter D. A., Bolton C. H., Bailey A. J.: *Diabetologia* 43, 550 (2000).
- Dib M., Garrel C., Favier A., Robin V., Desnuelle C.: *J. Neurol.* 249, 367 (2002).
- Rudra C. B., Qui C., David R. M., Bralley J. A., Walsh S. W., Williams M. A.: *Clin. Biochem.* 39, 722 (2006).
- Carbonneau M. A., Peuchant E., Sess D., Canioni P., Clerc M.: *Clin. Chem.* 37, 1423 (1991).
- Paroni R., Fermo I., Cighetti G.: *Anal. Biochem.* 307, 92 (2002).
- Pilz J., Meineke I., Gleiter C. H.: *J. Chromatogr. B* 742, 315 (2000).
- Bird R. P., Draper H. H.: *Methods Enzymol.* 105, 299 (1984).
- <http://www.nwlss.com>, staženo 18. května 2010.
- Fernández J., Pérez-Álvarez J. A., Fernández-López J. A.: *Food Chem.* 59, 345 (1997).
- Janero D. R.: *Free Radical Biol. Med.* 9, 515 (1990).
- Suttnar J., Mášová L., Dyr J. E.: *J. Chromatogr., B* 751, 193 (2001).
- Volpi, N., Tarugi P.: *J. Chromatogr., B* 713, 433 (1998).
- Cighetti G., Allevi P., Anastasia L., Bortone L., Paroni R.: *Clin. Chem.* 48, 2266 (2002).
- Cighetti G., Debiasi S., Paroni R., Allevi P.: *Anal. Biochem.* 266, 222 (1999).
- Stalikas C. D., Konidari C. N.: *Anal. Biochem.* 290, 108 (2001).
- Mateos R., Goya L., Bravo L.: *J. Chromatogr., B* 805, 33 (2004).
- Mateos R., Lecumberri E., Ramos S., Goya L., Bravo L.: *J. Chromatogr., B* 827, 76 (2005).
- Steghens J. P., van Kappel A. L., Denis I., Collombel C.: *Free Radical Biol. Med.* 31, 242 (2001).
- Karatas F., Karatepe M., Baysar A.: *Anal. Biochem.* 311, 76 (2002).
- Wilson D. W., Metz H. N., Graver L. M., Rao P. S.: *Clin. Chem.* 43, 1982 (1997).
- Claeson K., Thorsén G., Karlberg B.: *J. Chromatogr., B* 751, 315 (2001).

28. McMurry J.: *Organická chemie*. VUTIUM, Brno 2007.

J. Matějčková^a, M. Samec^b, M. Jaček^a, and P. Tůma^a (^a *Department of Biochemistry, Molecular and Cell Biology, Third Faculty of Medicine, Charles University, Prague*, ^b *Department of Gynaecology and Obstetrics, Faculty Hospital Královské Vinohrady, Prague*):
HPLC Monitoring of Malondialdehyde in Patients with Endometrial and Ovarial Cancer

A method for determination of malondialdehyde (MDA) as the major biomarker of oxidative damage of cellular membranes was developed. MDA was transformed to its 2,4-dinitrophenylhydrazone, which was then separated by HPLC. The LOD and repeatability of the method is satisfactory for monitoring MDA in blood plasma. The performed clinical study revealed systematically enhanced MDA levels in patients with gynaecological carcinoma in comparison with the control group.