Univerzita Hradec Králové

Přírodovědecká fakulta

Katedra biologie

Analýza vzorků vysoce rizikových toxinů v rámci mezinárodního laboratorního testování

Diplomová práce

Autor: Bc. Karolína Stuchlíková

Studijní program: N0588A030001 Biologie

Studijní obor: Biologie a ekologie: Specializace – Experimentální biologie

Vedoucí práce: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.

Oponent práce: PharmDr. Jiří Dresler, Ph.D.

Hradec Králové 2021

Univerzita Hradec Králové
Přírodovědecká fakulta

Zadání diplomové práce

Autor: **Bc. Karolína Stuchlíková**

Studium: S19BI018NP

Studijní program: N0588A030001 Biologie a ekologie

Studijní obor: Biologie a ekologie - spec. experimentální biologie

Název diplomové práce: **Analýza vzorků vysoce rizikových toxinů v rámci mezinárodního laboratorního testování**

Název diplomové práce AJ: Analysis of samples of high-risk toxins in international laboratory testing

Cíl, metody, literatura, předpoklady:

Vybrané laboratoře zabývající se analýzou vzorků, které obsahují vysoce riziková agens a toxiny, mohou být z vlastní vůle zapojeny do mezinárodního laboratorního cvičení, které zaštiťuje Organizace pro zákaz chemických zbraní (OPCW) se sídlem v Haagu, Nizozemí. V rámci diplomové práce jsou popsány postupy analýzy jedné sady testovaných vzorků, principy jednotlivých použitých metod a teoretický úvod zahrnující popis nejčastěji analyzovaných toxinů. Praktická část se pak týká vlastní analýzy, zejména pomocí metod hmotnostní spektrometrie, zahrnující též vyhodnocení získaných dat a přípravu reportu pro OPCW.

Klíčová slova: proteinové toxiny, hmotnostní spektrometrie, OPCW, ricin, saxitoxin

1. Simon, S., Worbs, S., Avondet, M. A., Tracz, D. M., Dano, J., Schmidt, L., Volland, H., Dorner, B. G., {\&
   Corbett, C. R. (2015). Recommended Immunological Assays to Screen for Ricin-Containing Samples. Toxins, 7(12), 4967–4986. https://doi.org/10.3390/toxins7124858
2. Worbs S, Skiba M, Bender J, Zeleny R, Schimmel H, Luginbühl W, Dorner BG. An International Proficiency Test to Detect, Identify and Quantify Ricin in Complex Matrices. Toxins (Basel). 2015 Nov 26;7(12):4987-5010. doi: 10.3390/toxins7124859. PMID: 26703726; PMCID: PMC4690109.
3. Pöhlmann, C., {\&
   Elßner, T. (2020). Multiplex Immunoassay Techniques for On-Site Detection of Security Sensitive Toxins. Toxins, 12(11), 727. https://doi.org/10.3390/toxins12110727

Garantující pracoviště: Katedra biologie,
Přírodovědecká fakulta

Vedoucí práce: RNDr. Alena Myslivcová Fučíková, Ph.D.

Datum zadání závěrečné práce: 23.1.2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně a uvedla jsem veškeré použité prameny a literaturu.

V Hradci Králové dne …… ……

Bc. Karolína Stuchlíková

Poděkování

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala vedoucí své diplomové práce RNDr. Aleně Myslivcové Fučíkové, Ph.D. za odborné a užitečné rady po celou dobu vedení mé diplomové práce. Dále bych velice ráda poděkovala Ing. Mgr. Miloslavě Ďuráčové a RNDr. Alžbětě Dlabkové, Ph.D. za pomoc a rady, které mi při vypracování této práce poskytovaly a také za velmi lidský přístup.

V neposlední řadě také děkuji své rodině za podporu a trpělivost během celého studia.

Anotace

STUCHLÍKOVÁ, K. *Analýza vzorků vysoce rizikových toxinů v rámci mezinárodního laboratorního testování.* Hradec Králové, 2021. Diplomová práce na Přírodovědecké fakultě Univerzity Hradec Králové. Vedoucí bakalářské práce Alena Myslivcová Fučíková. 87 s.

Diplomová práce se věnuje analýze toxinů ricinu, abrinu a saxitoxinu ve vzorcích v rámci mezinárodního testování pořádaného Organizací pro zákaz chemických zbraní. Testování je zaměřeno na kvalitativní stanovení toxinů ve vzorcích. Diplomovou práci uvádějí kapitoly týkající se biologických zbraní, jejich historie a současné regulace. Dále jsou v práci popsány jednotlivé toxiny, možnosti jejich získávání, vstupní cesta do organismu a v neposlední řadě také účinky na lidský organismus. Poslední oddíl představuje již samotná analýza toxinů ve vzorcích lidské plazmy pomocí metod, kterými jsou kapalinová chromatografie či hmotnostní spektrometrie.

Klíčová slova

proteinové toxiny, hmotnostní spektrometrie, Organizace pro zákaz chemických zbraní, ricin, saxitoxin

Anotation

STUCHLÍKOVÁ, K. *Analysis of samples of high-risk toxins in international laboratory testing.* Hradec Králové, 2021. Diploma Thesis at Faculty of Science University of Hradec Králové. Thesis Supervisor Alena Myslivcová Fučíková. 87 p.

Diploma thesis is focused on analysis of toxin ricin, abrin and saxitoxin in samples within the international testing organized by the Organization for the Prohibition of Chemical Weapons. Analysis is focused on the qualitative determination of toxins in samples. Diploma thesis begins with chapters concerning biological weapons, their history and current regulation. Furthermore the thesis describes the individual toxins, the possibilities of their acquisition, the pathways of entry into the organism, and last but not least, the effects on the organism. Last section is focused on the analysis of toxins in human plasma samples using methods such as liquid chromatography or mass spektrometry.

Keywords

protein toxins, mass spectrometry, Organization for the Prohibition of Chemical Weapons, ricin, saxitoxin

Seznam použitých zkratek

APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
B-agens	biologická agens
ESI	elektrosprejová ionizace
GC	plynová chromatografie
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
K_2EDTA	antikoagulant
LC	kapalinová chromatografie
LC-FLD	kapalinová chromatografie s fluorescenčním detektorem
LCMS	spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LCMS-ESI	spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií a elektrosprejovou ionizací
LCMS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LCMS/MS-ESI	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií a elektrosprejovou ionizací
LD50	dávka, jež zabije 50 % organismů, jimž byl jed podán
LFIA	imunodetekce v laterálním toku na membráně
MALDI	laserová desorpce/ionizace za účasti matrice
MS	hmotnostní spektrometrie
m/z	poměr hmotnosti a náboje
N/A	nelze použít
OPCW	Organizace pro zákaz chemických zbraní
OSN	Organizace Spojených Národů
PSB	fosfátový pufr
PST	paralytický toxin měkkýšů
RPM	otáčky za minutu
rRNA	ribozomální RNA
S	Svedberg
SRM	monitorování vybraných reakcí
STX	saxitoxin
SÚJB	Státní Úřad pro Jadernou Bezpečnost

TOF	analyzátor doby letu
UHPLC	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV-VIS	ultrafialová-viditelná spektroskopie
UV záření	ultrafialové záření

OBSAH

ÚVOD 11
1. TEORETICKÁ ČÁST PRÁCE 12
1.1. Biologické zbraně 12
1.1.1. Historie 12
1.2. Vstupní cesta do organismu 13
1.2.1. Inhalace 13
1.2.2. Alimentární cesta 14
1.2.3. Transdermální cesta 14
1.2.4. Pomocí vektorů 15
1.2.5. Další možné vstupy: intravenózně, intramuskulárně 15
1.3. Regulace biologických zbraní 15
1.3.1. Ženevský protokol 16
1.3.2. Úmluva o chemických zbraních 16
1.4. Organizace pro zákaz chemických zbraní (OPCW) 17
1.4.1. 5. cvičení BioToxin 18
1.5. Lektiny 19
1.5.1. Ricin 20
1.5.2. Abrin 21
1.5.3. Mechanismus vstupu ricinu a abrinu do buňky 22
1.6. Saxitoxin 24
1.6.1. Výskyt 24
1.6.2. Otrava saxitoxinem a její symptomy 25
1.6.3. Mechanismus toxicity 25
1.7. Charakteristika analytických nástrojů pro identifikaci toxinů 26
1.7.1. Kapalinová chromatografie (LC) 26
1.7.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) 27
1.7.3. Hmotnostní spektrometrie (MS) 30
1.7.4. Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LCMS) 32
1.7.5. Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LCMS/MS) 33
1.7.6. Kit pro zjištění přítomnosti ricinu 34

2. PRAKTICKÁ ČÁST PRÁCE 36
2.1. Metodika 36
2.2. Vybavení a chemikálie 36
2.2.1. Přístrojové vybavení 36
2.2.2. Kolony 37
2.2.3. Chemikálie 37
2.2.4. Laboratorní materiál 38
2.2.5. Programové vybavení 38
2.3. Materiál 39
2.3.1. Vzorky 39
2.4. Detekce ricinu a abrinu 40
2.4.1. Gelová elektroforéza, vyřezávání z gelu 40
2.4.2. Mobilní fáze pro LC-MS/MS 42
2.4.3. Příprava vzorků a jejich zpracování pro LC-MS/MS 43
2.4.4. Kit pro zjištění přítomnosti ricinu 43
2.5. Detekce saxitoxinu 43
2.5.1. Mobilní fáze pro LC-FLD a podmínky analýzy 44
2.5.2. Příprava vzorků a jejich zpracování na LC-FLD 45
2.5.3. Mobilní fáze pro LC-MS/MS 46
2.5.4. Příprava vzorků a jejich zpracování pro LC-MS/MS 46
3. VÝSLEDKY A DISKUSE 48
3.1. Ricin a abrin 48
3.1.1. LC-MS/MS 48
3.1.2. Kit pro zjištění přítomnosti ricinu 61
3.2. Saxitoxin 62
3.2.1. LC-FLD 62
3.2.2. LC-MS/MS 67
3.3. Seznam toxinů přidaných ke vzorkům 71
ZÁVĚR 74
LITERATURA 75
Seznam obrázků, grafů a tabulek 81
PŘÍLOHY 87

ÚVOD

V dnešní době je riziko biologického terorismu vyšší než v dobách minulých. Jedním z faktorů může být jejich nízká cena a také relativně snadná dostupnost biologických látek, které mohou být zneužity jako zbraně. Možná i proto se těmto látkám často říká zbraně chudých. Dohled nad těmito biologickými a dalšími chemickými látkami zajišťuje Organizace pro zákaz chemických zbraní (OPCW, z angl. Organization for the Prohibition of Chemical Weapons). Cílem OPCW je především kontrola dodržování Úmluvy o chemických zbraních, jež zakazuje používání chemických zbraní, včetně zbraní biologických. Již pátým rokem tak OPCW pořádá cvičení BioToxin, do kterého se členské státy OPCW mohou zapojit. Cílem těchto cvičení je možnost získat odborné znalosti v oblasti analýzy vzorků obsahující biologicky odvozené toxiny a porovnat tyto znalosti a poznatky s dalšími účastníky testování. Cvičení BioToxin 2020 se účastnilo celkem 30 laboratoří, včetně laboratoří Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany na pracovišti v Hradci Králové, kde byla vykonávána převážná většina praktické části této práce.

1. TEORETICKÁ ČÁST PRÁCE

1.1. Biologické zbraně

Biologická zbraň bývá definována jako zbraň hromadného ničení, která je schopna poškodit či zabít lidi, zvířata, ale i zlikvidovat zemědělské plodiny protivníka. Za biologickou zbraň se dá považovat zařízení, sestávající se z B-agens (biologická agens) a technického prostředku, jež zajišťuje jeho doručení. V současné době se za hrozbu potencionální biologické zbraně nepovažují jen důmyslné rakety a bomby, ale i velmi jednoduchá zařízení jako jsou práškovací nebo rozstřikovací přístroje (Pohanka et al., 2010). B-agens mohou být živé choroboplodné mikroorganismy (např. bakterie, viry, houby) či jimi produkované toxiny a metabolity, které mohou vyvolat infekční onemocnění a otravy lidí, zvířat či rostlin (Hartmanová, 2001).

Mezi rizika použití biologických zbraní patří schopnost vyvolat onemocnění se značným časovým odstupem od jejich použití, neboť některé nemoci mají poměrně dlouhou inkubační dobu, ve které může docházet k přenosu mezi dalšími lidmi. Prvotní příznaky onemocnění nemusejí být vždy typické a při záměrném použití více původců nemocí může dojít k vyvolání naprosto atypických projevů onemocnění (Holý et Chmelář, 2015).

1.1.1. Historie

Koncept použití biologických zbraní je velmi starý. První zneužití biologických látek bylo založeno především na kontaminaci zdrojů vody nebo potravin s plánovaným následným rozšířením epidemie. Příkladem nám může být císař Barbarossa v bitvě o italské město Tortona v roce 1155. O něco později v roce 1347 tatarská vojska při dobývání přístavu v městě Kaffa na území dnešní Ukrajiny, vhazovala na ulice mrtvá těla lidí, jež zemřeli na mor. Blechy opouštějící mrtvá těla pak představovaly vektory nemoci a dále pomocí prchajících obchodníků došlo k rozšíření dýmějového moru do Evropy. Tuto metodu vhazování infekčních mrtvých těl použili následně i ruští vojáci roku 1710 během války se Švédskem. Britská armáda prováděla systematické šíření nemoci ve druhé polovině 18. století při snaze potlačit odbojné indiánské kmeny. Při propuknutí epidemie neštovic došlo k jejich vědomému rozšiřování pomocí kontaminovaných šátků a přikrývek. Následná epidemie neštovic mezi Indiány byla umocněna i díky jejich vyšší citlivosti vůči této nemoci, než bylo například běžné u evropské populace.

Další rozvoj, nárust nebezpečnosti a také potenciálu zneužití biologických zbraní byl podmíněn rozvojem vědeckých a technických oborů, samozřejmě také objevy léčebných postupů a látek, které minimalizují ztráty útočníků (Novotný et al., 2011; Pohanka et al., 2010).

Při pohledu do novodobé historie můžeme nalézt další případy zneužití biologických agens. Nejvýraznějším se zdá být útok provedený krátce po teroristickém útoku na World Trade Center (Světové obchodní centrum) v roce 2001. Celkem 5 dopisů obsahujících živé spory *Bacillus anthracis* bylo tehdy anonymně rozesláno v průběhu roku 2001 do televizních a novinářských společností. Později toho roku byly odeslány další 2 dopisy, avšak tentokrát na adresu senátorů ve Washingtonu. Předpokládaný důvod útoků byla nejspíše msta za nedostatek podpory v oblasti výzkumu vakcinace proti antraxu a pravý odesílatel nebyl doposud vypátrán (Novotný et al., 2011; Pohanka et al., 2010).

1.2. Vstupní cesta do organismu

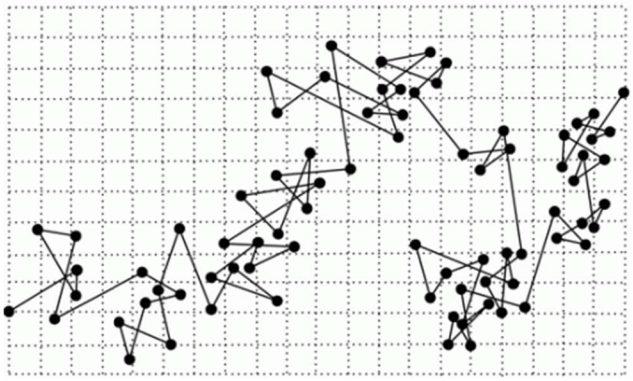
Při použití biologické zbraně je velmi důležitý i způsob vniknutí B-agens do organismu. Příznaky stejných agens se mohou diametrálně lišit v závislosti na cestě vstupu do organismu – od žádných příznaků, přes nevolnost až ke smrti exponovaného jedince.

1.2.1. Inhalace

Vdechnutí bývá nejvíce rizikové, neboť způsob distribuce agens může být velmi snadný, rychlý a těžko kontrolovatelný. Aerosolový mrak se tak dovede šířit samovolně s větrem nebo za použití rozprašovače. Navíc zde nastává riziko opětovného rozvíření, jak k tomu došlo v roce 1979 ve Sverdlovsku, kdy se likvidační četa nakazila antraxem při čištění kontaminovaných ploch proudem vody (Pohanka et al., 2010).

Velikost částic obsažených v aerosolu se pohybuje v rozmezí mikrometrů. Právě tato velikost je ideální pro interakci s povrchem alveol a pronikání do dolních cest dýchacích. Částice o velikosti do 1 μm mohou pronikat až na konec dýchacích cest do plicních váčků, alveolů nebo do koncových průdušinek, které do nich ústí. Částice o velikosti několika desetin mikrometru bývají z alveolů a celého dýchacího traktu proudem vzduchu opět vyneseny ven. Ale oproti tomu ještě menší částice s velikostí pod čtvrt mikrometru mají schopnost se v alveolech zachycovat snadněji, a to díky mechanismu zvaném Brownův

pohyb (Daneš, 2003). Brownovým pohybem (Obr. 1) se nazývá náhodný pohyb mikroskopických částic v kapalném nebo plynném médiu, které se vlivem tepelného pohybu neustále srážejí. Síla a směr těchto srážek jsou zcela náhodné.



Obr. 1: Brownův pohyb

1.2.2. Alimentární cesta

Alimentární cesta může být pro některá B-agens dominantní cesta vstupu do organismu. Při této vstupní cestě může dojít k nákaze pozřením kontaminovaných potravin nebo vody, přičemž velmi důležitou roli zde hraje zkonzumované množství nakažených potravin a také obsah toxinu v nich. Jak je uvedeno dále v kapitole věnující se ricinu, v některých případech nemusí k nákaze dojít vůbec – a to, pokud je jedovatý toxin obsažen např. v plodu s tvrdými plodovými obaly a při konzumaci nedojde k jejich porušení.

Pro představu úmyslná kontaminace vodárenské nádrže jako vodního zdroje pro obyvatelstvo se zdá jako snadný způsob šíření nákazy, ale je nutno vzít v potaz, že je zapotřebí použít veliké množství agens, aby nedošlo k naředění (Prymula et al., 2002).

1.2.3. Transdermální cesta

Tento způsob vniknutí toxinu do těla není častý, neboť neporušená kůže představuje vcelku dobrou ochrannou bariéru proti vniknutí B-agens do organismu. Mnohem častěji než otravy, B-agens při styku s kůži vyvolávají spíše alergické projevy, jako je vyrážka či záněty. (Prymula et al., 2002).

1.2.4. Pomocí vektorů

Další možnost rozšíření B-agens do populace může být provedena za využití infikovaných vektorů. Mohou být použity například komáři, blechy či klíšťata, kdy při sání krve dojde k přenosu a následné nákaze (Göpfertová et Pazdiora, 2003). Jako úskalí při použití infikovaných vektorů může být velmi vysoká možnost nákazy těch lidí, kteří se na výrobě biologické zbraně podílejí.

1.2.5. Další možné vstupy: intravenózně, intramuskulárně

Intravenózní či intramuskulární vstupní cesta je také jedna z možností, jak dostat B-agens do organismu. Tyto vstupní cesty nebývají využívány často, avšak při pohledu do historie můžeme nalézt útoky, které tyto vstupní cesty zahrnují. Skvělým příkladem poslouží útok na bulharského spisovatele a komunistu Georgi Ivanova Markova. V roce 1978 byl napaden nejspíše upraveným deštníkem, který ve své špičce obsahoval jehlu s jedem ricinem, který mu byl vpraven do lýtka. Ještě ten samý večer byl převezen do nemocnice, kde po 3 dnech od napadení zemřel. Následná pitva prokázala, že se jednalo o úmrtí na následky otravy ricinem (Papaloucas et al., 2008).

1.3. Regulace biologických zbraní

Úmluvy a další zákazy biologických zbraní nemohou jejich používání úplně zabránit, ale mohou jejich použití omezit či odradit útočníka od jejich použití. Pro oblast biologických zbraní jsou v současné době platné dva dokumenty. První dokument z roku 1925 je Ženevský protokol zakazující jejich použití. Druhý dokument je Úmluva o zákazu vývoje, výroby a hromadění těchto zbraní a o jejich zničení, zakazuje také materiální přípravy k jejich použití. Tyto dokumenty mají kořeny v dohodách, jež vycházely z humanitárních pohnutek a později se týkaly výslovně zákazu chemických zbraní.

Je nutno dodat, že v celém historickém vývoji však neexistovala přesná hranice mezi biologickými a chemickými zbraněmi. Toxiny odpovídají definici jak otravných látek, tak i B-agens a vytvářejí šedou zónu na pomezí biologických a chemických zbraní. Proto se úsilí o zákaz chemických a biologických zbraní mnohokrát v historii prolínalo či bylo zcela společné.

Neméně důležitým historickým milníkem byla Bruselská mírová konference uskutečněná roku 1874. Zde nejspíše došlo k prvnímu zmínění problematiky jedovatých a otrávených zbraní, jež byly použity v boji. Zde podepsaná deklarace nikdy nevstoupila v platnost, ale otevřela cestu k dalším jednáním. O 25 let později, tedy roku 1899 se konala Haagská mírová konference a došlo k vytvoření Haagské deklarace, jež se krom jiného zmiňuje o zákazu dusivých a ničivých plynů (Matoušek et al., 2007).

1.3.1. Ženevský protokol

Ženevský protokol z roku 1925 je nejstarší a dosud trvale platný mezinárodní právní dokument o regulaci zbrojení, včetně použití chemických a biologických zbraní. Tento dokument s přesným názvem Protokol o zákazu válečného použití dusivých, jedovatých a jiných plynů a bakteriologických metod vedení války, zkráceně Ženevský protokol podepsala tehdy ještě Československá republika v roce 1949. Později vydaný Dodatek o ochraně obětí mezinárodních ozbrojených konfliktů z roku 1977 přijala ČSSR roku 1978 (McElroy, 1991).

1.3.2. Úmluva o chemických zbraních

Úmluva o zákazu vývoje, výroby a hromadění biologických, chemických a toxinových zbraní a o jejich zničení, nazývána krátce Úmluva o zákazu chemických zbraní pochází z roku 1972. Bývalé Československo podepsalo tuto Úmluvu v roce 1972 a o rok později, tedy v roce 1973, ji ratifikovalo. Česká republika k Úmluvě přistoupila roku 1993. Každá Smluvní strana se svým podpisem zavazuje, že nebude za žádných okolností vyvíjet, vyrábět, hromadit či získávat mikrobiologická i jiná biologická agens a toxiny, a to bez ohledu na jejich původ, pokud to není nezbytné a opodstatněné pro profylaktické, ochranné nebo jiné mírové účely. Cílem je zastavit výrobu a vývoj jakýchkoliv mikrobiologických, biologických a toxinových zbraní, včetně jejich převozu či uskladňování, k čemuž se každá Smluvní strana svým podpisem zavazuje.

Tato Úmluva byla výsledkem snahy o doplnění Ženevského protokolu (Matoušek et al., 2007).

1.4. Organizace pro zákaz chemických zbraní (OPCW)

Organizace pro zákaz chemických zbraní (Obr. 2) je mezinárodní organizace vzniklá roku 1997 sídlící v Nizozemském Haagu. Jejím hlavním cílem je prosazování a kontrola dodržování Úmluvy o chemických zbraních. OPCW každoročně pro své členské státy pořádá konferenci, na které jsou probírána témata týkající se financí, vzájemné pomoci mezi členskými státy, dodržení termínů likvidace chemických látek jednotlivých členských zemí či například rozšíření seznamu kontrolovaných látek.

V současné době má OPCW 193 členských států, které jsou povinny si v případě ohrožení nebo napadení chemickými zbraněmi navzájem pomoci. Tyto státy také přispívají na společný rozpočet, který v roce 2020 přesáhl 70 milionů EUR.

OPCW nespadá pod správu Organizace Spojených Národů (OSN, z angl. United Nations Organization), avšak obě organizace spolu velmi úzce spolupracují. OPCW, stejně jako OSN, používá 6 oficiálních jednacích jazyků, a to: angličtinu, arabštinu, čínštinu, francouzštinu, ruštinu a španělštinu.

OPCW vede výše zmíněný seznam kontrolovaných látek, jež se dělí do tří kategorií označených číslicemi 1, 2 a 3, viz Příloha 1. Do první kategorie patří nejnebezpečnější, snadno šiřitelná a interhumánně přenosná agens, které vyvolávají těžká a obtížně léčitelná onemocnění s vysokou mortalitou. Do druhé kategorie spadají méně nebezpečná agens, jež obvykle nejsou interhumánně přenosné a existuje možnost jejich léčby. Do poslední třetí kategorie se řadí méně běžná agens, jejich použití je málo pravděpodobné, nicméně jejich mortalita je taktéž vysoká. Každá kategorie obsahuje nejen seznam toxických látek, ale obsahuje také jejich prekurzory a jejich povolené nakládání s nimi. Pro tuto diplomovou práci významný ricin a saxitoxin (STX) jsou uvedeny v kategorii 1 (OPCW, 2021).

Spolupráci České republiky s OPCW zaštiťuje SÚJB (Státní úřad pro jadernou bezpečnost), konkrétně Oddělení pro kontrolu zákazu chemických zbraní spadající pod Odbor pro kontrolu nešíření zbraní hromadného ničení (SÚJB, 2021).

V roce 2013 byla OPCW udělena Nobelova cena za mír za intenzivní snahu o omezování chemických látek.

Obr. 2: Logo OPCW

1.4.1. 5. cvičení BioToxin

OPCW již pět let v řadě pořádá pro své členské státy cvičení BioToxin. Tato cvičení jsou zaměřena na analýzu vzorků biologicky odvozených toxinů. Účelem tohoto cvičení je získat odborné znalosti v oblasti analýzy vzorků toxinů ricinu a saxitoxinu, které jsou uvedeny v Úmluvě o chemických zbraních, a dále také o toxinech, jako je abrin, který je rovněž relevantní pro použití v chemických zbraních.

Každá účastnící se laboratoř je požádána o identifikaci a případně také stanovení přibližné hodnoty koncentrace obsaženého toxinu v zaslaných vzorcích. Účast na testování je čistě dobrovolná a výsledky tohoto cvičení neovlivní statut žádné aktuálně určené OPCW laboratoře, či laboratoře, která se o toto přiřazení snaží. Závěr testování představuje Report, který odešle každá účastnící se laboratoř. Tento Report by měl obsahovat výsledky testování jednotlivých vzorků, včetně použitých metod. Report podléhá přísným pravidlům pro odevzdání, jinak nemohou být výsledky testování uznány, byť by bylo vše ostatní správné.

Letošní cvičení je stejně jako v minulém roce zaměřeno na detekci ricinu, abrinu a STX v zaslaných vzorcích. Velikou výhodou oproti loňskému roku bylo zveřejnění matrice vzorku, ve kterém mají být toxiny detekovány (OPCW, 2020).

1.4.1.1. Scénář testování

Součástí každého zadání cvičení je i scénář, ve kterém je popsána fiktivní historie vzorků. Letošní scénář představuje následující scénu: smluvní stát požádal o pomoc OPCW při vyšetřování otravy některých svých občanů, neboť tento stát nemá možnost pokročilé analýzy při zjišťování původce otravy. Existují dvě odlišné skupiny obětí, které

se vyznačují rozdílnými příznaky. Jedna skupina obětí vykazuje příznaky, jež jsou shodné s otravou po požití jistých měkkýšů. Při vyšetřování pacientů bylo zjištěno, že se před několika dny všichni společně nacházeli na schůzce, kde byli měkkýši servírováni. Od jednoho pacienta byl odebrán krevní vzorek. Další krevní vzorek byl odebrán pacientovi, který zemřel. Jako negativní kontrola slouží vzorek, který byl odebrán zdravému dobrovolníkovi. Z odebrané krve byla oddělena krevní plazma, jež bude zaslána testovacím laboratořím. Vzorek s pozitivní kontrolou byl připraven v laboratoři OPCW a taktéž je zahrnut v sadě rozeslaných vzorků. Tato testovací sada obsahuje tedy 4 vzorky plazmy, jež jsou označeny BT20/PL05/16, BT20/PL06/16, BT20/PL07/16 a BT20/PL08/16.

Druhá skupina vzorků pochází od pacientů, kteří se účastnili stejného setkání jako výše zmínění pacienti, avšak neonemocněli hned. Zpočátku měli příznaky nachlazení nebo chřipky. Pacienti byly testováni na COVID-19, avšak výsledky byly negativní. Příznaky se postupně zhoršovaly, až někteří pacienti nakonec podlehli a zemřeli. Z odebrané krve byla oddělena plazma, která bude také zaslána laboratořím k analýze. Počáteční testy při použití imunodetekce v laterálním toku na membráně (LFIA z angl. Lateral Flow Immunoassay) ukázaly, že jeden vzorek je pozitivní na ricin. Jako negativní kontrola slouží vzorek plazmy, který byla získán od zdravého dobrovolníka. Pozitivní kontrolu představuje vzorek připravený v laboratoři OPCW. Tato sada obsahuje, stejně jako předešlá sada, 4 vzorky plazmy, které jsou označeny BT20/PL01/16, BT20/PL02/16, BT20/PL03/16 a BT20/PL04/16 (OPCW, 2020).

1.5. Lektiny

Lektiny, mezi které se řadí ricin a abrin, jsou veliká skupina proteinů a glykoproteinů se silnou biologickou aktivitou, jež s vysokou mírou specifity dovedou rozpoznávat cukry na buněčných membránách a vázat je. Nacházíme je téměř ve všech organismech obratlovců i bezobratlých, ve spoustě bakterií a virů, především ale v rostlinách, kde byly poprvé nalezeny. Tyto rostlinné lektiny byly na základě své schopnosti aglutinovat erytrocyty skrz glykoproteinové receptory pojmenovány aglutininy. Postupem času, kdy byla přítomnost lektinů zjištěna i v jiných organismech než jen v rostlinách, začaly být označovány jako hemaglutiny (De Mejía et Prisecaru, 2005). Mezi jejich vlastnosti patří schopnost vázat se na ribozomy a inhibovat syntézu proteinů, dále i snižovat aktivitu

telomerázy a inhibovat angiogenezi. Samotná struktura ricinu, tak i struktura abrinu se skládá ze dvou polypeptidových řetězců A a B, jež jsou spojeny disulfidovou vazbou.

1.5.1. Ricin

1.5.1.1. Výskyt

Ricin je glykoprotein, který bývá řazen mezi běžně dostupné rostlinné jedy, jež se nachází v semenech skočce obecného (*Ricinus communis*), které jsou při zralosti plodu uvolněny, a řadí se mezi nejprudší známé rostlinné jedy. Udává se, že ricin tvoří 1-5 % hmotnosti samotného plodu (Simon et al., 2015).

Skočec obecný je okrasná rostlina spadající do čeledi pryšcovitých (*Euphorbiaceae)* a svým původem pochází ze severovýchodní Afriky a jihozápadní Asie. Dnes je skočec obecný velmi rozšířenou rostlinou v subtropické oblasti a u nás bývá pěstován jako jednoletá okrasná rostlina. (Spivak et Hendrickson, 2005). Fazole plodu obsahují kromě jedu ricinu i alkaloid ricinin, který stimulačně působí na centrální nervovou soustavu (Ferraz et al., 1999).

1.5.1.2. Dostupnost ricinu

Z fazolí skočce obecného lze lisováním za studena získat ricinový olej, který býval po staletí používán jako projímadlo. Další využití nachází jako přísada do paliv dvoutaktních motorů či jako přísada do barev a laků, například na úpravu kožených výrobků. Od první světové války až do zhruba 60. let 20. století se olej získávaný z fazolí skočce obecného používal i jako mazivo pro letadla. Olej získaný lisováním za studena neobsahuje ricin a je tedy netoxický. Veškerý jed zůstává po lisování v odpadním produktu, který je po tepelné úpravě možné použít jako krmivo (Doan, 2004). Toxicita mizí při zahřívání na 80 °C po dobu 10 minut, nebo zahřívání na 50 °C po dobu 60 minut (Burrows et Renner, 1999).

Watson et al., (2003) ve své studií tvrdí, že neporušená fazole skočce obecného může projít trávicím traktem člověka s malými nebo i žádnými toxickými účinky. Uvádí se, že z 1 g semen skočce může být izolován 1 mg ricinu

1.5.1.3. Otrava ricinem a její symptomy

Při otravě ricinem velmi záleží na způsobu vniknutí jedu do organismu. Požití ricinu orální cestou způsobuje nevolnost, zvracení, průjem a později i krvácení do žaludku, přičemž k úmrtí může dojít během 3-5 dnů. Při podání ricinu intravenózně nebo intramuskulárně dochází k vnitřnímu krvácení, které může vyústit až v odumření tkáně a následně ke kolapsu hlavních orgánových systémů, což ve většině případů vyústí ve smrt jedince.

Inhalace ricinu způsobuje podráždění dýchacích cest, což vede ke slabosti organismu a horečce. V další fázi přichází na řadu plicní léze způsobující otoky (Shea et Gottron, 2004).

LD50 neboli dávka, která zabije 50 % organismů, jimž byl jed aplikován, se opět liší v závislosti na vstupu jedu do organismu. Nejnižší LD50 pro ricin nastává při inhalaci nebo injekčním podáním. Shea et Gottron (2004) a Moshiri et al. (2016) uvádějí, že LD50 pro člověka je 3-5 μg/kg, avšak Bradberry et al. (2003) uvádí až 5-10 μg/kg.

LD50 při orálním požití ricinu se pohybuje kolem 20 mg/kg (Moshiri et al., 2016). Pro myš je tato dávka uváděna jako 12 μg/kg (Hrdina et al., 2004).

1.5.2. Abrin

1.5.2.1. Výskyt

Abrin je toxalbumin, který se stejně jako ricin řadí mezi běžně dostupné rostlinné jedy, ale oproti ricinu je mnohem více toxický. Zdrojem bývají semena soterku (*Abrus precatorius; Abrus pulchellus*), jež řadíme do čeledi bobovitých (*Fabaceae*).

Soterky původně pocházejí z tropů Asie a Afriky a bývají ve spoustě zemí pěstovány jako okrasné rostliny. Jsou to tenké liány se složenými listy a květy v podobě motýlích křídel. Jsou to velmi běžné rostliny, kdy jejich semena byla díky svému vzhledu využívána na výrobu ozdobných šperků, a to především náhrdelníků a přívěšků (Dickers et al., 2003).

1.5.2.2. Dostupnost abrinu

Abrin je rozpustný ve vodě a lze jej extrahovat namočením vyloupaných a rozemletých semen soterku. Tento surový extrakt obsahuje kromě abrinu i několik bílkovin, avšak

laboratorní extrakcí lze získat čistý abrin bez příměsí, které můžou tvořit až 0,075 % hmotnosti semene (Dickers et al., 2003).

1.5.2.3. Otrava abrinem a její symptomy

Prvotní symptomy akutní intoxikace souvisejí s intenzivním podrážděním gastrointestinálního systému, mezi které se řadí zvracení a krvavé průjmy. Tyto počáteční symptomy se většinou projeví od 1 do 3 dnů po požití semen soterku, avšak jsou popsány i případy nástupu symptomů až po 5 dnech od požití (Fernando, 2001). Dále v organismu dochází k elektrolytové nerovnováze, jež se projevuje srdeční arytmií a mozkovým edémem doprovázeným ospalostí, křečemi, kómatem až kardiovaskulárním kolapsem. Při otravě se mohou dostavit i další symptomy, např. difuzní hemoragie, hemolytická anemie, oligurie či urémie, přičemž otrava může skončit srdečním selháním a následně smrtí jedince. Stejně jako ricin i abrin může být příčinou kontaktní dermatitidy (Hrdina et al., 2004). Velkou roli při otravě hraje také zralost semene a jeho celková integrita.

U mladších semen se vyskytuje měkčí a slabší obal, a proto bývají po požití více toxická než zralejší semena, jež mívají tvrdší obal, a která v případě jeho neporušení mohou projít gastrointestinálním traktem bez otravy jedince. Rozžvýkání semen před požitím značně zvyšuje možnost případné otravy (Johnson et al., 2009).

LD50 pro abrin při orálním požití je stanovena na 20 μg/kg pro myš a pro korýše žábronožku solnou je LD50 stanovena na 3,5 μg/kg (Hrdina et al., 2004). Pro krysy byla LD50 inhalační cestou stanovena na 3,3 μg/kg (Dickers et al., 2003).

Pro člověka je LD50 odhadována na 0,1-1 μg/kg, což je mnohem méně než u ricinu (Wang et al., 2015).

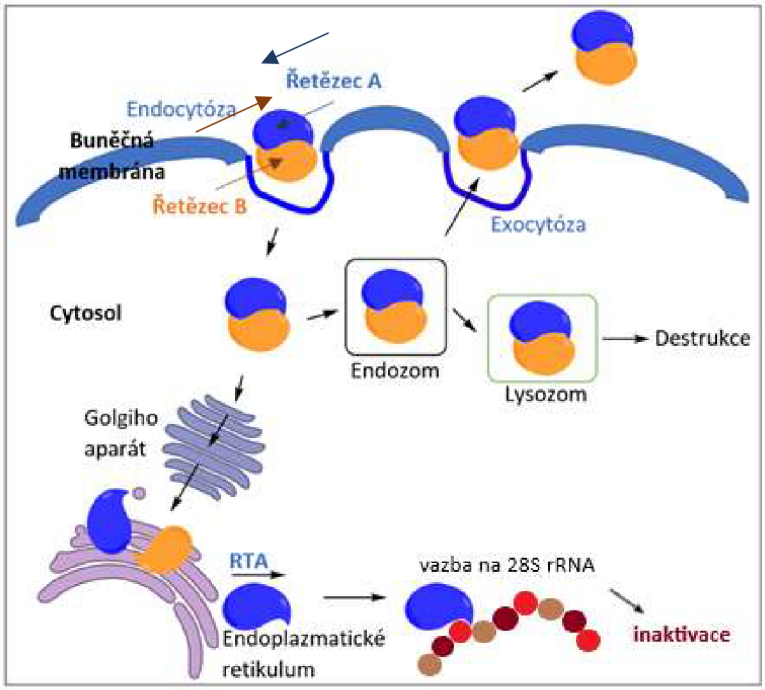
1.5.3. Mechanismus vstupu ricinu a abrinu do buňky

Ribozomy, na které ricin a abrin působí, se skládají z proteinů a rRNA (ribozomální RNA). Stavebně se dělí na velké podjednotky (60S), které jsou zodpovědné za syntézu proteinů, a malé podjednotky (28S). Rozdíly mezi ribozomy a jejich podjednotkami jsou často udávány pomocí sedimentačního koeficientu, což je veličina udávající čas, za který dojde k sedimentaci ribozomu v centrifuze. Jednotkou je Svedberg, označen jako „S“, přičemž sedimentační čas 1S je 10^{-13} sekundy.

Každý z obou řetězců těchto proteinů má přesně danou funkci. B-řetězec má na obou svých koncích vazebná místa pro galaktózu, jež usnadňuje vodíkovou vazbu s glykoproteiny a glykolipidy na povrchu buněk. A-řetězec nevratně inaktivuje adenin z 28S podjednotky rRNA. Tím dojde k zastavení vazby elongačních faktorů, což má za následek selhání syntézy proteinů. Při průniku do buňky je toxinový řetězec A nejdříve transportován do Golgiho aparátu, poté do endoplazmatického retikula a nakonec je translokován do cytosolu (Obr. 3) (Spivak et Hendrickson, 2005). Ve skupině tzv. proteinů inaktivující ribozomy má A-řetězec inhibiční funkci na ribozomální proteinovou syntézu, kdežto B-řetězec má schopnost navázat se na membránu buněk a umožňuje tak vstup A-řetězce do cytoplazmy.

Ze semen skočce obecného může být izolování mnoho složek. Ricin je zde zastoupen několika izoformami (A, B, C, D a E), jejichž výskyt a množství se odvíjí např. na stáří, velikosti či tvaru semen (Franke et al., 2019). Hmotnost A-řetězce nejvíce toxického ricinu D bývá udávána jako 32 kDA, zatímco hmotnost B-řetězce je 34 kDa (Doan, 2004).

Abrin je směsí chemicky velmi blízkých lektinů. Hmotnost samotného A-řetězce bývá udávána jako 30 kDa a B-řetězce 33 kDa (Hrdina et al., 2004; Tam et al., 2017).



Obr. 3: Mechanismus vstupu ricinu a abrinu do buňky

1.6. Saxitoxin

1.6.1. Výskyt

Saxitoxin je druh nervově paralytického jedu patřící do skupiny toxinů pojmenované jako Paralytické toxiny měkkýšů (PST, z angl. Paralytic Shellfish Toxin). Tyto toxiny jsou rozpustné ve vodě a schopnost jejich produkce je dána přítomností *stx* genu uvnitř buněk.

PST bývají produkovány dvěma různými skupinami živočichů, a to konkrétně prokaryotickými sinicemi, mezi něž se řadí například *Anabaena, Aphanizomenon, Lyngbya, Scytonema* a *Cylindrospermopsis,* a eukaryotickými dinoflageláty, kam patří například *Alexandrium, Gymnodium* a *Pyrodinium*. Toxiny se dále akumulují v tělech mořských měkkýšů, korýšů a sladkovodních plžů, kde se v rámci potravního řetězce obsažené jedovaté látky mohou dostat i k vyšším obratlovcům, včetně člověka (Casero et al., 2014).

STX byl v čisté formě poprvé izolován z aljašské máslové škeble zvané *Saxidomus giganteus* v roce 1957, odkud také pochází jeho název. STX je alkaloid s molekulovým vzorcem $C_{10}H_{17}N_7O_4$ a molekulovou hmotností 299,29 g/mol. Od prvního objevení STX bylo doposud identifikováno 57 analogů, jež mají sice společnou strukturu, ale liší se funkční skupinou na pozicích R1-R4. Dle těchto strukturálních variací dělíme PST na non-sulfátové, mono-sulfátové, di-sulfátové, dekarbamylované STX nebo na deoxy-dekarbamylované STX. Právě tyto strukturální variace určují celkovou toxicitu PST (Wang et al., 2016).

STX je mezi PST nejvíce toxický a při určování opět záleží na vstupní cestě a daném druhu organismu. Pro myš je při orálním požití LD50 stanovena na 263 μg/kg, inhalační cestou 300 μg/kg, intraperitoneální cestou 8 μg/kg a intravenózně 8,5 μg/kg. Orální cestou LD50 odpovídá 181 μg/kg pro psa, pro kočku je to pak 254 μg/kg a pro holuba 91 μg/kg (PubChem, 2021).

LD50 pro člověka bývá udávána množstvím 5,7 μg/kg při vstupu do organismu orální cestou. Saxitoxin může do lidského těla vstoupit i přes poraněnou kůži, kdy je předpokládaná smrtelná dávka 50 μg (Patočka et al., 2011). V literatuře je dále možné dohledat případy, kdy byl člověk vystavený PST ve vodě. Rapala et al.(2005) uvádí případ dvouletého chlapce, který po koupání v kontaminované vodě trpěl na podráždění

očí a u sedmiletého chlapce se vyskytla vyrážka celého těla. Gad (2014) tvrdí, že úmrtnost lidí u hlášených případů je 5,9 %, ale domnívá se, že spousta případů nemusí být hlášena, tím pádem konečné číslo může být ještě mnohem vyšší.

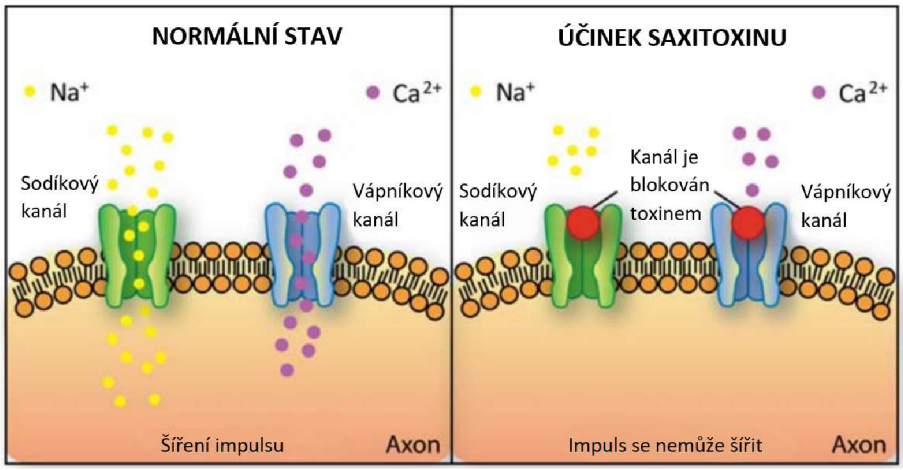
1.6.2. Otrava saxitoxinem a její symptomy

Otrava u lidí způsobená jedem STX a celou skupinou PST závisí na zkonzumovaném množství měkkýšů, ve kterých došlo k akumulaci těchto otravných látek.

Obecně se mezi příznaky otravy lidí řadí znecitlivění rtů a úst, které postupují do obličeje, krku a končetin. Později se dostaví ospalost, dočasná slepota, nesouvislá řeč, nevolnost a zvracení, či naopak ztrátu dávivého reflexu. Výše zmíněné příznaky často doprovází také bolest hlavy. Při akutní otravě může dojít k selhání dýchání s následnou smrtí, k čemuž může dojít v časovém rozmezí 2-12 hodin po požití. Mezi příznaky otravy mořských živočichů, např. velryb a delfínů, bývá řazena častá paralýza s následnou smrtí opět na respirační selhání (Solter et Beasley, 2013; Gad, 2014). Doposud neexistuje žádné antidotum (Gad, 2014).

1.6.3. Mechanismus toxicity

Molekula STX na své 2. a 8. pozici purinového kruhu obsahuje aminoskupiny. Přesněji amin s purinem vytváří quanidinovou skupinu, jež hraje důležitou roli, a která při vazbě s karbamyolem umožnuje navázání STX na iontové kanály (Nagarajan et al., 2012). PST fungují jako blokátory, které inhibují dočasnou permeabilitu sodíkových kanálů (Obr. 4) tím, že obsadí místa poblíž vnějšího otvoru a díky tomu dojde k jeho zablokování (Wang et al., 2016). Napěťově řízený sodíkový kanál je důležitý pro normální buněčnou funkci a Na^+ je nezbytný pro vznik a šíření akčního potenciálu v nervových a svalových vláknech (Thottumkara et al., 2014).



Obr. 4: Mechanismus inhibice sodíkových kanálů

1.7. Charakteristika analytických nástrojů pro identifikaci toxinů

1.7.1. Kapalinová chromatografie (LC)

Kapalinová chromatografie (LC z angl. Liquid Chromatography) je separační proces užívaný k izolaci jednotlivých složek ze směsi. Při tomto procesu dochází k oddělování směsí látek vzorku na jejich složky, a to na základě jejich struktury a dalších charakteristik.

Celý tento proces LC zahrnuje transport vzorku neseného mobilní fází přes fázi stacionární. Stacionární fáze je umístěna v koloně, která je naplněna pevnou látkou nebo kapalinou nanesenou na pevné látce. Mobilní fáze je tvořena kapalinou (v případě plynové chromatografie plynem; GC z angl. Gas Chromatography) a představuje rozpouštědlo. Mobilní fáze je vstřikována přes stacionární fázi a nese s sebou i složky směsi vzorku. Směs, která vykazuje silnější interakce se stacionární fází, se bude kolonou pohybovat pomaleji než směs se slabšími interakcemi. Část směsi s největší afinitou ke stacionární fázi se oddělí jako poslední, neboť je potřeba více času na průchod kolonou. Tento rozdíl v rychlostech pohybu je způsoben separací různých složek směsi. Na separaci a eluci jednotlivých složek směsi má vliv také povaha mobilní a stacionární fáze. V rámci kapalinové chromatografie nejčastěji rozlišujeme dva systémy, a to normální systém, kdy je stacionární fáze polárnější než mobilní fáze nebo reverzní systém, kdy je stacionární fáze nepolární a mobilní fázi představuje polární rozpouštědlo. V normálním systému jsou polární sloučeniny eluovány později než nepolární sloučeniny. V reverzním

systému je to naopak a nepolární sloučeniny jsou eluovány později než polární sloučeniny (Chemyx, 2021; Hashim, 2018).

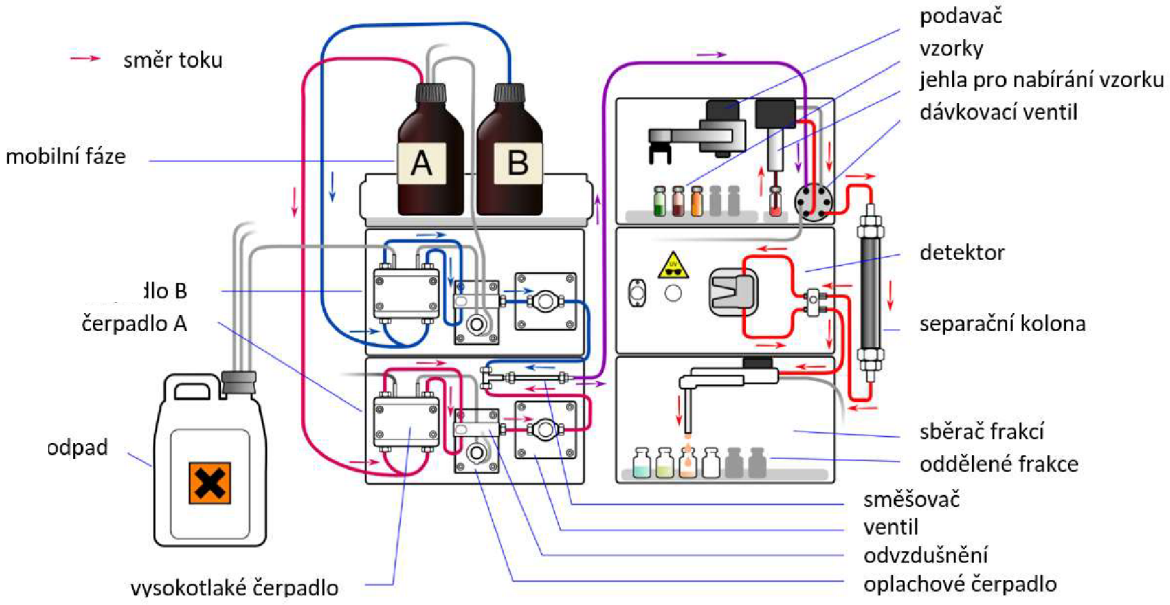
1.7.2. Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, z angl. High Performance Liquid Chromatography) je pokročilejší typ LC (Obr. 5). Rozdíl mezi LC a HPLC spočívá v tom, že rozpouštědlo v LC je poháněno pouze gravitační silou, kdežto v HPLC se rozpouštědlo pohybuje pod vysokým tlakem vytvořeným pomocí čerpadla. Dojde tak k nárůstu tlaku v naplněné koloně, což mnohonásobně snižuje dobu oddělování jednotlivých složek směsi. Dále je znám například systém UHLPC (ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie, z angl. Ultra-High Performance Liquid Chromatography), který se od HPLC liší ve velikosti částic stacionární fáze. Částice stacionární fáze v HPLC koloně nejčastěji mívají velikost 3-5 μm, kdežto UHLPC obsahuje částice, jež jsou menší než 2 μm (Knauer, 2020).

Sloučeniny se stanovují na základě jejich retenční doby neboli času, který jednotlivá složka směsi potřebuje k průchodu kolonou. Výstupem bývá chromatogram ve formě tzv. chromatografických píků, kde na ose *x* je znázorněn retenční čas a na ose *y* nalezneme intenzitu absorbance, která však závisí na použité metodě detekce. Nejčastější detekční metodou v proteomice je UV-VIS detekce (ultrafialová-viditelná spektroskopie, z angl. Ultraviolet-Visible Spectroscopy). UV-VIS měří intenzitu světla procházejícího vzorkem ve srovnání s referenčním měřením zdroje dopadajícího světla v rozsahu 180-780 nm. 180-380 nm slouží pro ultrafialovou oblast, kdežto 380-780 nm vymezuje viditelnou oblast světla, kdy množství absorbovaného světla je přímo úměrné koncentraci daného vzorku a také vzdálenosti jež světlo urazí (DeNovix, 2021). Dále bývají také často využívány fluorescenční detektory, jež jsou přidávány do sestavy kapalinové chromatografie s fluorescenčním detektorem (LC-FLD z angl. Liquid Chromatography with Fluorescence Detection). Sestava funguje na principu fluorescence neboli schopnosti látek absorbovat UV záření a následně vysílat záření o vyšší vlnové délce. K měření záření je použit fotonásobič, jež je umístěn kolmo na směr vstupujícího záření (Klouda, 2003).

Eluce neboli vymývání může být prováděno buď přes konstantní složení mobilní fáze, nebo přes mobilní fázi o různé eluční síle, kdy je složení programově měněno.

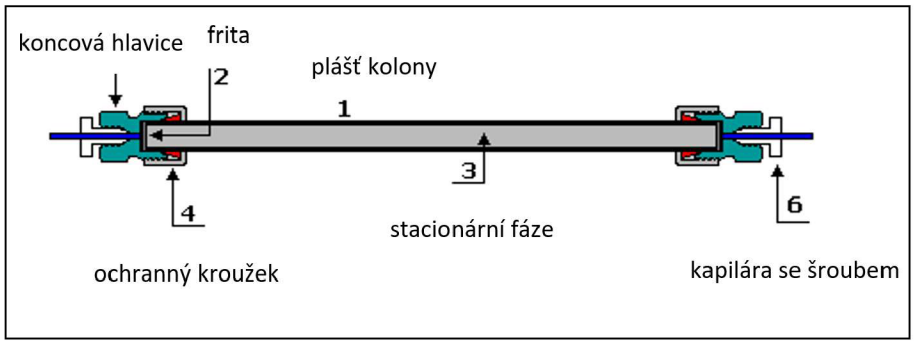
Celá sestava HPLC se skládá ze zásobníků na mobilní fázi, vysokotlakého čerpadla, odplyňovacího zařízení, dávkovacího zařízení, kolony, detektoru a počítače se softwarem pro vyhodnocení (Chemyx, 2021; Hashim, 2018).



Obr. 5: Schéma HPLC

1.7.2.1. Kolony

Velmi důležitou část HPLC i LC představují kolony (Obr. 6), v nichž dochází ke kontaktu stacionární fáze s mobilní fází a následně je tedy umožněna samotná separace. Kolony bývají nejčastěji tvořeny nerezovou ocelí, plastem či sklem a mají tvar trubice. Vnitřek kolony je uzavřen porézní fritou, která zabraňuje uvolňování stacionární fáze z kolony a současně také umožňuje plynulý průtok mobilní fáze. Klasické kolony mají délku 50-300 mm a vnitřní průměr 2-5 mm. Je důležité vědět, že rozdílné stacionární fáze poskytují rozdílné interakce se vzorkem, a proto je velmi důležité vybrat vhodnou kolonu pro daný experiment (HPLC, 2021; Hashim, 2018). Při analýzách můžeme použít i kolony s označením HILIC (chromatografie hydrofilních interakcí, z angl. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography,). Tyto kolony jsou typické pro systémy, které využívají vodně-organické mobilní fáze. Slovo "hydrofilní" charakterizuje afinitu k vodě, která se přidává do mobilních fází při HILIC separacích na polárních kolonách. Významnou výhodou HILIC separací je zvýšená citlivost následných LC-MS analýz, a to díky vylepšené ionizaci elektrosprejem v mobilních fázích s vysokým obsahem ACN (acetonitril) (Jandera, 2011).



Obr. 6: Schéma kolony

1.7.2.2. Předkolony

Předkolony jsou určeny k ochraně analytických kolon a dochází na nich k zachycování mechanických nečistot či silně zadržovaných látek. Jak jejich název napovídá, jsou umístěny před analytickou kolonou. Před předkolonu lze ještě předřadit filtr (mechanický, případně kombinovaný se sorbentem). Použití předkolony může zvýšit životnost samotné analytické kolony. Jejich délka je přibližně 10-20 mm. Vnitřní průměr a náplň předkolony by se měly shodovat s analytickou kolonou (HPST, 2021).

1.7.2.3. Automatické dávkovače

Automatické dávkovače neboli autosamplery jsou spojeny se zásobníkem vzorků, ve kterém jsou umístěny vialky uzavřené pryžovým septem či plastovou zátkou s pryží uprostřed. Existuje několik druhů konstrukčního spojení stříkačky dávkovače:

a) stříkačka dávkovače je fixní a pohybuje se pouze zásobník vzorku pod zvednutou jehlou stříkačky dávkovače

b) zásobník vzorků je fixní a pohybuje se raménko stříkačky dávkovače

c) zásobník i stříkačka jsou fixní, vialka je roboticky dopravena pod zvednutou jehlu stříkačky dávkovače.

Při dávkování by neměl být přerušen tok mobilní fáze kolonou, proto je součástí autosampleru přepínací ventil. K zamezení kontaminace vzorků dochází k oplachu jehly, a to jak z vnitřní, tak i z vnější strany. Prostor pro vzorky může být temperován a bývá chráněn před přístupem světla (HPLC, 2021).

1.7.3. Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie (MS, z angl. Mass Spectrometry) je výkonná analytická technika používaná ke kvantifikaci známých materiálů, k identifikaci neznámých sloučenin ve vzorku nebo také k objasnění struktury a chemických vlastností různých molekul. Tato metoda je velice citlivá, rychlá a zároveň specifická, a to vše při malé spotřebě vzorku. Nutno však dodat, že metoda je destruktivní. Hmotností spektrometrie je založena separaci různě těžkých a také elektricky nabitých iontů v magnetickém či elektrickém poli nebo v jejich kombinaci. MS funguje na principu, že pohybující se ionty mohou být různě vychýleny elektrickým a magnetickým polem v závislosti na své velikosti a náboji. Avšak molekuly nejdříve na tyto ionty musí být přeměněny, a to pomocí ionizace. Základním principem hmotnostní spektrometrie je tedy ionizace neutrálních molekul, po které následuje separace elektricky nabitých iontů dle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z) při jejich průchodu magnetickým nebo elektrickým polem a následná detekce různými typy detektorů. Výstupem MS bývá hmotnostní spektrum, dle kterého lze určit fyzikální, chemické nebo biologické vlastnosti chemických sloučenin např. jako určení izotopového složení prvků v molekule.

MS se skládá z automatického dávkovače, systému pro vytvoření vakua, zdroje iontů, ze kterého lze produkovat paprsek nabitých částic, analyzátoru, ve kterém lze paprsek rozdělit na části a z detektoru, pomocí kterého lze pozorovat oddělené ionty (Obr. 8) (Holčapek et al., 2012).

1.7.3.1. Iontový zdroj a ionizační techniky

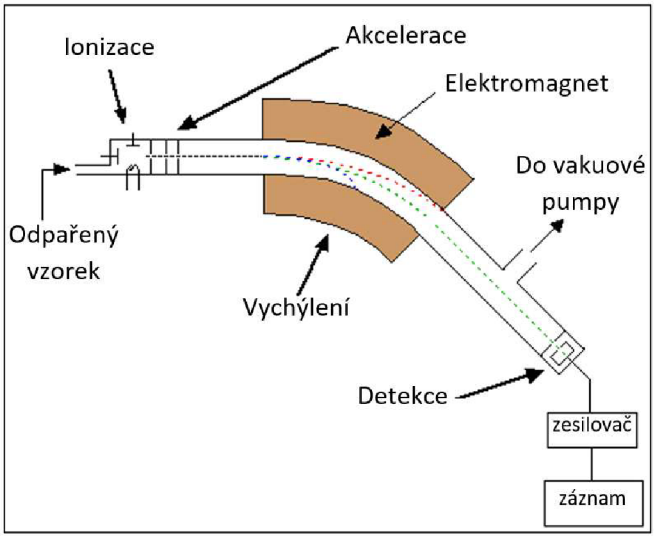
Iontový zdroj je využíván pro převedení molekul vzorku na ionty. Dle typu vzorku je nutné nejprve určit vhodnou ionizační techniku. Ionizační techniky dělíme v základu na tzv. „měkké“ a „tvrdé“, jež se liší množstvím dodané energie při ionizaci. Při tvrdé ionizační technice dochází u ionizované molekuly k získání nadbytku energie, která se projeví fragmentací molekuly na menší části, jež později slouží k identifikaci analyzovaného vzorku. Tvrdými ionizačními technikami vznikají tzv. fragmentové ionty a řadí se sem např. elektronová ionizace. V proteomice jsou však nejčastěji využívané měkké ionizační techniky, kdy při ionizaci molekula získá mnohem nižší množství energie, a proto jsou ve spektrech nejčastěji pozorovány zejména deprotonované a protonované molekuly při současném minimu fragmentových iontů.

Mezi tyto měkké techniky řadíme např. ionizaci elektrosprejem (ESI), MALDI (laserová desorpce/ionizace za účasti matrice, z angl. Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) či fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI).

Dále je nutné při výběru vhodné metody zohlednit i těkavost, molekulovou hmotnost a tepelnou stabilitu vzorku (Britannica, 2020; Premierbiosoft, 2021).

1.7.3.2. Analyzátor

Hmotnostní analyzátor slouží k rozdělení iontů v plynné fázi ve vysokém vakuu dle poměru jejich hmotnosti a náboje (m/z). Analyzátor je v MS umístěn za iontovým zdrojem, kde molekuly jsou již převedeny na ionty, a před detektorem, kde ionty musejí být nejprve rozděleny dle m/z. Pro rozdělení iontů v analyzátoru lze využít několik fyzikálních metod, např. zakřivení dráhy letu iontů v elektrickém nebo magnetickém poli (Obr. 7) využitím různé doby rychlosti letu iontů či využití různé stability oscilací iontů v dvojrozměrné nebo trojrozměrné kombinaci při stejnosměrném vysokofrekvenčním střídavém napětí (Premierbiosoft, 2021).



Obr. 7: Schéma analyzátoru v magnetické poli

Analyzátory od sebe odlišujeme především podle odlišného principu separace iontů na základě poměru jejich hmotnosti a náboje. Mezi nejvíce využívané analyzátory v proteomice se řadí kvadrupól, iontová past a analyzátor doby letu (TOF, z angl. Time-of-flight). Kvadrupól umožnuje separaci iontů při průchodu mezi čtyřmi kovovými tyčemi, jež jsou umístěny do čtverce rovnoměrně kolem středové osy.

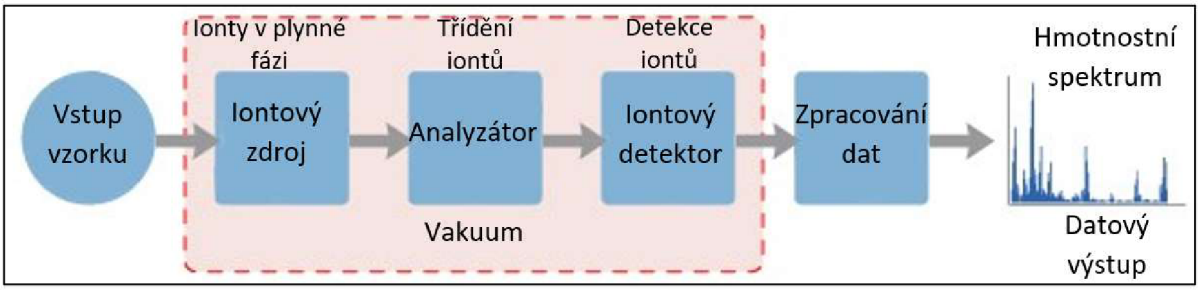
Na tyto tyče působí stejnosměrné a vysokofrekvenční napětí a to tak, že protilehlé páry tyčí mají stejnou polaritu (Lane, 2005).

Iontová past funguje na principu zadržení iontů v trojrozměrném elektrickém poli a jejich následném selektivním vypouštění. Ionty jsou v pasti zadržovány pomocí oscilujícího elektrického pole. Ionty jsou postupně vychylovány ze svých stabilních drah na detekrot v závislosti jejich poměru m/z (Lane, 2005).

TOF je tvořen letovou trubicí a bývá považován za jednoduchý analyzátor. Jednotlivé ionty jsou zde rozdělovány na základě doby letu trubicí. Iontům je na začátku udělena stejná kinetická energie a teprve v průběhu letu se od sebe jednotlivé ioty začínají dělit na základě jejich rychlosti letu. Ionty s menší hmotností překonají dráhu rychleji a dosáhnou detektoru dříve než ionty o hmotnosti větší. K analyzátorům doby letu lze ještě přidat reflektrony, neboli iontová zrcadla, která odrážejí letící ionty po mírně odkloněné ose směrem k detektoru. Jednotlivé ionty s vyšší rychlostí dosáhnou reflektronu dříve a proniknou hlouběji, čímž se vyrovná čas potřebný pro dosažení detektoru (Domon et Aebersold, 2006).

1.7.3.3. Detektor

Detektor je poslední částí MS. Ionty po rozdělení dopadají na detektor, jež z dopadajících iontů generuje signál. Opět je známo několik typů detektorů, a to např. fotonásobič či elektronový násobič (Premierbiosoft, 2021).

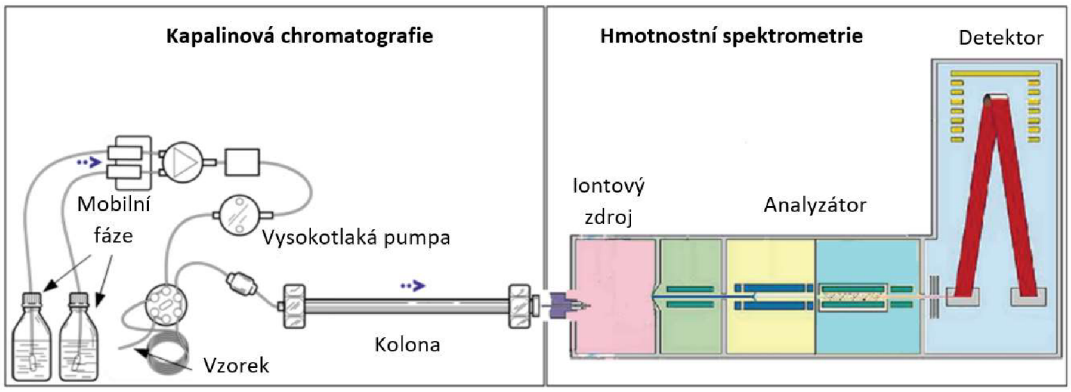


Obr. 8: Pořadí jednotlivých součástí v MS

1.7.4. Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LCMS)

LCMS (z angl. Liquid Chromatography Mass Spectrometry) je spojení vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s hmotnostní spektrometrií (Obr. 9) a v současnosti je široce využívanou technikou při analýze vzorků. Díky kapalinovému chromatografu

dochází k oddělování jednotlivých složek směsi, zatímco hmotnostní spektrometr umožňuje analyzovat jejich strukturu, a to vše s vysokou specifitou a citlivostí. Důležitou částí LCMS je zařízení, jež přeměňuje látky oddělené pomocí LC na zdroje iontů, které budou použity v MS. Toto zařízení umožňuje složkám analyzovaného vzorku přejít z mobilní fáze do hmotnostního spektrometru. Při tomto přechodu musí být přenesena co nejvyšší část analytu současně za přenesení co nejmenšího množství mobilní fáze. Z tohoto důvodu nedochází k užití klasických mobilních fází pro HLPC, ale většinou se přistupuje k použití mobilních fází založených na těkavých rozpouštědlech. Současně je nutné dbát také na to, aby nedošlo ke změně chemických vlastností analytu či k ovlivnění ionizátoru uvnitř MS. Nejčastěji používané rozhraní pro LCMS bývá založeno na elektrosprejové ionizaci (LCMS-ESI) (Agilent, 1998; Pitt, 2009).



Obr. 9: Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií

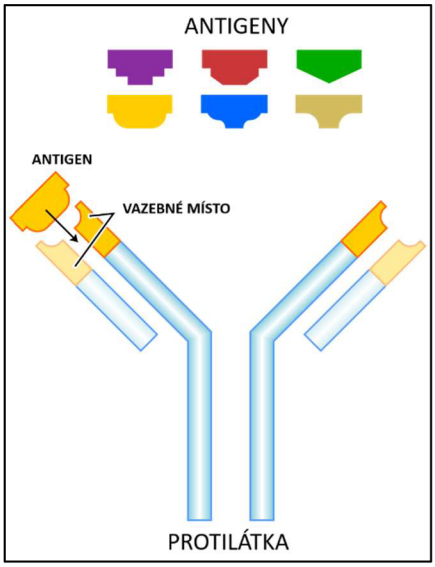
1.7.5. Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LCMS/MS)

Při metodě LCMS/MS (z angl. Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry) jak již její název napovídá, dochází ke dvojímu zapojení analyzátorů kdy k ionizaci molekul dochází odděleně buď v čase, anebo v prostoru, přičemž za sebou zapojené analyzátory nemusejí být totožné. Metoda je založena na předpokladu, že v prvním analyzátoru se mateřská molekula fragmentuje předvídatelným způsobem. Pokud mají dvě rozdílné mateřské molekuly stejný poměr hmotnosti k náboji, lze je při rozpadu na dceřiné ionty odlišit od sebe. V druhém MS dochází k fragmentaci dceřiných iontů, kdy každý má opět svůj vlastní poměr hmotnosti k náboji, a tedy může dojít k přesnější identifikaci. Tato metoda LCMS/MS bývá užívána v případě, že jedna ionizace není dostatečná k dosažení požadované citlivosti. Nejčastějším

rozhraním mezi LC a MS bývá opět založeno na principu elektrosprejové ionizace a tato sestava bývá označena jako LCMS/MS-ESI (z angl. Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry with Electrospray Ionisation) (Certara, 2020).

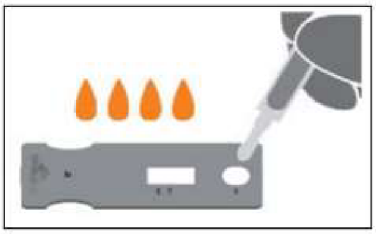
1.7.6. Kit pro zjištění přítomnosti ricinu

Pro relativně snadnou a rychlou detekci ricinu ve vzorku lze využít komerční kit MiPROTECT Ricin od společnosti Miprolab. Princip tohoto testu je založen na imunochemické reakci antigenu a specifických protilátek (Obr. 10-11). Kit se skládá ze samotné kazety obsahující protilátky ukotvené na membráně a dále z tyčinky na odběr vzorku. Na jedné straně obsahuje tyčinka houbičku, která je určena k nanesení vzorku, kdežto na druhé straně této tyčinky je pufr, který je možno nalomením tyčinky dopravit na houbičku se vzorkem (Miprolab, 2021).

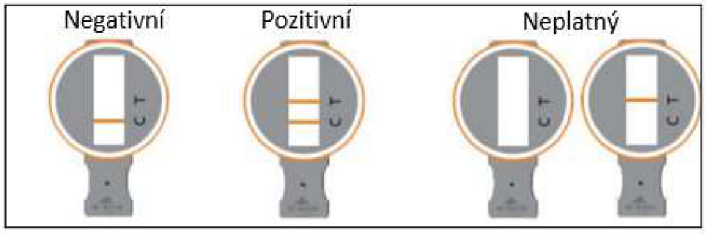


Obr. 10: Reakce antigenu a protilátek

Odečítání výsledků testu je velmi snadné. Pokud je na kazetě viditelný červený proužek v místě označeném C (kontrola), test proběhl správně. Pokud proužek na místě s označením C chybí, test je vyhodnocen jako neplatný. Stejně tak je test vyhodnocen jako neplatný, pokud se červený proužek nachází pouze na místě označeném T (test), nebo červený proužek úplně chybí. V případě pozitivního vzorku dojde na kazetě k objevení červeného proužku v místě C a T. Při negativním testu je na kazetě zobrazen červený proužek pouze na místě C (Obr. 12).



Obr. 11: Kit MiPROTECT



Obr. 12: Vyhodnocování testu

2. PRAKTICKÁ ČÁST PRÁCE

Veškerá praktická část práce probíhala v laboratořích Univerzity Hradec Králové a v laboratořích Katedry molekulární patologie a biologie Univerzity Obrany Hradec Králové.

2.1. Metodika

Metodika pro analýzu STX byla převzata od Tůmové (Tůmová, 2016). Metodika pro analýzu ricinu a abrinu byla vyvinuta na pracovišti Katedry molekulární patologie a biologie, Univerzity Obrany v rámci grantů.

Při práci s přístroji a vybavením bylo vycházeno z doporučených postupů a metodik jednotlivých výrobců.

Během zpracování celé této diplomové práce bylo dbáno na dodržení Metodických pokynů pro vypracování a obhajoby vysokoškolských kvalifikačních prací PřF UHK a citace jsou v souladu s nařízením pro vypracování dle Ecotoxicology and Environmental Safety. Práce je také psána s ohledem na ČSN 01 6910 (2014), jež se týká úpravy dokumentů zpracovaných textovými procesory.

2.2. Vybavení a chemikálie

2.2.1. Přístrojové vybavení

- Analytické váhy (Mettler Toledo, USA)
- Analytické váhy Sartorius CPA225D-0CE (Sartorius Weighting Technology GmbH, Německo)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Beckman Coulter PARADIGM (Fullerton, USA)
- Centrifuga Hettich 1406 (Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Německo)
- Centrifuga MiniSpin Plus (Eppendorf, Německo)
- Elektroforetická vana s příslušenstvím, XCell Sure-Lock (Life Technologies, USA)
- FlowBox (BioAir, Itálie)
- Lab dancer S040 (IKA Works, USA)

- LC Agilent 1260 (Agilent Technologies, USA)
- LC Thermo Finnigan Surveyor plus (Thermo Fischer Scientific, USA))
- LC Ultimate 3000 RSLCnano systém (Dionex, USA)
- MS Q-Exactive (Thermo Fischer Scientific, USA)
- MS Thermo LTQ XL (Thermo Fischer Scientific, USA)
- pH metr JENWAY 3510 (Jenway, Velká Británie)
- Thermomixer C (Eppendorf, Německo)
- Vakuová odparka Eppendorf 5301 (Eppendorf, Německo)
- Vortex Mixer ZX4 IR (Velp Scientifica, Itálie)
- Zdroj PowerPac 200V (Bio-Rad, Česká republika)

2.2.2. Kolony

- Acclain PePMap RSLC, C18 15cm x 75µm x 2µm, 100 Å (Dionex, USA)
- CN kolona Luna C18, 150 x 3 mm x 3µm, 100 Å (Phenomenex, USA)
- Kinetex C18, 150 x 3 mm x 3µm, 100 Å (Phenomenex, USA)

2.2.3. Chemikálie

- Acetonitril pro LC/MS – ACN (Sigma Aldrich, Německo)
- Brilliant Blue G CBB-G250 (Sigma Aldrich, Německo)
- Deionizovaná voda
- Hydrogenuhličitan amonný (Sigma Aldrich, Německo)
- Hydroxid sodný (Merck, USA)
- Iodoacetamid – IAA (Sigma Aldrich, Německo)
- Kyselina chlorovodíková – HCl (Sigma Aldrich, Německo)
- Kyselina mravenčí – FA (Sigma Aldrich, Německo)
- Kyselina octová (Sigma Aldrich, Německo)
- Kyselina trifluoroctová – TFA (Sigma Aldrich, Německo)
- Kyselina trichloroctová – TCA (Sigma Aldrich, Německo)
- Methanol pro LC/MS – MetOH (Merck, USA)
- Mili-Q voda (Merck, USA)
- Močovina (Sigma Aldrich, Německo)
- Mravenčan amonný pro LC/MS – AF (Sigma Aldrich, Německo)
- NuPage 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogene, USA)

- NuPage Antioxidant (Invitrogene, USA)
- NuPage LDS Buffer (Invitrogene, USA)
- NuPage MOPS SDS Running Buffer (Invitrogene, USA)
- Peroxid vodíku (Sigma Aldrich, Německo)
- Precisioin Plus Protein Standard Kaleidoscope (Bio-Rad, Česká republika)
- Tris – tris(hydroxymethyl)aminomethan (Sigma Aldrich, Německo)
- Tris(2-carboxyethyl)phosphine – TCEP (Sigma Aldrich, Německo)
- Trypsin (Promega, USA)

2.2.4. Laboratorní materiál

- Běžné laboratorní sklo (lahve pro uchovávání roztoků, kádinky)
- Centrifugační zkumavky, různé objemy (Eppendorf, Německo)
- Centrifugal Filter Units 0,22 µm Ultrafree-MC (Amicon, Milipore Corporation, USA)
- Empore extrakční cartridge C18-SD 4mm/1ml (Sigma Aldrich, USA)
- Indikátorové pH papírky (Sigma Aldrich, Německo)
- Koncentrační a odsolovací filtry Amicon, různé velikosti (Amicon, Milipore Corporation, USA)
- Mikropipety, různé objemy (Eppendorf, Německo)
- Mikrozkumavky, různé objemy (Eppendorf, Německo)
- MiPROTECT Ricin kit (Miprolab, Německo)
- Skalpel
- Skleněné inserty (J.G. Finneran, USA)
- Špičky pro mikropipety, různé objemy (Eppendorf, Německo)
- Vialky (Waters, USA)

2.2.5. Programové vybavení

- Beckman Coulter 3.2.0.6.v (Fullerton, USA)
- GraphPad Prism 8.4.0. (GraphPad Software, USA)
- ChemStation B.04.03. (Agilent Technologies, USA)
- Proteome Discoverer 2.4 (Thermo Fischer Scientific, USA)
- Xcalibur 2.5.0. (Thermo Fischer Scientific, USA)

2.3. Materiál

2.3.1. Vzorky

Pro detekci jednotlivých toxinů bylo použito 8 vzorků, jež byly připraveny v laboratoři OPCW (Rijswijk, Nizozemí) a následně zaslány na Fakultu vojenského zdravotnictví Univerzity obrany na pracovišti v Hradci Králové. Seznam jednotlivých vzorků je popsán v následující tabulce (Tab. 1).

Každý vzorek představoval lidskou plazmu o objemu 10 ml. Vzorky byly již u dodavatele (BioIVT, Spojené Království) přefiltrovány přes 0,2 μm filtr a byl k nim přidán antikoagulant K_2EDTA. Dárci vzorků byly negativní při testech na přítomnost HIV, syfilis, hepatitidy typu B, Západonilské horečky a také na viru Zika.

Číslo vzorku	Označení vzorku	Očekávané toxiny
1	BT20/PL01/16	ricin, abrin
2	BT20/PL02/16	ricin, abrin
3	BT20/PL03/16	ricin, abrin
4	BT20/PL04/16	ricin, abrin
5	BT20/PL05/16	saxitoxin
6	BT20/PL06/16	saxitoxin
7	BT20/PL07/16	saxitoxin
8	BT20/PL08/16	saxitoxin

Tab. 1: Seznam vzorků s očekávanými toxiny

Byly také obdrženy standardy abrinu a ricinu, viz Tab. 2. Toxiny byly rozpuštěny ve fosfátovém pufru (PBS, z angl. phosphate buffer saline), kde každý dosahoval koncentrace toxinu 100 μg/ml a které sloužily pro pozitivní porovnání.

toxin	Označení stadardu	toxin
ricin	BT20/AS01/16	ricin
abrin	BT20/AS02/16	abrin

Tab.2: Seznam standardů

2.4. Detekce ricinu a abrinu

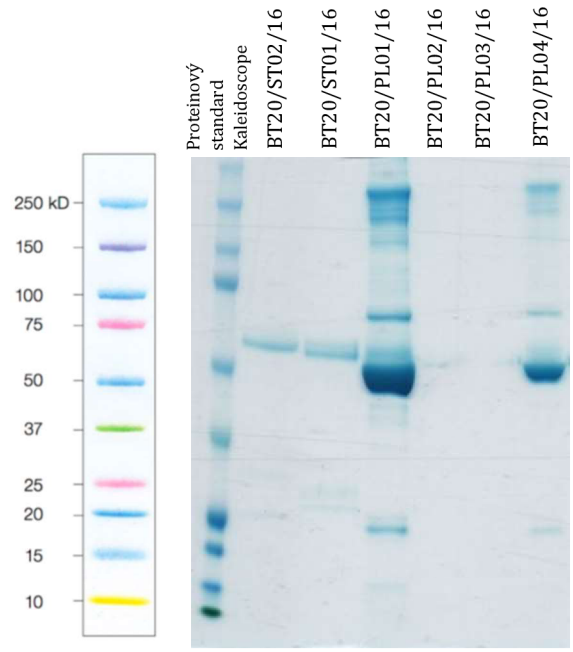
Detekce ricinu a abrinu byla prováděna na vzorcích BT20/PL01/16, BT20/PL02/16, BT20/PL03/16 a BT20/PL04/16, ve kterých byl předpokládán obsah těchto toxinů. Pro potvrzení byly využity obdržené standardy BT20/AS01/16 a BT20/AS02/16.

2.4.1. Gelová elektroforéza, vyřezávání z gelu

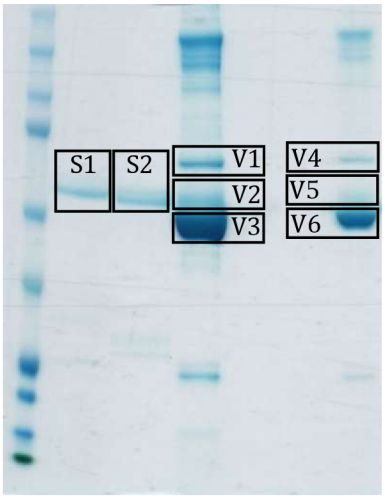
Vzorky BT20/PL01/16, BT20/PL02/16, BT20/PL03/16 a BT20/PL04/16 společně se standardy BT20/AS01/16 a BT20/AS02/16 byly použity na gelovou elektroforézu.

Z každého ze 4 vzorků bylo odebráno 0,17 µl alikvotu, ke kterému bylo přidáno 2,5 µl LDS NuPage pufru a 7,35 µl deionizované vody. Z každého standardu bylo odebráno 20 µl alikvotu a bylo přidáno 6,6 µl NuPage LDS pufru. Do komerčního gelu NuPAGE 4-12% Bis-Tris bylo napipetováno pokaždé 10 µl ze 4 alikvotů vzorků a 2 alikvotů standardů. Na gel byl také přidán proteinový standard Kaleidoscope. Dle pokynů výrobce byl připraven MOPS SDS pufr, kterým byl zalit gel a celá elektroforéza probíhala v neredukujících podmínkách, kdy dochází k zachování disulfidických můstků. Kompletní sestava byla připojena ke zdroji s nastavením 200 V stálého proudu po dobu 50 minut.

Po elektroforéze byl gel vyjmut a obarven v barvícím roztoku Jungblut (50% MetOH, 10% CH_3COOH, 39,95% H_2O, 0,05% CBB G-250). Po obarvení byl tento roztok odsát a ke gelu byl nalit odbarvovací roztok Jungblut (5% MetOH, 12,5% CH_3COOH, 82,5% H_2O). Po odbarvení bylo ke gelu přidáno 5 ml 7% CH_3COOH, vše bylo zataveno do plastové folie a oskenováno (Obr. 13).



Obr. 13: Gel po elektroforéze



Obr. 14: Gel po elektroforéze – značení

Po oskenování gelu byly vybrané (Obr. 14) barevné proužky obsahující proteiny označeny (S1, S2, V1, V2, V3, V4, V5 a V6), vyříznuty skalpelem a přeneseny do zkumavky. K vyříznutým proužkům bylo přidáno 200 µl promývacího pufru (100 mM Tris-HCl v 50% ACN, pH = 8,5) a zkumavky byly ponechány v termomixeru při mírném míchání po dobu 30 minut při pokojové teplotě. Supernatant byl odstraněn a do zkumavek bylo přidáno 200 µl ekvilibračního/štěpícího pufru (50 mM NH_4HCO_3 v 5% ACN, pH = 7,8). Zkumavky byly ponechány v termomixeru při mírném míchání po dobu 10 minut při teplotě 30 °C. Supernatant byl odstraněn a celý krok byl ještě jednou zopakován včetně odstranění nového supernatantu. Do zkumavek bylo přidáno 5 µl 100 mM TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine), díky čemuž došlo k redukci disulfidových můstků a vše bylo ponecháno v termomixeru za mírného míchání po dobu 30 minut při pokojové teplotě. V dalším kroku bylo do zkumavek přidáno 5 µl 300 mM IAA (iodoacetamid), jež zabrání opětovnému vytvoření disulfidových můstků, a vše bylo ponecháno v termomixeru při mírném míchání a pokojové teplotě po dobu 30 minut. Bylo dbáno na to, aby zkumavka byla ihned po přidání IAA ve tmě. Došlo k odstranění supernatantu. Následující kroky již sloužily pro odstranění zbytku IAA. Do zkumavek bylo přidáno 400 µl ekvilibračního/štěpícího pufru a ponecháno v termomixeru při mírném míchání po dobu 10 minut za pokojové teploty. Ze zkumavek byl odstraněn supernatant

a bylo přidáno 400 µl ACN. Celý obsah zkumavek byl opět ponechám v termomixeru při mírném míchání po dobu 10 minut při pokojové teplotě. Supernatant byl odstraněn, otevřené zkumavky byly vloženy do vakuové odparky a celý obsah zkumavek byl ponechán k vysušení. Dále byl namíchám zásobní roztok, který se skládal z 0,2 µg trypsinu (pro každý vzorek), a který byl rozmíchán v 10 µl ekvilibračního/štěpícího pufru. Do každé zkumavky bylo přidáno 10 µl tohoto zásobního roztoku trypsinu, jež štěpí proteiny v místě lysinu a argininu, a vše bylo ponecháno 10 minut při 4 °C. Nabobtnalé kousky gelu byly převrstveny ekvilibračním/štěpícím pufrem, aby došlo k jejich úplnému namočení. Zkumavky byly inkubovány přes noc v termomixerupři mírném míchání a teplotě 37 °C. V dalším kroku došlo k odebrání supernatantu do nové označené zkumavky. Ke kouskům gelu bylo přidáno 20 µl 2% TFA (kyselina trifluoroctová) a celý obsah byl třepán při 1500 RPM a 30 °C. Dále bylo přidáno 20 µl 60% ACN. Kousky gelu ve zkumavkách byly stočeny a supernatant byl přenesen k předchozímu supernatantu v označených zkumavkách. Tyto označené zkumavky se supernatantem byly dány do vakuové odparky a obsah byl vysušen. Takto zpracované vzorky byly připraveny na analýzu na LC-MS/MS, kdy před samotnou analýzou byly odpařené vzorky resuspendovány v mobilní fázi A.

2.4.2. Mobilní fáze pro LC-MS/MS

Mobilní fáze sestávala z části A, kde byla obsažena voda Mili-Q s 0,1 % FA (kyselina mravenčí) a z části B, jež se skládala z 80% ACN s 0,1 % FA. Gradient, jež byl použit během separace je uveden v následující tabulce (Tab. 3).

Čas [min]	Pumpa A [%]	Pumpa B [%]
0	96	4
5,1	96	4
41	66	34
52	45	55
53	10	90
61	10	90
62	96	4
74	96	4

Tab. 3: Použitý gradient – LC-MS/MS

2.4.3. Příprava vzorků a jejich zpracování pro LC-MS/MS

Analýza proběhla na LC Ultimate 3000 RSLCNano a MS Q-Exactive. Jako kolona pro LC byla použita Acclaim PepMap RSLC C18, 15 cm x 75 µm x 2 µm, 100 Å. Nástřik každého vzorku byl nastaven na 1 µl, průtok kolonou na 0,300 µl/min s teplotou kolony 40 °C. V MS byl jako zdroj ionizace použit nanoESI+ a jako plyn, ve kterém probíhala kolize byl použit dusík. Získaná data byla následně vyhodnocena pomocí bioinformatických nástrojů.

2.4.4. Kit pro zjištění přítomnosti ricinu

Přítomnost ricinu ve vzorcích byla krom analýzy pomocí LC-MS/MS zjišťována také za využití komerčního kitu MiPROTECT Ricin.

Tímto testem byly otestovány vzorky BT20/PL01/16, BT20/PL02/16, BT20/PL03/16, BT20/PL04/16 a také standard BT20/AS01/16, jež sloužil jako pozitivní kontrola a také standard BT20/AS02/16, jež sloužil jako negativní kontrola.

Plastová kazeta společně s odběrovou tyčinkou byly vyňaty z ochranného obalu. V dalším kroku byl z houbičky na odběrové tyčince sejmut plastový kryt a houbička byla ponořena do 100 µ vzorku, aby došlo k absorbování vzorku na houbičku. Poté byl opět nasazen plastový kryt na tyčinku s houbičkou. Na opačné straně tyčinky byla nalomena část oddělující pufr od zbytku tyčinky a pufr tak mohl stéct do plastového krytu na houbičku se vzorkem. Houbička byla 10x důkladně ponořena do pufru pohybem tam a zpět. V dalším kroku byly na membránu kazety kápnuty 4 kapky pufru se vzorkem a bylo vyčkáno přesně 20 minut. Po této době byly z kazety odečteny výsledky.

2.5. Detekce saxitoxinu

Detekce STX byla prováděna na vzorcích BT20/PL05/16, BT20/PL06/16, BT20/PL07/16 a BT20/PL08/16, ve kterých byl předpokládán obsah STX. Pro potvrzení byl využit standard STX, jež byl získán v přechozích ročnících OPCW testování. Pro zjištění, ve kterých vzorcích se STX nachází bylo nejprve využito stanovení pomocí LC-FLD. Tyto výsledky byly poté potvrzeny pomocí LC-MS/MS. Toto potvrzení bylo provedeno z důvodu, že OPCW uznává jako hlavní metodu LC-MS/MS, kdežto metodu LC-FLD akceptuje jako doplňkovou.

2.5.1. Mobilní fáze pro LC-FLD a podmínky analýzy

Mobilní fáze sestávala z části A, tedy roztoku 0,1M FA a ACN, kdy pH bylo upraveno pomocí FA na potřebnou hodnotu pH 6, a dále části B, která představovala vodu Mili-Q. Gradient, jež byl použit během separace, je uveden v následující tabulce (Tab. 4).

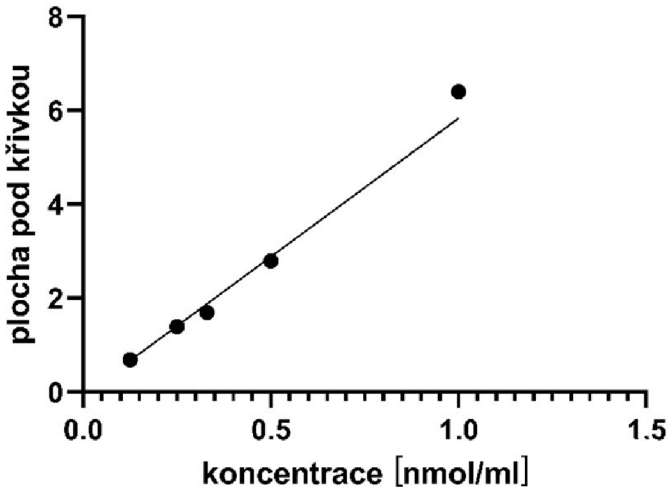
Čas [min]	Pumpa A [%]	Pumpa B [%]
0	100	0
3	95	5
5,5	30	70
10,5	5	95
12,5	5	95
13	100	0
20	100	0

Tab. 4: Použitý gradient – LC-FLD

Ze zásobního roztoku plazmy obsahující STX byla vytvořena sada kalibračních roztoků a sestavena kalibrační řada STX v koncentracích, jež jsou uvedeny v následující tabulce (Tab. 5).

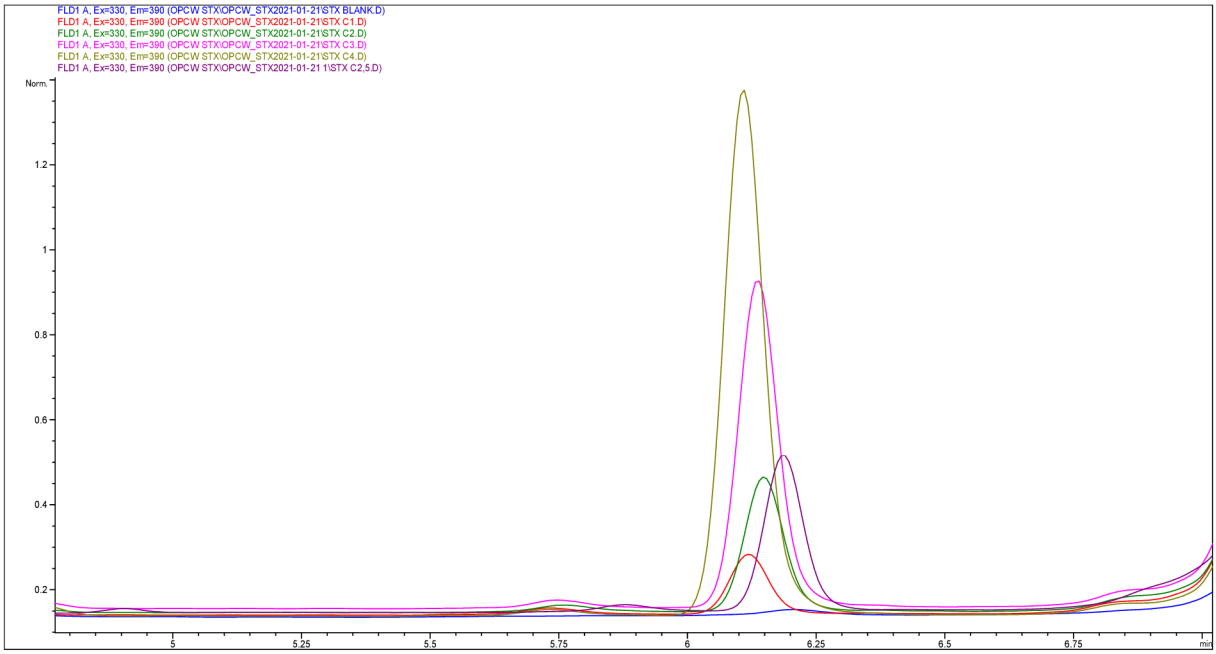
Označení	Výsledná koncentrace [nmol/ml]	Plocha pod píkem
C1	0,125	0,69
C2	0,25	1,4
C3	0,33	1,7
C4	0,5	2,8
C5	1	6,4

Tab. 5: Kalibrační řada



Graf 1: Kalibrační řada

Vytvoření kalibrační křivky (Graf 1) a zjištění plochy pod píkem bylo důležité pro zjištění, v jakém čase dochází k analýze přítomného STX ve vzorku a jaká je jeho koncentrace. Při koncentraciSTX 1 nmol/ml plazmy bylo zjištěno, že analýza STX probíhá v čase 6,4 sekundy, jak je možno vidět v tabulce (Tab. 5) a grafu (Graf 2).



Graf 2: Chromatogram kalibrační řady

2.5.2. Příprava vzorků a jejich zpracování na LC-FLD

Z každého ze 4 vzorků bylo odebráno 150 µl alikvotu, ke kterým bylo přidáno 125 µl NaOH a 12,5 µl 3% H_2O_2. Celý obsah byl promíchán na vortexu a nechán reagovat po dobu 2 minut při pokojové teplotě. Dále bylo ke každému vzorku přidáno

300 µl 10% TCA (kyselina trichloroctová), kdy došlo k zastavení oxidace a zároveň ke sražení proteinů v roztoku. Všechny vzorky byly centrifugovány při 25910x g po dobu 10 minut a teplotě 4 °C.

Po centrifugaci byl z každého vzorku odstraněn supernatant a přenesen do skleněné vialky. Takto upravený vzorek byl připraven na analýzu v LC-FLD. Analýza proběhla konkrétně na LC Agilent 1260 Infinity. Jako kolona zde byla použita Kinetex C18, 150 x 3 mm x 3 µm, 100 Å. Nástřik každého vzorku byl nastaven na 25 µl a průtok kolonou nastaven na 500 µl/min s teplotou kolony 30 °C. Jako detektor zde byl použit fluorescenční detektor s excitační vlnovou délkou 330 nm a emisní vlnovou délkou 390 nm.

Jako kontrola byl vzorek plazmy obsahující 0,5 µg/ml STX. Pro jistotu, že při analýze nedošlo k zachycení zbytků předchozího vzorku v koloně, byl před každým vzorkem otestován i blank (čistá plazma bez STX).

2.5.3. Mobilní fáze pro LC-MS/MS

Mobilní fáze sestávala z části A, kde byla obsažena voda Mili-Q a z části B, jež se skládala z roztoku 5 mM AF (mravenčan amonný), 0,1 % FA a 95 % MetOH. Gradient, jež byl použit během separace je uveden v následující tabulce (Tab. 6).

Čas [min]	Pumpa A [%]	Pumpa B [%]
0	95	5
8	10	90
10	10	90
10,5	95	5
15	95	5

Tab. 6: Použitý gradient – LC-MS/MS

2.5.4. Příprava vzorků a jejich zpracování pro LC-MS/MS

Z každého ze 4 vzorků bylo odebráno 150 µl alikvotu, ke kterým bylo přidáno 50 µl 10 % TCA. Celý obsah byl promíchán na vortexu a centrifugován při 15000 RPM po dobu 10 minut a teplotě 4 °C.

Po centrifugaci byl z každého vzorku odstraněn supernatant a přenesen do skleněné vialky. Takto upravený vzorek byl připraven na analýzu pomocí LC-MS/MS. Analýza proběhla na LC Thermo Finnigan Surveyor plus a MS Thermo LTQ XL. Jako kolona pro LC byla použita CN kolona Luna C18, 150 x 3 mm x 3 µm, 100 Å. Nástřik každého vzorku byl nastaven na 20 µl a průtok kolonou na 500 µl/min s teplotou kolony 25 °C. V MS byl jako zdroj ionizace použit ESI+ a jako plyn, ve kterém probíhala kolize bylo použito helium.

Jako kontrola byl použit vzorek plazmy s 0,5 µg/ml STX. Pro jistotu, že při analýze nedošlo k zachycení zbytků předchozího vzorku v koloně, byl před každým vzorkem otestován i blank (čistá plazma bez STX).

3. VÝSLEDKY A DISKUSE

3.1. Ricin a abrin

3.1.1. LC-MS/MS

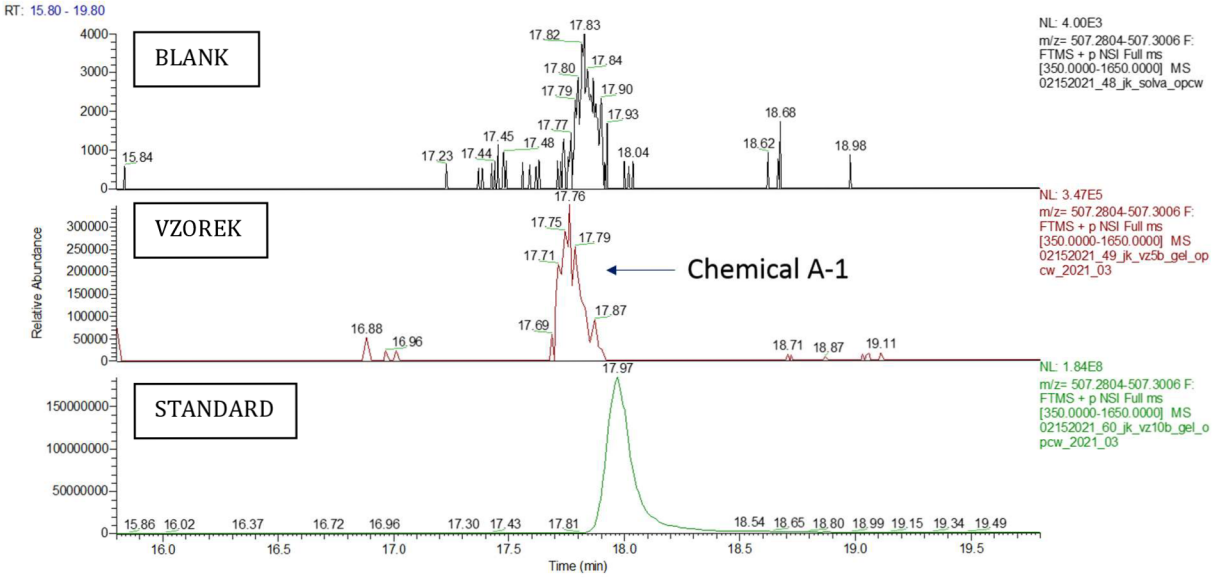
Bylo provedeno zpracování vyříznutých vzorků z gelu, a to konkrétně vzorek V1, V2 a V3 ze vzorku BT20/PL01/16 a vzorek V4, V5 a V6 ze vzorku BT20/PL04/16, ve kterých byl předpokládán obsah ricinu a abrinu. Společně se vzorky vyříznutými z gelu byl otestován i vzorek S2 představující standard ricinu (kousek gelu obsahující ricin) a vzorek S1 představující standard abrinu (kousek gelu obsahující abrin). Při analýze byla sledována pouze přítomnost či nepřítomnost toxinů ve vzorcích, nikoli jeho množství.

Pro jistotu, že při analýze nedošlo k zachycení zbytků předchozího vzorku v koloně, byl před každým vzorkem otestován i blank (pufr A).

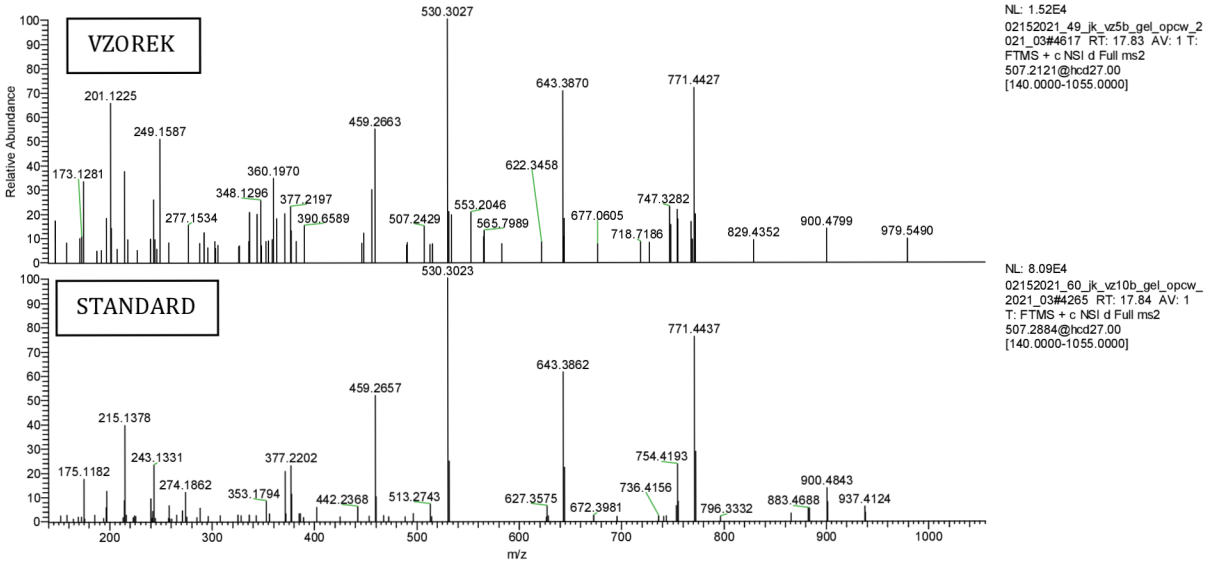
Pokud při analýze došlo k zaznamenání iontů o určité předem vybrané m/z (pro každý peptid a každý toxin jiné hodnoty), byla provedena jejich fragmentace v iontové pasti a zaznamenání vzniklých fragmentů pro potvrzení, že se jedná o námi hledaný toxin ricin nebo abrin, resp. jejich peptidy.

Při analýze vzorků na LC-MS/MS byla ve vzorcích V1 a V2 ze vzorku BT20/PL01/16 a vzorku V5 ze vzorku BT20/PL04/16 zjištěna přítomnost ricinu. Abrin nebyl zjištěn ani v jednom ze všech 4 testovaných vzorků. Každý toxin, jak již bylo řečeno, obsahuje řetězce A a B. Bylo dodrženo pokynů OPCW a pokud byl při analýze vzorku přítomen toxin, z každého řetězce byly identifikovány 2 peptidy. Ve vyříznutém vzorku z gelu, označeném jako V5, byly nalezeny 2 peptidy z každého řetězce. Ve vyříznutém vzorku z gelu, označeném jako V1, byl nalezen pouze 1 peptid z každého řetězce. Aby bylo dodrženo pravidel OPCW, byla provedena další analýza a ve vyříznutém vzorku z gelu, označeném jako V2, došlo k nalezení dalších peptidů. Celkově tedy 2 peptidy z každého řetězce.

3.1.1.1. BT20/PL01/16



Graf 3: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL01/16; V1 – fragment T11, řetězec A



Graf 4: Fragmentační spektrum v iontové pasti pro vzorek BT20/PL01/16; V1 – fragment T11, řetězec A

Označení	Sekvence AK	(M+H)+	(M+2H)2+
T11	LEQLAGNLR	1013.5738	507.2905

Tab. 7: Proteospecifická sekvence peptidu po štěpení trypsinem pro fragment T11, řetězec A, vzorek BT20/PL01/16; V1

Fragment Matches

Value Type: Delta Mass [ppm]

Ion Series | Neutral Losses | Precursor Ions | Internal Fragments

#1	b+	b2+	Seq.	y+	y2+	#2
1			L			9
2	+3.68		E	+10.99		8
3	+3.05		Q	+5.72		7
4			L	+2.53		6
5			A	+3.49		5
6			G	+2.35		4
7			N			3
8			L	+1.51		2
9			R	+2.07		1

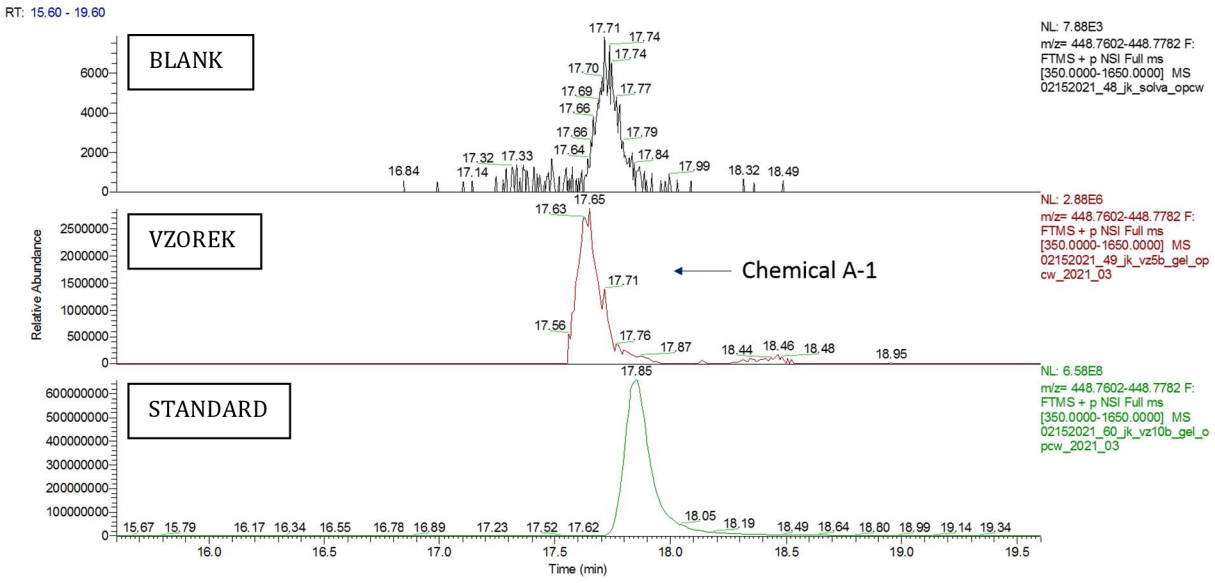
Fragment Matches

Value Type: Theo. Mass [Da]

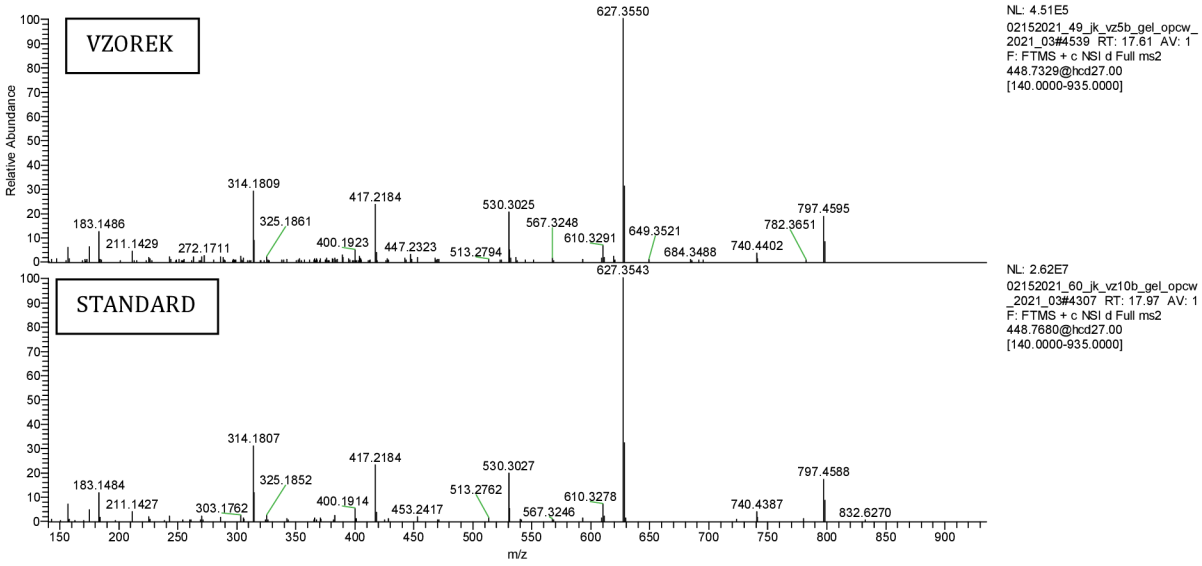
Ion Series | Neutral Losses | Precursor Ions | Internal Fragments

#1	b+	b2+	Seq.	y+	y2+	#2
1	114.09134	57.54931	L			9
2	243.13393	122.07061	E	900.48976	450.74852	8
3	371.19251	186.09989	Q	771.44716	386.22722	7
4	484.27657	242.64193	L	643.38858	322.19793	6
5	555.31369	278.16048	A	530.30452	265.65590	5
6	612.33515	306.67121	G	459.26741	230.13734	4
7	726.37808	363.69268	N	402.24594	201.62661	3
8	839.46214	420.23471	L	288.20302	144.60515	2
9			R	175.11895	88.06311	1

Tab. 8: Tabulka teoretických fragmentů peptidu LEQLAGNLR (T11) s vyznačením fragmentů reálně detekovaných během analýzy



Graf 5: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL01/16; V1 – fragment T7, řetězec A



Graf 6: Fragmentační spektrum v iontové pasti pro vzorek BT20/PL01/16; V1 – fragment T7, řetězec A

Označení	Sekvence AK	(M+H)+	(M+2H)2+
T7	VGLPINQR	896.5312	448.7692

Tab. 9: Proteospecifická sekvence peptidu po štěpení trypsinem pro fragment T7, řetězec A, vzorek BT20/PL01/16; V1

Fragment Matches

Value Type: Delta Mass [ppm]

Ion Series | Neutral Losses | Precursor Ions | Internal Fragments

#1	b+	b2+	Seq.	y+	y2+	#2
1			V			8
2	+2.95		G			7
3	+3.07		L	+1.56	+4.97	6
4	-8.95		P	+3.67	+4.36	5
5			I	+3.83		4
6			N	+5.05		3
7			Q	-0.26		2
8			R	+2.75		1

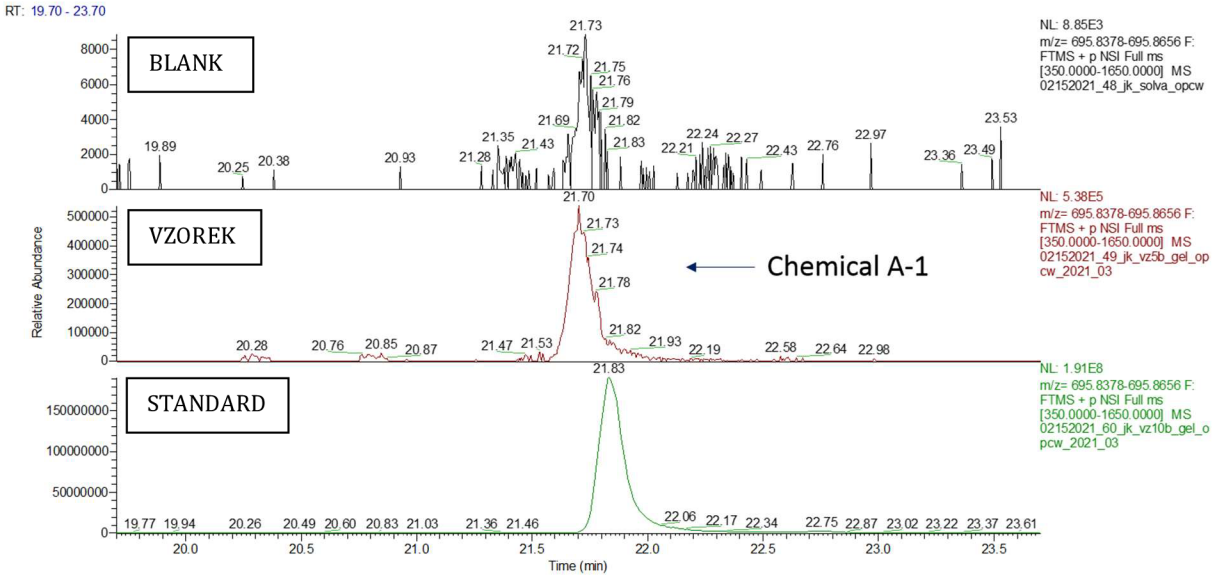
Fragment Matches

Value Type: Theo. Mass [Da]

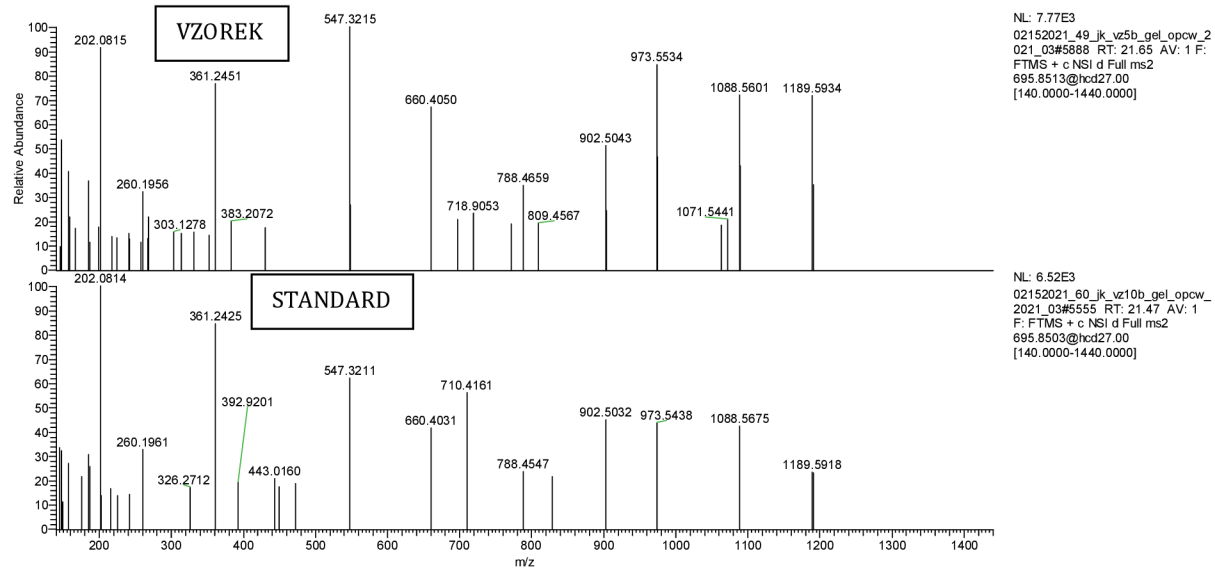
Ion Series | Neutral Losses | Precursor Ions | Internal Fragments

#1	b+	b2+	Seq.	y+	y2+	#2
1	100.07569	50.54148	V			8
2	157.09715	79.05222	G	797.46281	399.23504	7
3	270.18122	135.59425	L	740.44135	370.72431	6
4	367.23398	184.12063	P	627.35728	314.18228	5
5	480.31805	240.66266	I	530.30452	265.65590	4
6	594.36097	297.68412	N	417.22046	209.11387	3
7	722.41955	361.71341	Q	303.17753	152.09240	2
8			R	175.11895	88.06311	1

Tab. 10: Tabulka teoretických fragmentů peptidu VGLPINQR (T7) s vyznačením fragmentů reálně detekovaných během analýzy



Graf 7: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL01/16; V1 – fragment T6b, řetězec B



Graf 8: Fragmentační spektrum v iontové pasti pro vzorek BT20/PL01/16; V1 – fragment T6b, řetězec B

Označení	Sekvence AK	(M+H)+	(M+2H)2+	(M+3H)3+	(M4+H)
T6b	SNTDANQLWTLK	1390.6961	695.8517	464.2369	348.4295

Tab. 11: Proteospecifická sekvence peptidu po štěpení trypsinem pro fragment T6b, řetězec B, vzorek BT20/PL01/16; V1

Fragment Matches

Value Type: Delta Mass [ppm]

Ion Series | Neutral Losses | Precursor Ions | Internal Fragments

#1	b+	b2+	Seq.	y+	y2+	#2
1			S			12
2	+3.62		N			11
3	+7.03		T			10
4			D	+12.33		9
5			A	-7.05		8
6			N	+5.65		7
7			Q	+0.79		6
8			L	+4.38		5
9			W	+4.37		4
10			T	-1.59		3
11			L	+4.91		2
12			K	+3.50		1

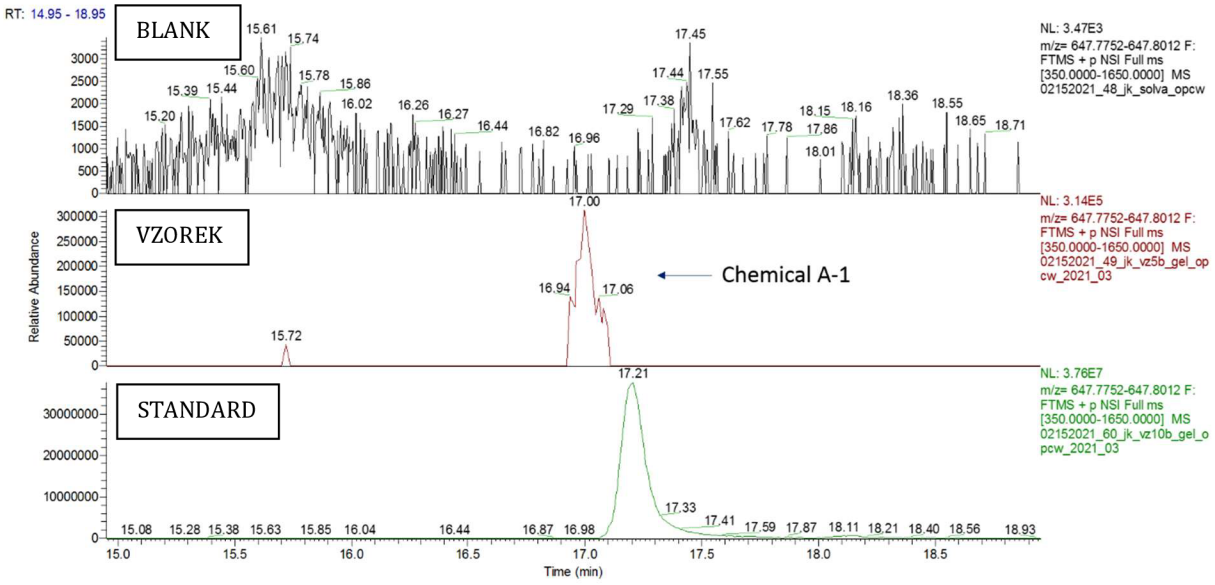
Fragment Matches

Value Type: Theo. Mass [Da]

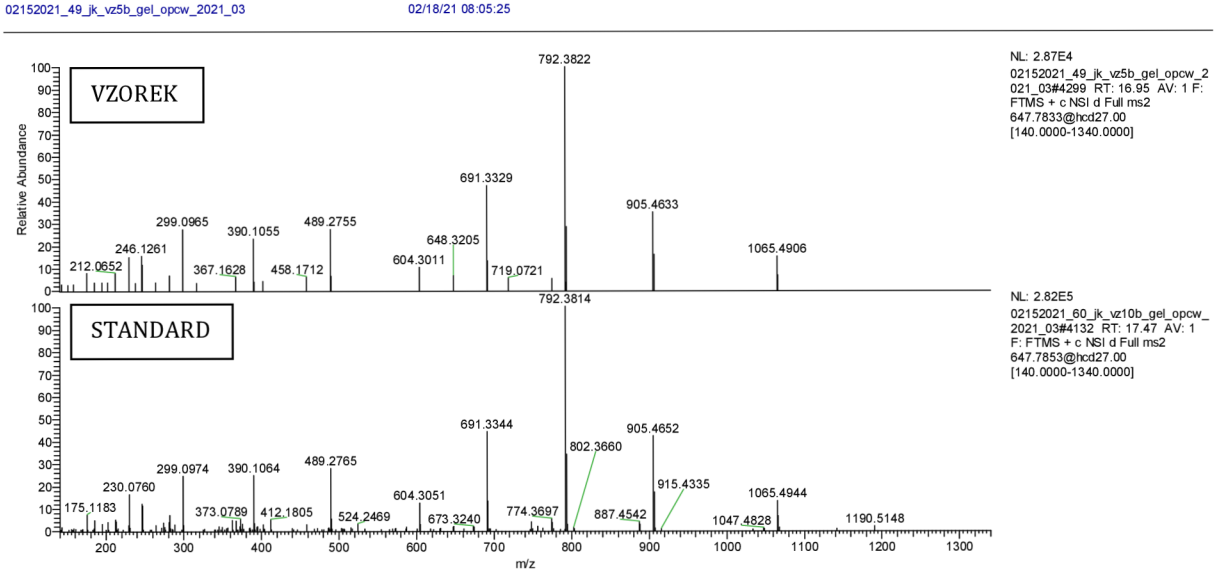
Ion Series | Neutral Losses | Precursor Ions | Internal Fragments

#1	b+	b2+	Seq.	y+	y2+	#2
1	88.03930	44.52329	S			12
2	202.08223	101.54475	N	1303.66409	652.33568	11
3	303.12991	152.06859	T	1189.62116	595.31422	10
4	418.15685	209.58207	D	1088.57348	544.79038	9
5	489.19397	245.10062	A	973.54654	487.27691	8
6	603.23689	302.12209	N	902.50943	451.75835	7
7	731.29547	366.15137	Q	788.46650	394.73689	6
8	844.37954	422.69341	L	660.40792	330.70760	5
9	1030.45885	515.73306	W	547.32386	274.16557	4
10	1131.50653	566.25690	T	361.24455	181.12591	3
11	1244.59059	622.79893	L	260.19687	130.60207	2
12			K	147.11280	74.06004	1

Tab. 12: Tabulka teoretických fragmentů peptidu SNTDANQLWTLK (T6b) s vyznačením fragmentů reálně detekovaných během analýzy



Graf 9: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL01/16; V1 – fragment T14b-CAM, řetězec B



Graf 10: Fragmentační spektrum v iontové pasti pro vzorek BT20/PL01/16; V1 – fragment T14b-CAM, řetězec B

Označení	Sekvence AK	(M+H)+	(M+2H)2+	(M+3H)3+	(M4+H)
T14b-CAM	DNCLTSDSNIR	2231.0952	1116.0512	744.3699	558.5293

Tab. 13: Proteospecifická sekvence peptidu po štěpení trypsinem pro fragment T14b-CAM, řetězec B, vzorek BT20/PL01/16; V1

Fragment Matches

Value Type: Delta Mass [ppm]

Ion Series | Neutral Losses | Precursor Ions | Internal Fragments

#1	b+	b2+	Seq.	y+	y2+	#2
1			D			11
2	+2.90		N			10
3	+5.88		C-Carba..	+8.20		9
4			L	+5.99		8
5			T	+3.06		7
6			S	+5.78		6
7			D	+6.23		5
8			S	+5.03		4
9			N	+6.00		3
10			I			2
11			R	-1.02		1

Fragment Matches

Value Type: Theo. Mass [Da]

Ion Series | Neutral Losses | Precursor Ions | Internal Fragments

#1	b+	b2+	Seq.	y+	y2+	#2
1	116.03422	58.52075	D			11
2	230.07715	115.54221	N	1179.54226	590.27477	10
3	390.10780	195.55754	C-Carba..	1065.49933	533.25331	9
4	503.19186	252.09957	L	905.46869	453.23798	8
5	604.23954	302.62341	T	792.38462	396.69595	7
6	691.27157	346.13942	S	691.33694	346.17211	6
7	806.29851	403.65289	D	604.30491	302.65610	5
8	893.33054	447.16891	S	489.27797	245.14262	4
9	1007.37346	504.19037	N	402.24594	201.62661	3
10	1120.45753	560.73240	I	288.20302	144.60515	2
11			R	175.11895	88.06311	1

Tab. 14: Tabulka teoretických fragmentů peptidu DNCLTSDSNIR (T14b-CAM) s vyznačením fragmentů reálně detekovaných během analýzy

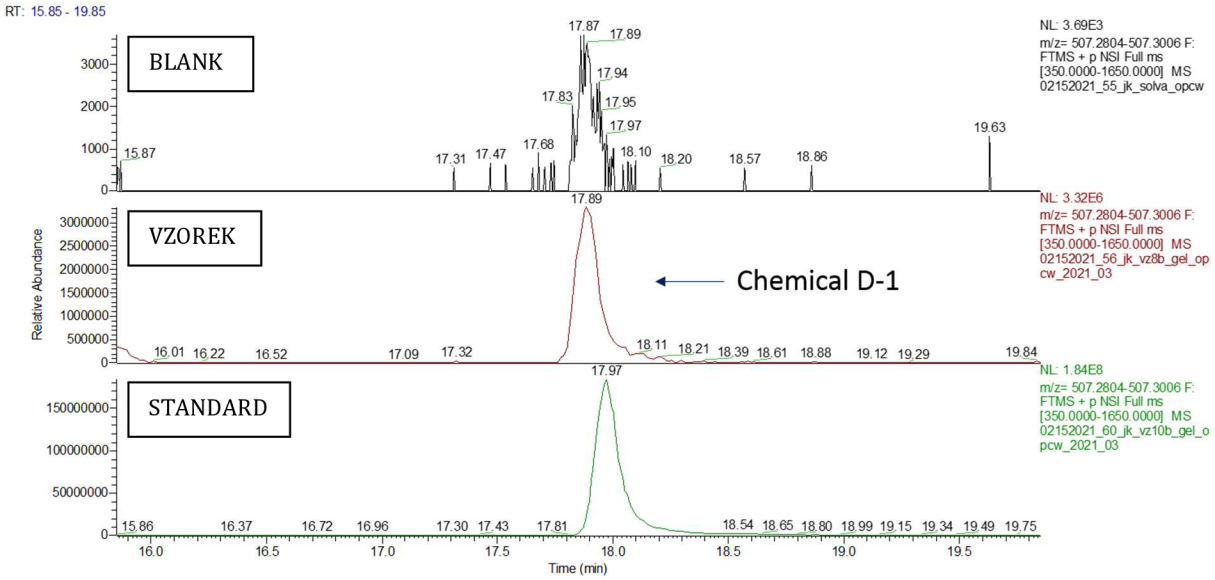
3.1.1.2. BT20/PL02/16

Ve vzorku BT20/PL02/16 nebyl nalezen ricin ani abrin.

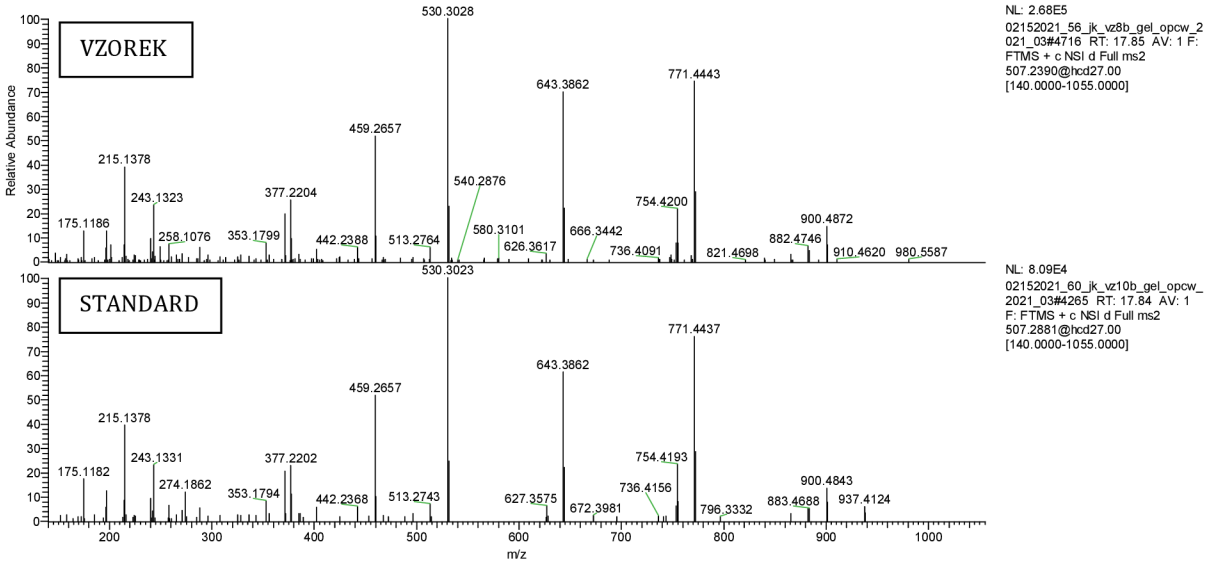
3.1.1.3. BT20/PL03/16

Ve vzorku BT20/PL03/16 nebyl nalezen ricin ani abrin.

3.1.1.4. BT20/PL04/16



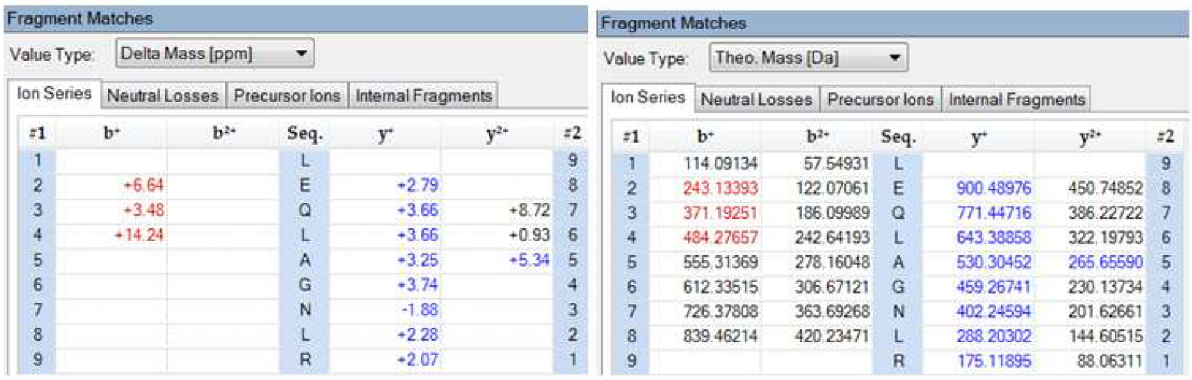
Graf 11: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL04/16; V2 – fragment T11, řetězec A



Graf 12: Fragmentační spektrum v iontové pasti pro vzorek BT20/PL04/16; V2 – fragment T11, řetězec A

Označení	Sekvence AK	(M+H)+	(M+2H)2+
T11	LEQLAGNLR	1013.5738	507.2905

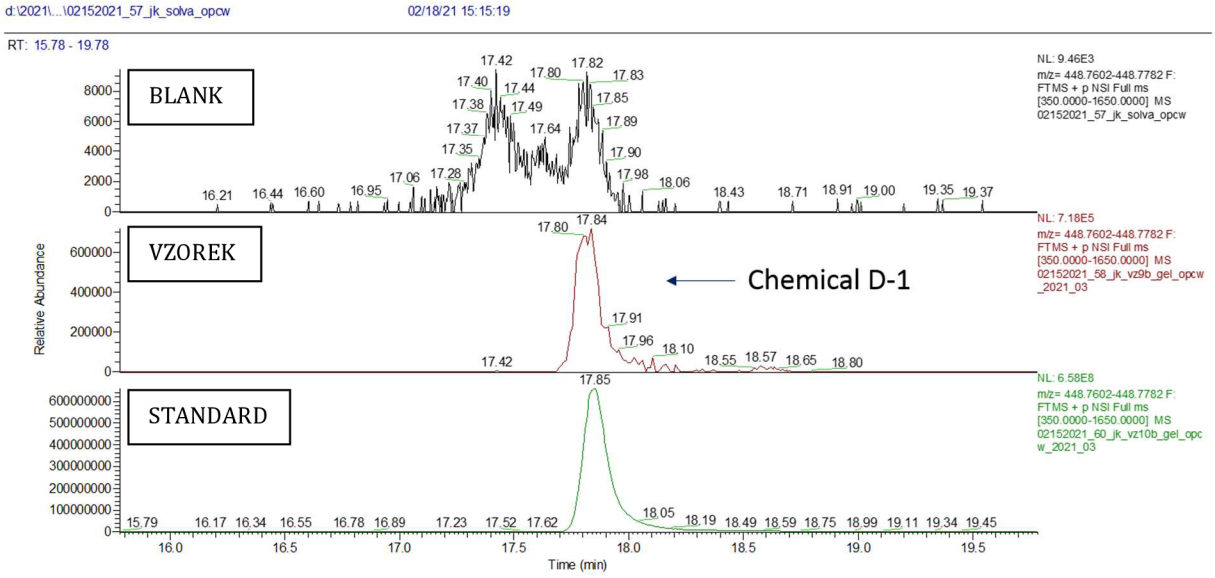
Tab. 15: Proteospecifická sekvence peptidu po štěpení trypsinem pro fragment T11, řetězec A, vzorek BT20/PL04/16; V2



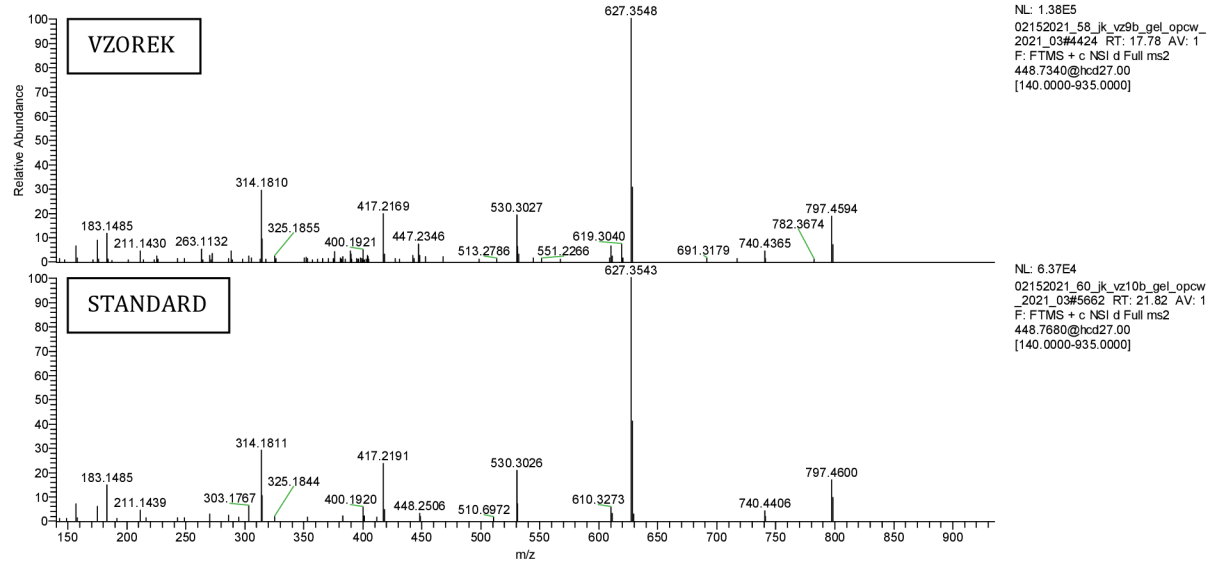
#1	b+	b2+	Seq.	y+	y2+	#2
1			L			9
2	+6.64		E	+2.79		8
3	+3.48		Q	+3.66	+8.72	7
4	+14.24		L	+3.66	+0.93	6
5			A	+3.25	+5.34	5
6			G	+3.74		4
7			N	-1.88		3
8			L	+2.28		2
9			R	+2.07		1

#1	b+	b2+	Seq.	y+	y2+	#2
1	114.09134	57.54931	L			9
2	243.13393	122.07061	E	900.48976	450.74852	8
3	371.19251	186.09989	Q	771.44716	386.22722	7
4	484.27657	242.64193	L	643.38858	322.19793	6
5	555.31369	278.16048	A	530.30452	265.65590	5
6	612.33515	306.67121	G	459.26741	230.13734	4
7	726.37808	363.69268	N	402.24594	201.62661	3
8	839.46214	420.23471	L	288.20302	144.60515	2
9			R	175.11895	88.06311	1

Tab. 16: Tabulka teoretických fragmentů peptidu LEQLAGNLR (T11) s vyznačením fragmentů reálně detekovaných během analýzy



Graf 13: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL04/16; V1 – fragment T7, řetězec A



Graf 14: Fragmentační spektrum v iontové pasti pro vzorek BT20/PL04/16; V1 – fragment T7, řetězec A

Označení	Sekvence AK		(M+H)+	(M+2H)2+
T7	VGLPINQR		896.5312	448.7692

Tab. 17: Proteospecifická sekvence peptidu po štěpení trypsinem pro fragment T7, řetězec A, vzorek BT20/PL04/16; V1

Fragment Matches

Value Type: Delta Mass [ppm]

Ion Series | Neutral Losses | Precursor Ions | Internal Fragments

#1	b+	b2+	Seq.	y+	y2+	#2
1			V			8
2	+2.83		G		+4.34	7
3	+4.21		L	+6.60	+7.43	6
4			P	+3.96	+3.98	5
5			I	+3.38		4
6			N	+8.48		3
7			Q	+6.76		2
8			R	+3.04		1

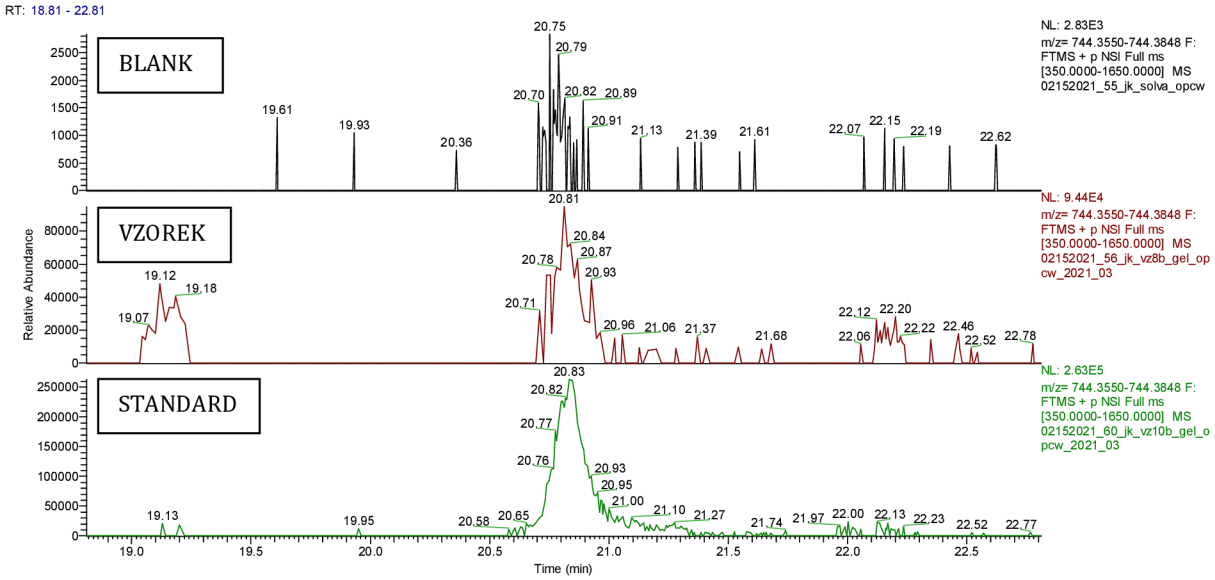
Fragment Matches

Value Type: Theo. Mass [Da]

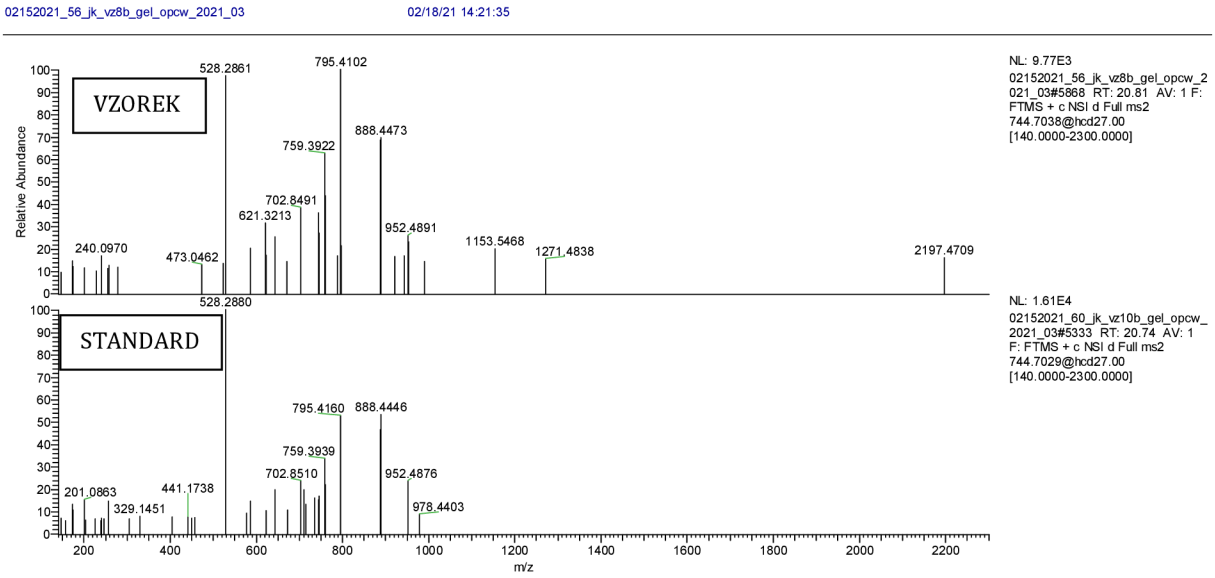
Ion Series | Neutral Losses | Precursor Ions | Internal Fragments

#1	b+	b2+	Seq.	y+	y2+	#2
1	100.07569	50.54148	V			8
2	157.09715	79.05222	G	797.46281	399.23504	7
3	270.18122	135.59425	L	740.44135	370.72431	6
4	367.23398	184.12063	P	627.35728	314.18228	5
5	480.31805	240.66266	I	530.30452	265.65590	4
6	594.36097	297.68412	N	417.22046	209.11387	3
7	722.41955	361.71341	Q	303.17753	152.09240	2
8			R	175.11895	88.06311	1

Tab. 18: Tabulka teoretických peptidů VGLPINQR (T7) s vyznačením fragmentů reálně detekovaných během analýzy



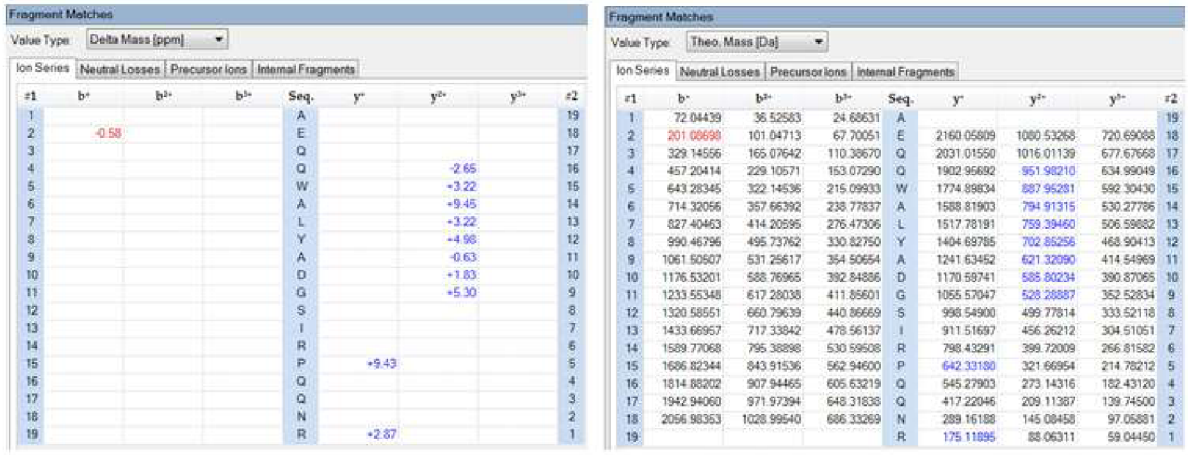
Graf 15: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL04/16; V2 – fragment T13b, řetězec B



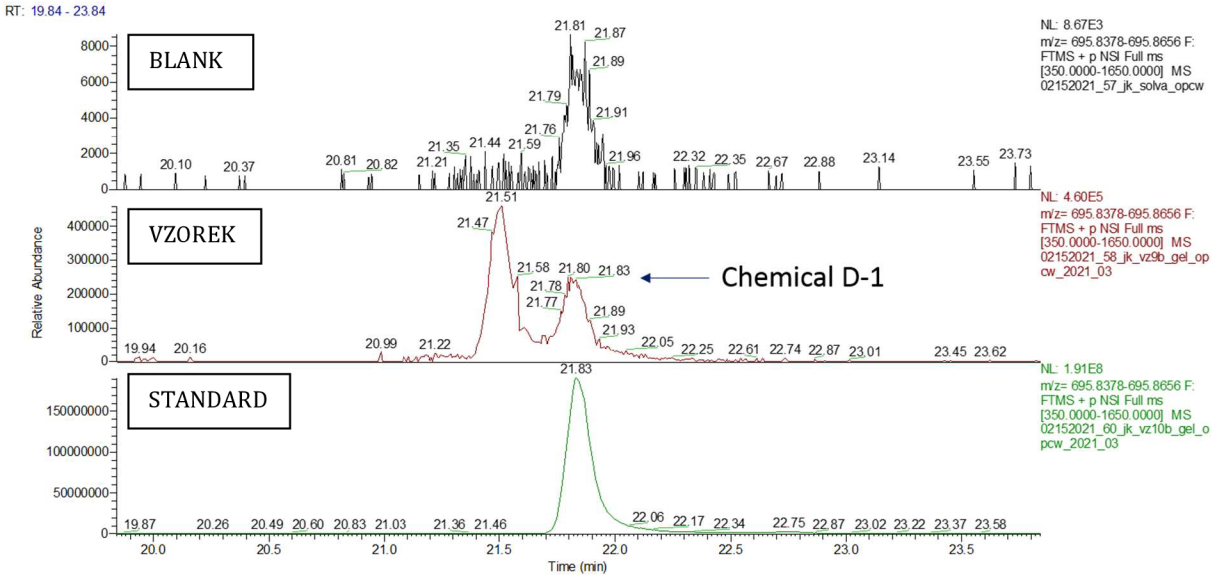
Graf 16: Fragmentační spektrum v iontové pasti pro vzorek BT20/PL04/16; V2 – fragment T13b, řetězec B

Označení	Sekvence AK	(M+H)+	(M+2H)2+	(M+3H)3+	(M4+H)
T13b	AEQQWALYADGSIRPQQNR	2231.0952	1116.0512	744.3699	558.5293

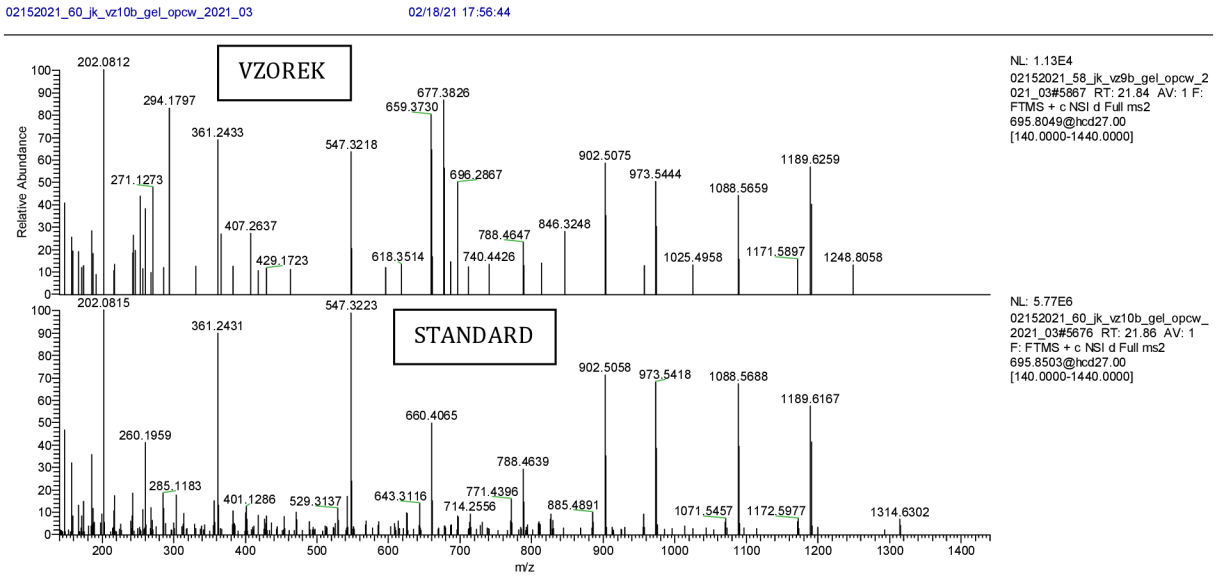
Tab. 19: Proteospecifická sekvence peptidu po štěpení trypsinem pro fragment T13b, řetězec A, vzorek BT20/PL04/16; V2



Tab. 20: Tabulka teoretických fragmentů peptidu AEQQWALYADGSIRPQQNR (T13b) s vyznačením fragmentů reálně detekovaných během analýzy



Graf 17: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL04/16; V1 – fragment T6b, řetězec B



Graf 18: Fragmentační spektrum v iontové pasti pro vzorek BT20/PL04/16; V1 – fragment T6b, řetězec B

Označení	Sekvence AK	(M+H)+	(M+2H)2+	(M+3H)3+	(M4+H)
T6b	SNTDANQLWTLK	1390.6961	695.8517	464.2369	348.4295

Tab. 21: Proteospecifická sekvence peptidu po štěpení trypsinem pro fragment T6b, řetězec B, vzorek BT20/PL04/16; V1

Fragment Matches

Value Type: Delta Mass [ppm]

Ion Series | Neutral Losses | Precursor Ions | Internal Fragments

#1	b+	b2+	Seq.	y+	y2+	#2
1			S			12
2	+4.91		N			11
3			T	-3.94		10
4	+24.07		D	+6.95		9
5			A	+2.17		8
6			N	+2.13		7
7			Q	+2.33		6
8			L	+29.52		5
9			W	+3.69		4
10			T	+3.48		3
11			L	+3.03		2
12			K	+2.34		1

Fragment Matches

Value Type: Theo. Mass [Da]

Ion Series | Neutral Losses | Precursor Ions | Internal Fragments

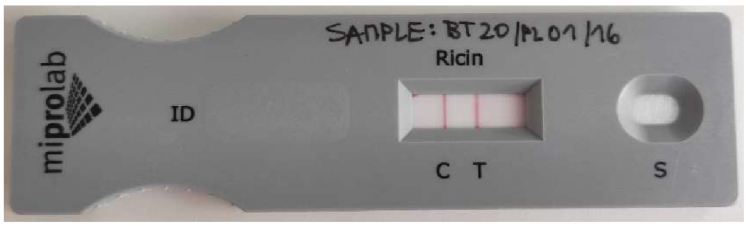
#1	b+	b2+	Seq.	y+	y2+	#2
1	88.03930	44.52329	S			12
2	202.08223	101.54475	N	1303.66409	652.33568	11
3	303.12991	152.06859	T	1189.62116	595.31422	10
4	418.15685	209.58207	D	1088.57348	544.79038	9
5	489.19397	245.10062	A	973.54654	487.27691	8
6	603.23689	302.12209	N	902.50943	451.75835	7
7	731.29547	366.15137	Q	788.46650	394.73689	6
8	844.37954	422.69341	L	660.40792	330.70760	5
9	1030.45885	515.73306	W	547.32386	274.16557	4
10	1131.50653	566.25690	T	361.24455	181.12591	3
11	1244.59059	622.79893	L	260.19687	130.60207	2
12			K	147.11280	74.06004	1

Tab. 22: Tabulka teoretických fragmentů peptidu SNTDANQLWTLK (T6b) s vyznačením fragmentů reálně detekovaných během analýzy

3.1.2. Kit pro zjištění přítomnosti ricinu

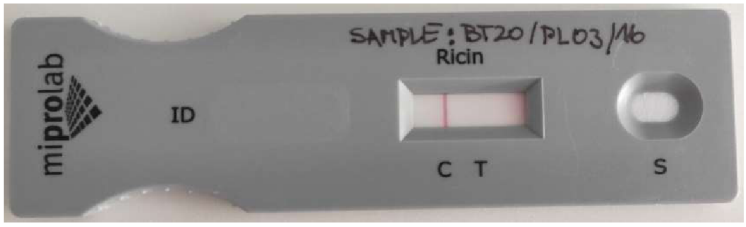
Tímto kitem byly otestovány všechny 4 vzorky BT20/PL01/16, BT20/PL02/16, BT20/PL03/16, BT20/PL04/16 včetně dvou standardů BT20/AS01/16 a BT20/AS02/16, kdy BT20/AS01/16 sloužil jako pozitivní kontrola a BT20/AS02/16 jako negativní kontrola.

Při testu bylo zjištěno, že vzorky BT20/PL01/16 a BT20/PL04/16 ricin obsahují, kdežto BT20/PL02/16 a BT20/PL01/16 nikoliv (Obr. 15-18). Ve standardu BT20/AS01/16 obsahující ricin byla přítomnost ricinu potvrzena (Obr. 19) a ve standardu BT20/AS02/16 obsahující abrin přítomnost ricinu potvrzena nebyla (Obr. 20).

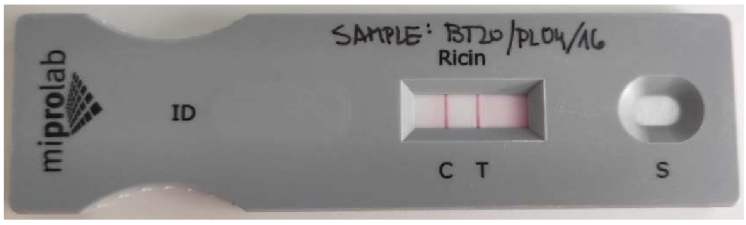


Obr. 15: pozitivní vzorek BT20/PL01/16

Obr. 16: negativní vzorek BT20/PL02/16



Obr. 17: negativní vzorek BT20/PL03/16



Obr. 18: pozitivní vzorek BT20/PL04/16

Obr. 19: ST20/AS01/16 obsahující ricin

Obr. 20: ST20/AS02/16 obsahující abrin

3.2. Saxitoxin

3.2.1. LC-FLD

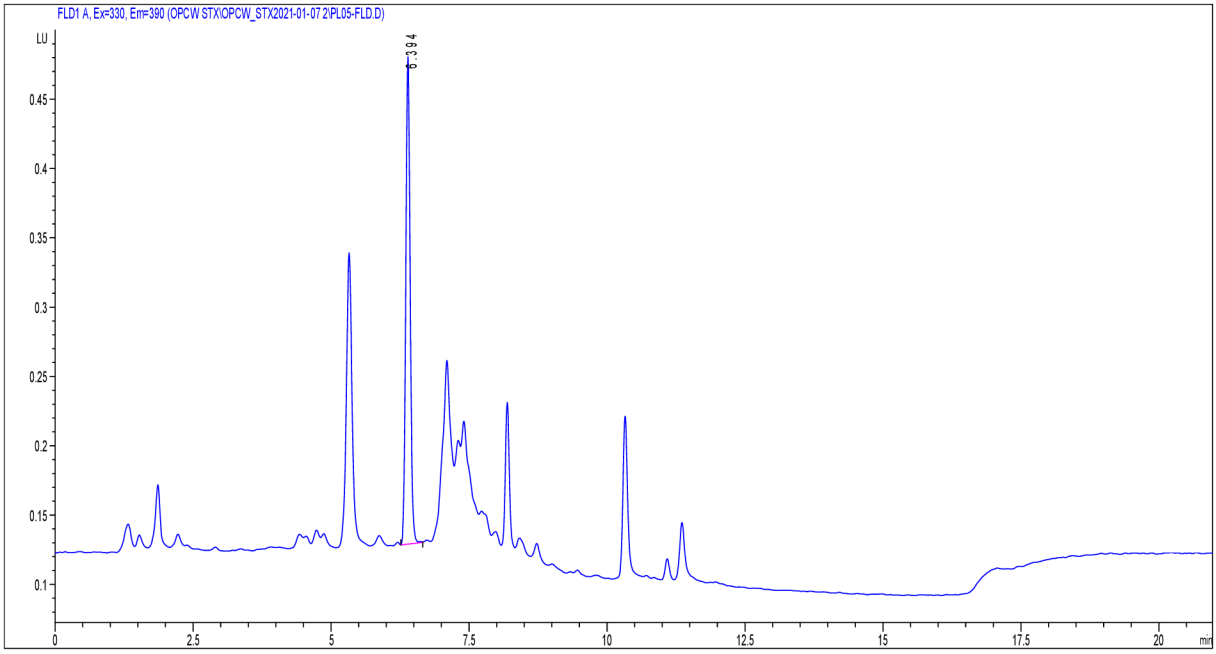
Bylo provedeno zpracování všech vzorků BT20/PL05/16, BT20/PL06/16, BT20/PL07/16 a BT20/PL08/16, ve kterých byl předpokládán obsah STX. Díky vytvoření kalibrační křivky a zjištění, že k analýze STX dochází v čase 6,4 sekundy, společně s otestováním standardu (plazma s STX, koncentrace 0,5 µg/ml) a blanku (čistá plazma bez STX), je možné zjistit, které vzorky STX obsahují či nikoliv. Po provedení LC-FLD bylo zjištěno, že vzorek BT20/PL06/16 (Graf 20) je STX prostý. V ostatních vzorcích

byla nalezena přítomnost STX, jak je znázorněno v grafech (Graf 19, Graf 21, Graf 22) a tabulce (Tab. 23) níže. Při analýze byla sledována pouze přítomnost či nepřítomnost toxinů ve vzorcích, nikoli jeho množství.

Vzorek	Čas analýzy STX [sekundy]	Plocha pod píkem
BT20/PL05/16	6,394	2,000
BT20/PL06/16	STX nebyl nalezen	STX nebyl nalezen
BT20/PL07/16	6,392	6,392
BT20/PL08/16	6,408	6,408
Standard	6,404	7,600
Blank - čistá plazma	-	-

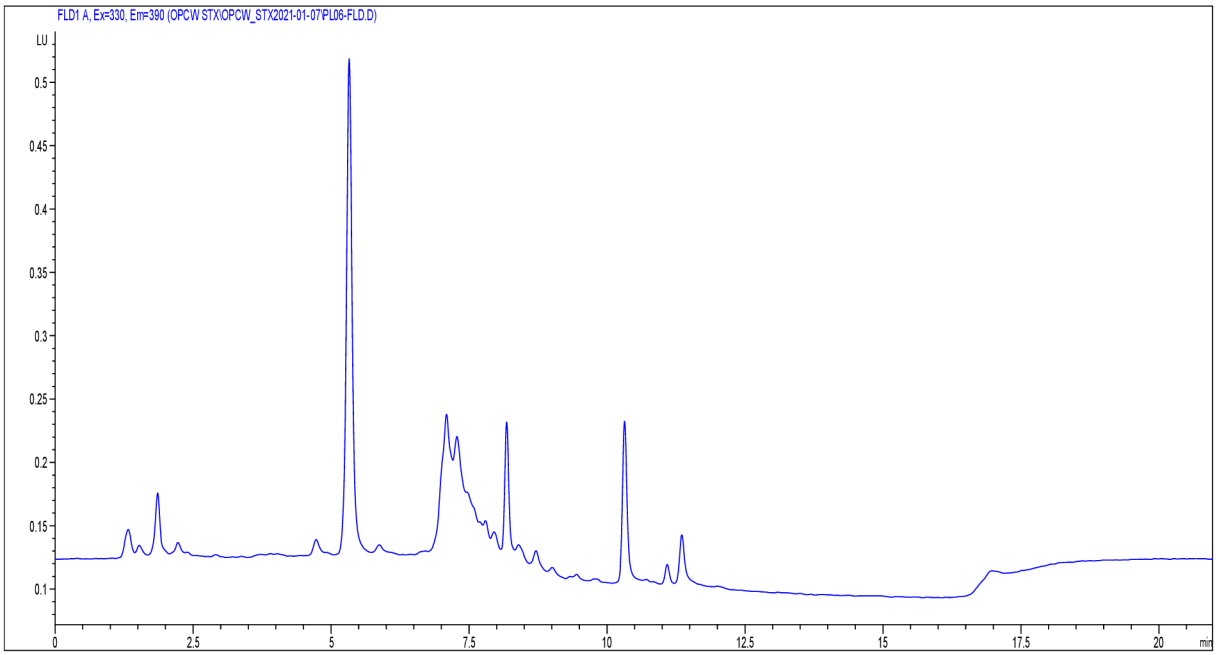
Tab. 23: srovnání času analýzy STX a plochy pod píkem

3.2.1.1. BT20/PL05/16



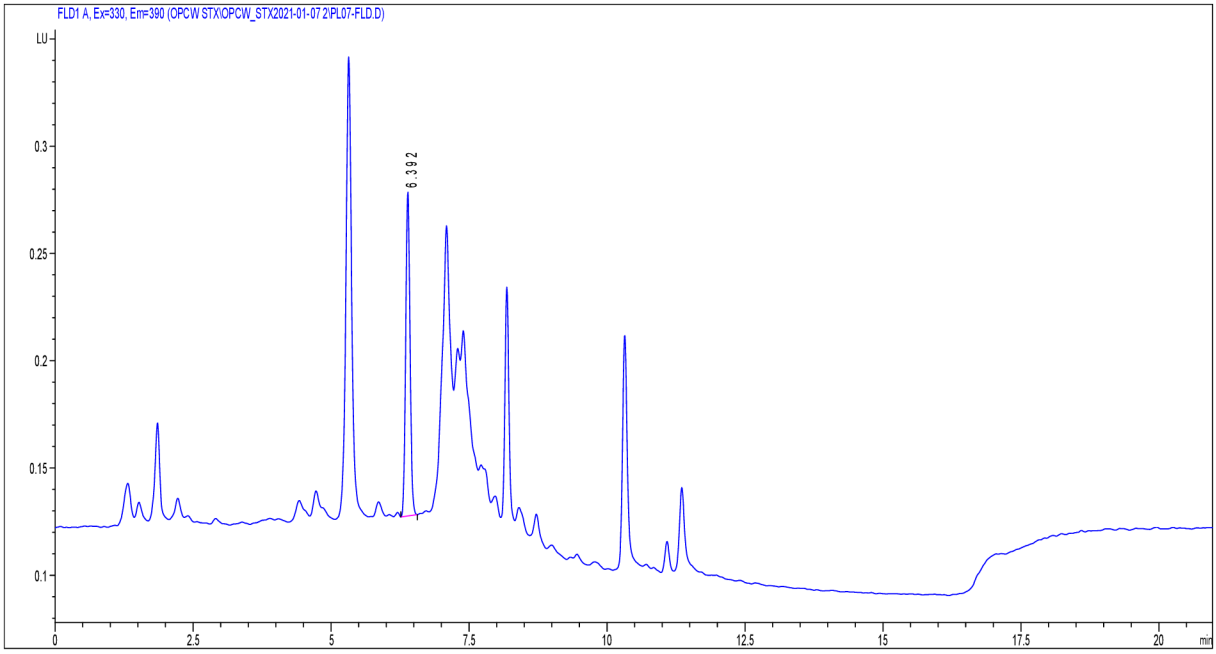
Graf 19: LC-FLD chromatogram pro vzorek BT20/PL05/16

3.2.1.2. BT20/PL06/16



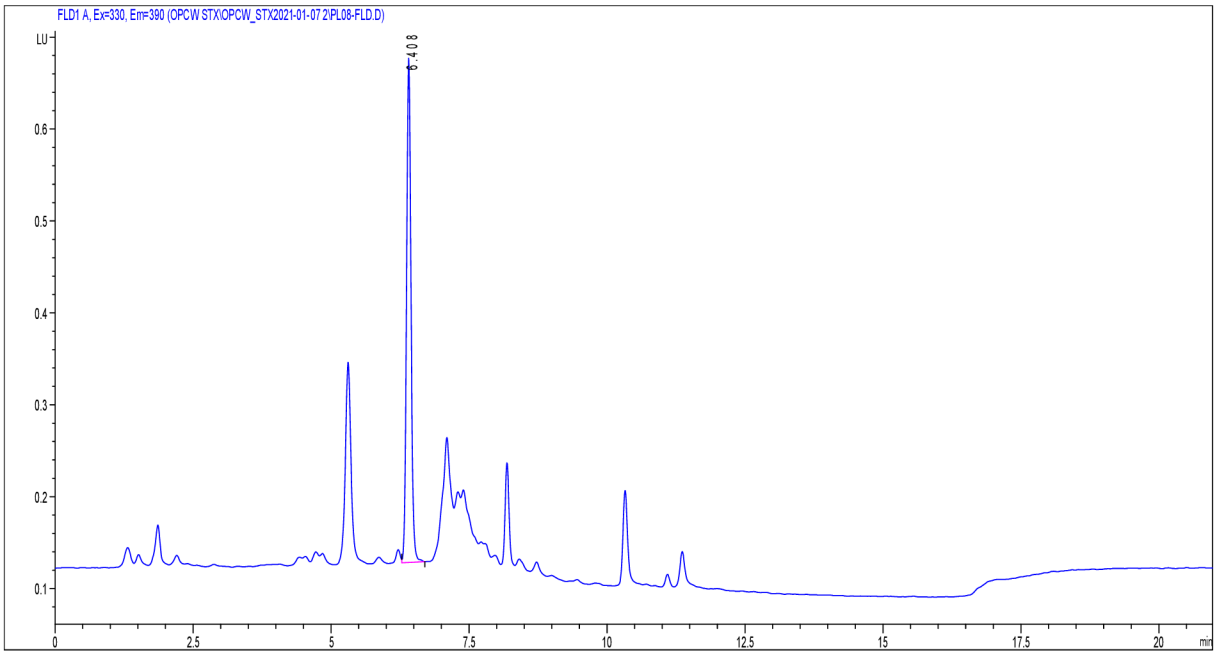
Graf 20: LC-FLD chromatogram pro vzorek BT20/PL06/16

3.2.1.3. BT20/PL07/16



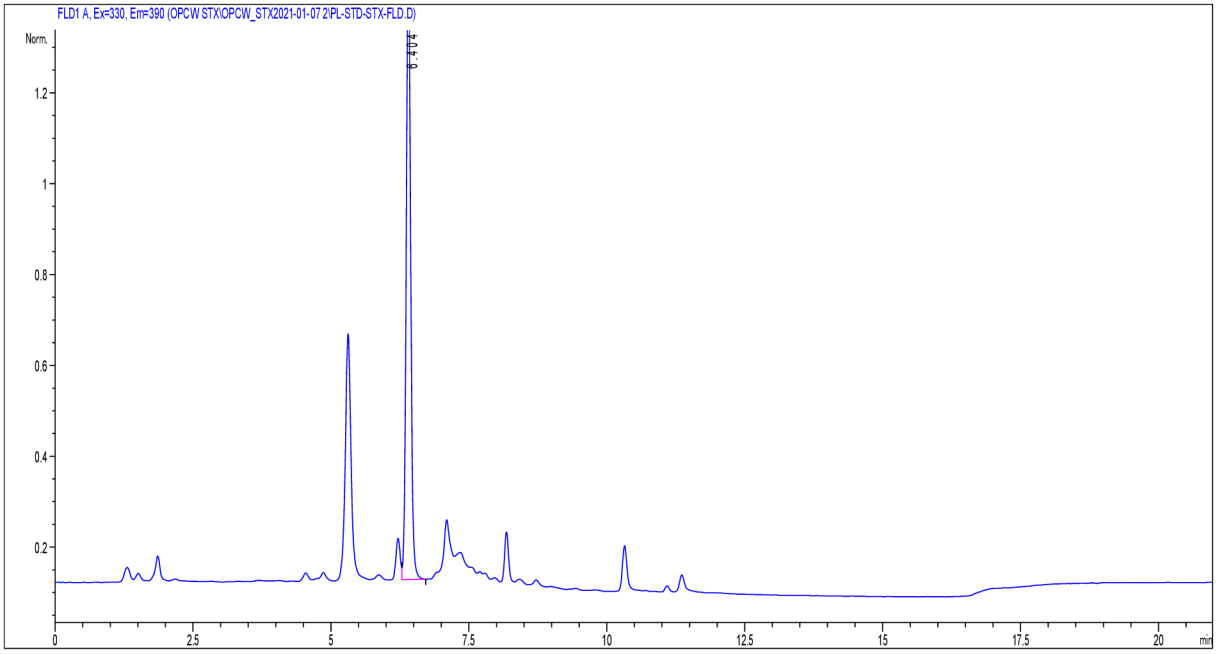
Graf 21: LC-FLD chromatogram pro vzorek BT20/PL07/16

3.2.1.4. BT20/PL08/16

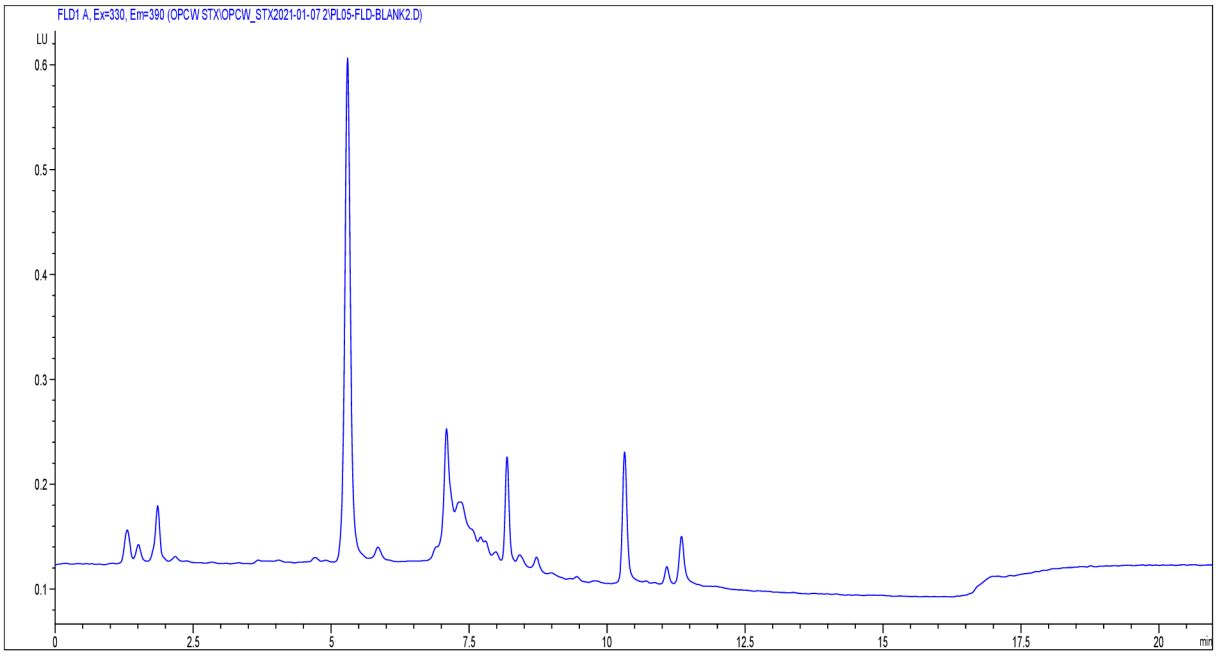


Graf 22: LC-FLD chromatogram pro vzorek BT20/PL08/16

3.2.1.5. Standard + blank



Graf 23: LC-FLD chromatogram pro vzorek standard STX; 0,5 µg/ml

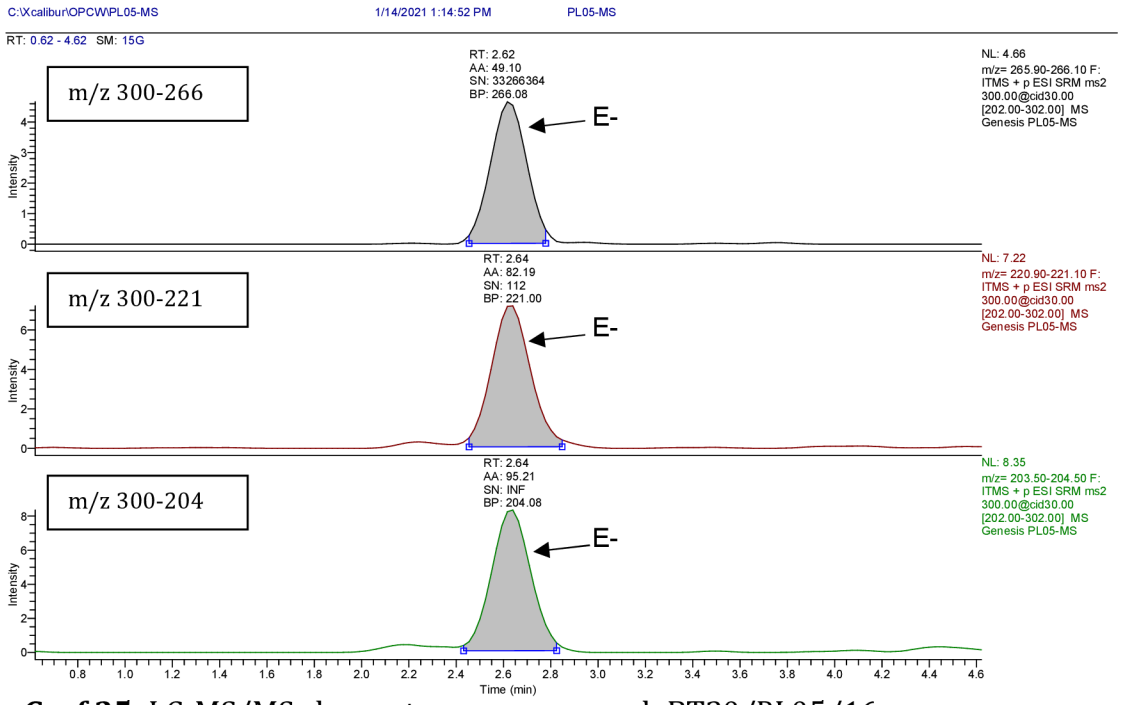


Graf 24: LC-FLD chromatogram čisté plazmy bez STX

3.2.2. LC-MS/MS

Bylo provedeno zpracování vzorků BT20/PL05/16, BT20/PL07/16 a BT20/PL08/16, ve kterých byl předpokládán obsah STX. Vzorek BT20/PL06/16 po předchozím zjištění, že neobsahuje STX, nebyl zpracováván na LC-MS/MS. Opět byl společně se vzorky vyhodnocen blank, jež představovala čistá plazma, a byl také vyhodnocen standard, jež byla plazma obsahující STX o koncentraci 0,5 µg/ml. Hmotnostní spektra z provedené metody tzv. monitorování vybraných reakcí (SRM, z angl. Selected Reaction Monitoring) jednotlivých vzorků, jsou znázorněna níže (Graf 25-29). Při analýze byly sledovány tři iontové přechody, kdy z prekurzorového iontu m/z 300 vznikly další ionty m/z 266, m/z 221 a m/z 204. V tabulkách (Tab. 24-26) níže jsou shrnuty výsledky SRM testovaných vzorků vztažené ke standardu STX.

3.2.2.1. BT20/PL05/16



Graf 25: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL05/16

Ionty/ přechody	Vzorek		Standard		Tolerance**	Výsledky
	Plocha píku	[%]*	Plocha píku	[%]*		
m/z 300 → 266	49.10	51.57	423	55.37	± 11.07	OK
m/z 300 → 221	82.19	86.32	649	84.95	± 16.99	OK
m/z 300 → 204	95.21	100	764	100	N/A	N/A

* procentuální intenzita ve srovnání s nejhojnějším iontem

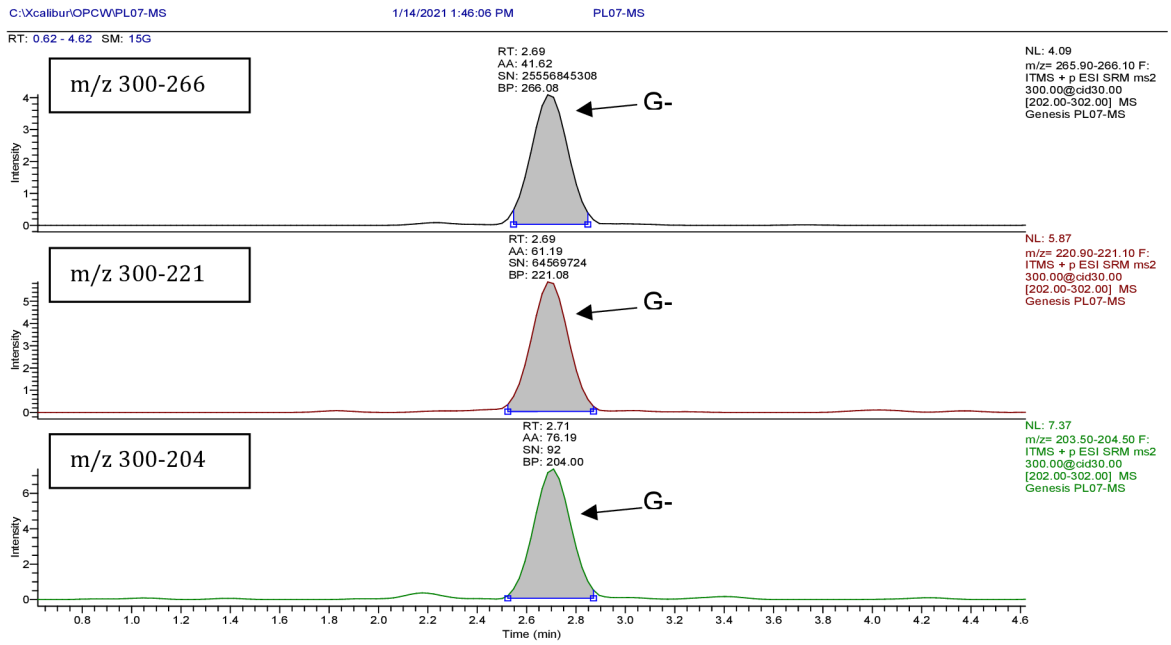
** v porovnání s relativní intenzitou iontů standardu: >50%: ±20%; s>20% až 50%: ±25%; >10% až 20%: ±30%; ≤10%: ±50%

Tab. 24: Iontové přechody, vzorek BT20/PL05/16

3.2.2.2. BT20/PL06/16

STX v tomto vzorku nebyl nalezen.

3.2.2.3. BT20/PL07/16



Graf 26: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL07/16

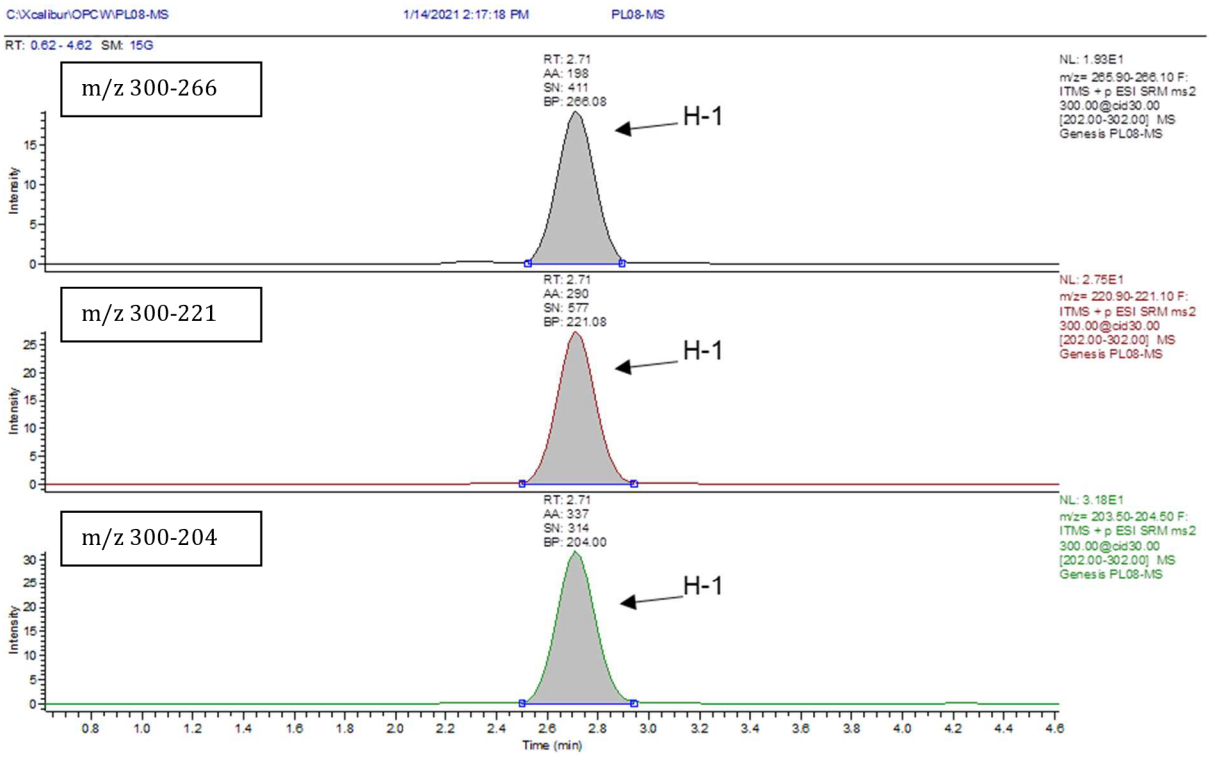
Ionty/ přechody	Vzorek		Standard		Tolerance**	Výsledky
	Plocha píku	[%]*	Plocha píku	[%]*		
m/z 300 → 266	41.62	54.63	423	55.37	± 11.07	OK
m/z 300 → 221	61.19	80.31	649	84.95	± 16.99	OK
m/z 300 → 204	76.19	100	764	100	N/A	N/A

* procentuální intenzita ve srovnání s nejhojnějším iontem

** v porovnání s relativní intenzitou iontů standardu: >50%: ±20%; >20% až 50%: ±25%; >10% až 20%: ±30%; ≤10%: ±50%

Tab. 25: Iontové přechody, vzorek BT20/PL07/16

3.2.2.4. BT20/PL08/16



Graf 27: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL08/16

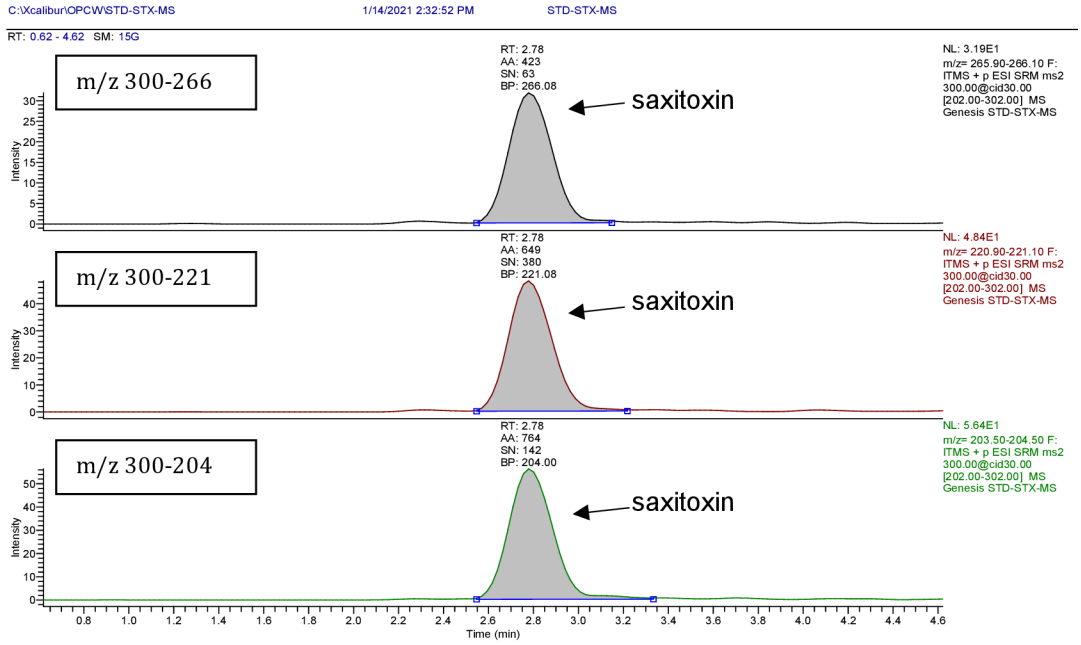
Ionty/ přechody	Vzorek		Standard		Tolerance**	Výsledky
	Plocha píku	[%]*	Plocha píku	[%]*		
m/z 300 → 266	198.00	58.57	423	55.37	± 11.07	OK
m/z 300 → 221	290.00	86.05	649	84.95	± 16.99	OK
m/z 300 → 204	337.00	100	764	100	N/A	N/A

* procentuální intenzita ve srovnání s nejhojnějším iontem

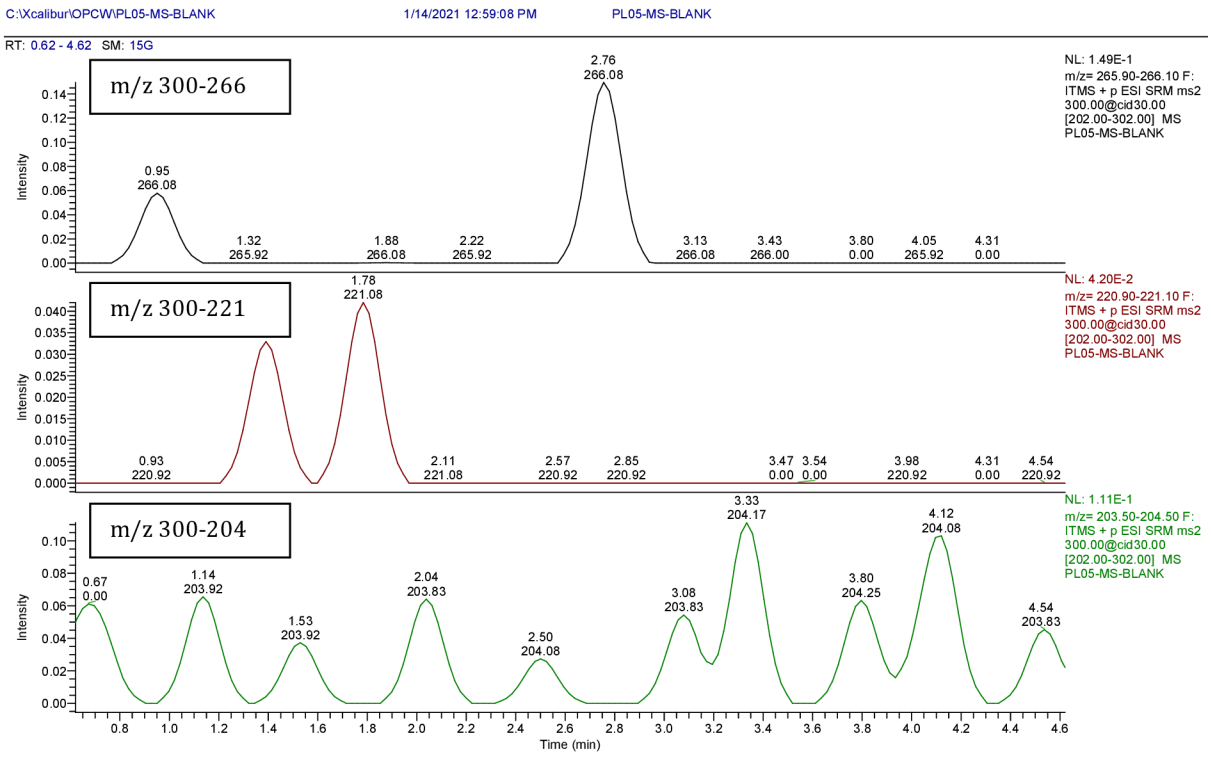
** v porovnání s relativní intenzitou iontů standardu: >50%: ±20%; >20% až 50%: ±25%; >10% až 20%: ±30%; ≤10%: ±50%

Tab. 26: Iontové přechody, vzorek BT20/PL08/16

3.2.2.5. Standard + blank



Graf 28: LC-MS/MS chromatogram pro standard



Graf 29: LC-MS/MS chromatogram pro blank

3.3. Seznam toxinů přidaných ke vzorkům

OPCW po odeslání výsledků cvičení zašle účastníkům seznam chemikálií a toxinů, kterými byly vzorky obohaceny. V tomto případě se jednalo o obohacení lidské plazmy ricinem, abrinem či saxitoxinem. Seznam vždy obsahuje název chemikálie či toxinu a také jeho koncentrace v daném vzorku viz Tab. 27.

Vzorek	Přidané chemikálie/toxin	Koncentrace
BT20/PL01/16	ricin	16 µg/ml
BT20/PL01/16	ricin	1 µg/ml
BT20/PL01/16	-	
BT20/PL01/16	ricin	2 µg/ml
BT20/PL01/16	saxitoxin	41 ng/ml
BT20/PL01/16	-	
BT20/PL01/16	saxitoxin	20,5 ng/ml
BT20/PL01/16	saxitoxin	82 ng/ml

Tab. 27: Použité přidané chemikálie/toxiny ve vzorcích

Po dokončení analýz vzorků a srovnání se seznamem přidaných toxinů do vzorků obdrženým následně po vyhodnocení od OPCW bylo provedeno porovnání úspěšnosti jednotlivých analýz (Tab. 28).

Vzorek	Obsažený toxin a jeho koncentrace	Nalezení vzorku metodou?		
		Kit na detekci ricinu	LC-MS/MS	LC-FLD
BT20/PL01/16	16 µg/ml - ricin	✓	✓	——
BT20/PL02/16	1 µg/ml - ricin	×	×	——
BT20/PL03/16	-	×	×	——
BT20/PL04/16	2 µg/ml - ricin	✓	✓	——
BT20/PL05/16	41 ng/ml - STX	——	✓	✓
BT20/PL06/16	-	——	×	×
BT20/PL07/16	20,5 ng/ml - STX	——	✓	✓
BT20/PL08/16	82 ng/ml - STX	——	✓	✓

Vysvětlivky: toxin nalezen: ✓; toxin nenalezen: ×; metoda nepoužita pro analýzu ——

Tab. 28: Vyhodnocení vzorků a použitých metod

Tři vzorky ze čtyř obsahovaly ricin přesně tak, jak bylo popsáno ve scénáři testování. Při analýze pomocí LC-MS/MS došlo k nalezení ricinu ve dvou vzorcích. V jednom vzorku nedošlo k nalezení ricinu, což může být způsobeno jeho nejnižší koncentrací ze všech vzorků. Nenalezení může být dále zapříčiněno chybou při zpracování vzorku či při samotné analýze. Zároveň také správně nedošlo k nalezení ricinu ve vzorku, který představoval blank. Abrin nebyl nalezen ani v jednom vzorku, což odpovídá seznamu přidaných toxinů.

Analýza pomocí kitu na přítomnost ricinu poskytla stejný výsledek jako předchozí analýza pomocí LC-MS/MS. V jednom vzorku, jež obsahoval ricin v nejnižší koncentraci, nebyl tento toxin nalezen. Tento fakt může být velmi pravděpodobně opět způsoben velmi nízkou koncentrací toxinu, což se dle výrobce kitu může stát (Miprolab, 2021).

Analýza STX potvrdila jeho přítomnost ve třech vzorcích ze čtyř, což přesně odpovídá skutečnosti přidaných toxinů.

Žádná obsažená koncentrace toxinů v analyzovaných vzorcích by dle odborné literatury neměla zapříčinit smrt člověka, i když se letální koncentrace u různých autorů liší. Pro ricin nejnižší LD50 nastává při inhalaci, kdy se tato hodnota liší o 7 μg/kg váhy průměrného člověka. U STX je určení LD50 velmi obtížné, protože detekce akumulovaných PST v organismech, jež jsou následně pozřeny člověkem, je téměř nemožná.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce byla věnována identifikaci toxinů v lidské plazmě v rámci mezinárodního cvičení BioToxin pořádaným Organizací pro zákaz chemických zbraní (OPCW). Testování bylo uvedeno fiktivním scénářem, v němž byly popsány příznaky nemocí u lidí, od kterých byly získány vzorky plazmy. Cílem práce bylo nalézt toxiny v obdržených vzorcích lidské plazmy. Vzorky plazmy se dělily do dvou skupin, kdy ve skupině prvních 4 vzorků byl hledán ricin a abrin, a v druhé skupině dalších 4 vzorků byl hledán saxitoxin. Každá sada vzorků obsahovala také blank čili čistou lidskou plazmu bez obsahu toxinu. Pro pozitivní porovnání byly společně se vzorky obdrženy také 2 standardy (ricin, abrin).

Hledané toxiny jsou nebezpečné tím, že jsou po proniknutí do organismu odpovědny za řadu reakcí. Specificky se váží na buněčné membrány a způsobují nevolnost, edémy, kóma či mohou zapříčinit smrt exponovaného jedince.

Při analýze na LC-MS/MS byla zjištěna přítomnost ricinu ve dvou odlišných vzorcích. Ve zbylých dvou vzorcích ricin nebyl prokázán. Dva pozitivní vzorky s obsahem ricinu byly zjištěny i při použití kitu na zjištění přítomnosti ricinu. V porovnání s výsledky, jež byly obdrženy od OPCW po ukončení testování, bylo zjištěno, že ricin byl obsažen celkem ve 3 vzorcích. Odlišnost zjištěných výsledků od zaslaných výsledků může být způsobena nejnižší koncentrací toxinu ve vzorku, jež ricin obsahoval, který však nebyl nalezen. Nenalezení může být dále zapříčiněno chybou při zpracování vzorku či při samotné analýze. Abrin správně nebyl zjištěn ani v jednom ze všech 4 testovaných vzorků.

Ve druhé skupině vzorků, která byla vyhrazena pro zjištění přítomnosti saxitoxinu, byla metodou LC-FLD a LC-MS/MS správně zjištěna přítomnost ve 3 vzorcích ze 4.

Jak již bylo řečeno, analyzované toxiny mohou způsobit závažné zdravotní problémy, proto jsou cvičení BioToxin velmi vhodná a účastnící se laboratoř tak dostane jedinečnou příležitost zkusit si práci s jedovatými toxiny. Laboratoř tak dostává možnost získat odborné znalosti v oblasti analýzy vzorků toxinů, jež jsou v tomto případě relevantní při zneužití jako chemické zbraně.

LITERATURA

1. **Agilent. 1998.** Basics of LC/MS. [online]. [cit. 13. 02. 2021]. Dostupné z: https://www.agilent.com/cs/library/support/documents/a05296.pdf

2. **Bradberry, S.M., Dickers, K.J., Rice, P., Griffiths, G.D., Vale, J.A., 2003.** Ricin poisoning. Toxicol. Rev. 22, 65–70. https://doi.org/10.2165/00139709-200322010-00007

3. **Britannica. 2020.** Mass Spectrometry [online]. [cit. 13. 12. 2020]. Dostupné z: https://www.britannica.com/science/mass-spectrometry

4. **Burrows, W.D., Renner, S.E., 1999.** Biological warfare agents as threats to potable water. Environ. Health Perspect. 107, 975–984. https://doi.org/10.1289/ehp.99107975

5. **Casero, M.C., Ballot, A., Agha, R., Quesada, A., Cirés, S., 2014.** Characterization of saxitoxin production and release and phylogeny of sxt genes in paralytic shellfish poisoning toxin-producing Aphanizomenon gracile. Harmful Algae 37, 28–37. https://doi.org/10.1016/j.hal.2014.05.006

6. **Certara. 2020.** Understanding LC/MS/MS [online]. [cit. 12. 12. 2020]. Dostupné z: https://www.certara.com/knowledge-base/understanding-lcmsms/

7. **Daneš, L., 2003.** Bioterorismus. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0693-3

8. **De Mejía, E.G., Prisecaru, V.I., 2005.** Lectins as bioactive plant proteins: A potential in cancer treatment. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 45, 425–445. https://doi.org/10.1080/10408390591034445

9. **DeNovix. 2021.** Co je UV-Vis spektrofotometr? [online]. [cit. 22. 07. 2020]. Dostupné z:https://www.denovix.com/blog/what-is-a-uv-vis-spectrophoto meter

10. **Dickers, K.J., Bradberry, S.M., Rice, P., Griffiths, G.D., Vale, J.A., 2003.** Abrin poisoning. Toxicol. Rev. 22, 137–142. https://doi.org/10.2165/00139709-200322030-00002

11. **Doan, L.G., 2004.** Ricin: Mechanism of toxicity, clinical manifestations, and vaccine development. A review. J. Toxicol. - Clin. Toxicol. 42, 201–208. https://doi.org/10.1081/CLT-120030945

12. **Domon, B., Aebersold, R., 2006.** Mass spectrometry and protein analysis. Science 312(5771): 212-217. https://doi.org/10.1126/science.1124619

13. **Fernando, C., 2001.** Poisoning due to Abrus precatorius (jequirity bean). Anaesthesia 56, 1178–1180. https://doi.org/10.1046/j.1365-2044.2001.02316.x

14. **Ferraz, A.C., Angelucci, M.E.M., Da Costa, M.L., Batista, I.R., De Oliveira, B.H., Da Cunha, C., 1999.** Pharmacological evaluation of ricinine, a central Nervous system stimulant isolated from Ricinus communis. Pharmacol. Biochem. Behav. 63, 367–375. https://doi.org/10.1016/S0091-3057(99)00007-6

15. **Franke, H., Scholl, R., Aigner, A., 2019.** Ricin and Ricinus communis in pharmacology and toxikology-from ancient use and „Papyrus Ebers“ to modern perspective and „poisonous plant of the year 2018“. Naunyn-Schmiedeberg´s Arch. Pharmacol. 392, 1181-1208. https://doi.org/10.1007/s00210-019-01691-6

16. **Gad, S.E., 2014.** Saxitoxin. Encycl. Toxicol. Third Ed. 3, 218–220. https://doi.org/10.1016 /B978-0-12-386454-3.00925-8

17. **Göpfertová, D., Pazdiora, P., 2003.** Epidemiologie infekčních nemocí: učebnice pro lékařské fakulty. 1. vydání. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0452-3

18. **Hartmanová, M., 2001.** Možnosti dezinfekce při zneužití biologických agens. Regionálny úrad veřejného zdravotnictva Banská Bystrica [online]. [cit. 23. 11. 2020]. Dostupné z: http://www.vzbb.sk/biozbrane/sk/clanky/moznosti_ dezinfekce. php

19. **Hashim, H.O., 2018.** Chromatography and HPLC principles Chromatography and HPLC principles By: Dr Hayder Obayes Hashim Chromatography : https://doi.org/10.13140/RG.2.2.33635.25126

20. **Holčapek, M., Jirásko, R., Lísa, M., 2012.** Recent developments in liquid chromatography-mass spectrometry and related techniques. J. Chromatogr. A 1259, 3–15. https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.08.072

21. **Holý, O., Chmelář, D., 2015.** Biologické zbraně hromadného ničení. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/313400361_Biologicke_zbrane_hromadneho_niceni

22. **HPLC, 2021.** [online]. [cit. 13. 02. 2021]. Dostupné z: http://www.hplc.cz

23. **HPST, 2021.** Spotřební materiál a laboratorní vybavení. [online]. [cit. 13. 02. 2021]. Dostupné z: https://www.labicom.cz/produkty/spotrebni-material/kapalinova-chromatogr-prislusenstvi/hplcuhplc-kolony-predkolonyfiltry/predkolony- filtry

24. **Hrdina, V., Hrdina, R., Jahodář, L., Martinec, Z., Měrka, V., 2004.** Přírodní toxiny a jedy. Praha: Galén. ISBN 80-7262-256-0

25. **Chemyx, 2021.** Basic Principles of LC, HPLC, MS, & MS. [online]. [cit. 13. 02. 2021]. Dostupné z: https://www.chemyx.com/support/knowledge-base/applications/basic-principles-hplc-ms-lc-ms/

26. **Jandera, P., 2011.** HILIC Chromatografie: Perspektivní technika separace polárních látek na polárních stacionárních fázích ve vodně-organických mobilních fázích. Dostupné z: http://www.chemagazin.cz/userdata/chemagazin_2010/file/CHEMAGAZIN_XXI_2_cl1.pdf

27. **Johnson, R.C., Zhou, Y., Jain, R., Lemire, S.W., Fox, S., Sabourin, P., Barr, J.R., 2009.** Quantification of l-abrine in human and rat urine: A biomarker for the toxin abrin. J. Anal. Toxicol. 33, 77–84. https://doi.org/10.1093/jat/33.2.77

28. **Klouda, P., 2003.** Moderní analytické metody. Ostrava: Pavel Klouda. ISBN 80-86369-07-2

29. **Knauer. 2020.** [online]. [cit. 15. 11. 2020]. Dostupné z: https://www.knauer.net/en/what-is-the-difference-between-uhplc-and-hplc-columns/f19650

30. **Lane, C.S, 2005.** Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences. Cellular and Molecular Life Sciences CMLS 62(7-8): 848-869. https://doi.org/10.1007/s00018-005-5006-6

31. **Matoušek, J., Benedík, J., Linhart, P., 2007.** CBRN: Biologické zbraně. Sdružení požárního a bezpečnostního inženýrství v Ostravě. ISBN 978-80-7385-003-6

32. **McElroy, R.J., 1991.** The Geneva Protocol of 1925, in: Krepon, M., Caldwell, D. (Eds.), The Politics of Arms Control Treaty Ratification. Palgrave Macmillan US, New York, pp. 125–166. https://doi.org/10.1007/978-1-137-04534-8_4

33. **Miprolab, MiPROTECT ® Ricin. 2021.** Rapid test for the detection of ricin [online]. [cit. 13. 02. 2021]. Dostupné z: https://www.miprolab.com/fileadmin/Dateiablage/PDF/MF513-020-01__211-AHWA-06-27_Ricin.pdf

34. **Moshiri, M., Hamid, F., Etemad, L., 2016.** Ricin Toxicity: Clinical and Molecular Aspects. Reports Biochem. Mol. Biol. 4, 60–5.

35. **Nagarajan, M., Maruthanayagam, V., Sundararaman, M., 2012.** A review of pharmacological and toxicological potentials of marine cyanobacterial metabolites. J. Appl. Toxicol. 32, 153–185. https://doi.org/10.1002/jat.1717

36. **Novotný, L., Musílek, K., Pohanka, M., Ždárová-Karasová, J., Boštík, P., Jun, D., Kuča, K., 2011.** Introduction to chemical and biological warfare agents. Hradec Králové: Libor Dvořák. ISBN 978-80-260-0916-0

37. **Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons. 2021.** [online]. [cit. 09. 01. 2021]. Dostupné z: https://www.opcw.org

38. **Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons, 2020.** Test Plan and Instructions fot the 5th Biotoxin Analysis Excercise. Dostupné z: https://www.opcw.org/resources/documents/technical-secretariat/2020

39. **Papaloucas, M., Papaloucas, C., Stergioulas, A., 2008.** Ricin and the Assassination of Georgi Markov. Pakistan J. Biol. Sci. 11, 2370–2371.

40. **Patočka, J., Gupta, R.C., Kuča, K., 2011.** Anatoxin-a(S): Natural Organophosphorus Anticholinesterase Agent. Mil. Med. Sci. Lett. 80, 129–139. https://doi.org/10.31482/mmsl.2011.019

41. **Pitt, J.J., 2009.** Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. Clin Biochem Rev. 30, 19–34.

42. **Pohanka, M., Novotný, L., Ždárová-Karasová, J., Kuča, K., Pikula, J., 2010.** Biologické zbraně. Univerzita obrany. ISBN 978-80-7231-342-6

43. **Premierbiosoft, Mass Spectrometry. 2021.** [online]. [cit. 13. 02. 2021]. Dostupné z: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mass-spectrometry.html

44. **Prymula, R., Bajgar, J., Beran, J., Fusek, J., Chlíbek, R., Kassa, J., Šplíňo, M., 2002.** Biologický a chemický terorismus: informace pro každého. Praga: Grada. ISBN 80-247-0288-6

45. **PubChem, National Library of Medicine, Saxitoxin. 2021.** [online]. [cit. 13. 02. 2021]. Dostupné z: https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Saxitoxin#section=EPA-DSSTox-Classification

46. **Rapala, J., Robertson, A., Negri, A.P., Berg, K.A., Tuomi, P., Lyra, C., Erkomaa, K., Lahti, K., Hoppu, K., Lepistö, L., 2005.** First report of saxitoxin in Finnish lakes and possible associated effects on human health. Environ. Toxicol. 20, 331–340. https://doi.org/10.1002/tox.20109

47. **Shea, D., Gottron, F., 2004.** CRS Report for Congress Received through the CRS Web Ricin : Technical Background and Potential Role in Terrorism. Intelligence. Dostupné z: https://apps.dtic.mil/sti/pdfs/ADA535881.pdf

48. **Simon, S., Worbs, S., Avondet, M.A., Tracz, D.M., Dano, J., Schmidt, L., Volland, H., Dorner, B.G., Corbett, C.R., 2015.** Recommended Immunoogical Assays to Screen for Ricin-Containing Samples. Toxins (Basel). 7, 4967-4986. https://doi.org/10.3390/toxins7124858

49. **Solter, P.F., Beasley, V.R., 2013.** Phycotoxins, Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415759-0.00038-8

50. **Spivak, L., Hendrickson, R.G., 2005.** Ricin. Crit. Care Clin. 21, 815–824. https://doi.org/10.1016/j.ccc.2005.06.006

51. **Státní úřad pro jadernou bezpečnost. Oddělení pro kontrolu zákazu chemických a biologických zbraní. 2021.** [online]. [cit. 09. 01. 2021]. Dostupné z: https://www.sujb.cz/zakaz-chemickych-zbrani

52. **Tam, C.C., Henderson, T.D., Stanker, L.H., He, X., Cheng, L.W., 2017.** Abrin toxicity and bioavailability after temperature and pH treatment. Toxins (Basel). 9, 9–14. https://doi.org/10.3390/toxins9100320

53. **Thottumkara, A.P., Parsons, W.H., Du Bois, J., 2014.** Saxitoxin. Angew. Chemie. Int. Ed. 53, 5760–5784. https://doi.org/10.1002/anie.201308235

54. **Tůmová, M., 2016.** Optimalizace metody extrakce vybraných biologických toxinů z pevných matric. Diplomová práce na Ústavu chemie ochrany prostředí Vysoké školy chemicko-technologické v Praze. Vedoucí diplomové práce: Ing. Veronika Rippelová, 55s. 2016.

55. **Wang, D.Z., Zhang, S.F., Zhang, Y., Lin, L., 2016.** Paralytic shellfish toxin biosynthesis in cyanobacteria and dinoflagellates: A molecular overview. J. Proteomics 135, 132–140. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.08.008

56. **Wang, J., Gao., S., Xin, W., Kang, L., Xu, N., Zhang, T., Liu, W., Wang, J., 2015.** A novel recombinant vaccine protecting mice against abrin intoxication. Hum. Vaccines Immunother. 11, 1361–1367. https://doi.org/10.1080/21645515.2015.1008879

57. **Watson, W.A., Litovitz, T.L., Rodgers, G.C., Klein-Schwartz, W., Youniss, J., Rutherfoord Rose, S., Borys, D., May, M.E., 2003.** 2002 Annual Report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance

System. Am. J. Emerg. Med. 21, 353–421. https://doi.org/10.1016/S0735-6757(03)00088-3

Seznam obrázků, grafů a tabulek

Obrázky:

Obr. 1: Brownův pohyb. [cit. 23. 11. 2020], dostupné z: https://edu.techmania.cz/cs/encyklopedie/fyzika/struktura-latek/kineticka-teorie-latek/brownuv-pohyb

Obr. 2: Logo OPCW. [cit. 09. 01. 2020], dostupné z: https://www.opcw.org/media-centre/opcw-logo

Obr. 3: Mechanismus vstupu ricinu a abrinu do buňky. [cit. 02. 11. 2020], dostupné z: Sierra, M.A., Martínez-Álvarez, R., 2020. Ricin and Saxitoxin: Two Natural Products That Became Chemical Weapons. J. Chem. Educ. https://doi.org/10.1021/acs.jchemed.9b00841

Obr. 4: Mechanismus inhibice sodíkových kanálů. [cit. 09. 01. 2020], dostupné z: Valério, E., Chaves, S., Tenreiro, R., 2010. Diversity and impact of prokaryotic toxins on aquatic environments: A review. Toxins (Basel). 2, 2359–2410. https://doi.org/10.3390/toxins2102359

Obr. 5: Schéma HPLC. [cit. 07. 03. 2020], dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/HPLC#/media/Soubor:Preparative_HPLC.svg

Obr. 6: Schéma kolony. [cit. 07. 03. 2020], dostupné z: http://www.hplc.cz

Obr. 7: Schéma analyzátoru v magnetické poli. [cit. 07. 03. 2020], dostupné z:https://www.chemguide.co.uk/analysis/masspec/howitworks.html

Obr. 8: Pořadí jednotlivých součástí v MS. [cit. 07. 03. 2020], dostupné z: http://www.premierbiosoft.com/tech_notes/mass-spectrometry.html

Obr. 9: Spojení kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. [cit. 07. 03. 2020], dostupné z: https://vtechworks.lib.vt.edu/bitstream/handle/10919/36109/Zhou_B_T_ 2011.pdf? sequence=1&isAllowed=y

Obr. 10: Reakce antigenu a protilátek. [cit. 22. 07. 2021], dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Monoklonální_protilátka

Obr. 11: Kit MiPROTECT. [cit. 07. 03. 2020], dostupné z: https://www.miprolab.com/fileadmin/Dateiablage/PDF/MF513-020-01__211-AHWA-06-27_Ricin.pdf

Obr. 12: Vyhodnocování testu. [cit. 07. 03. 2020], dostupné z: https://www.miprolab.com/fileadmin/Dateiablage/PDF/MF513-020-01__211-AHWA-06-27_Ricin.pdf

Obr. 13: Gel po elektroforéze. [foto K. Stuchlíková, 27. 1. 2021]

Obr. 14: Gel po elektroforéze – značení. [foto K. Stuchlíková, 27. 1. 2021]

Obr. 15: pozitivní vzorek BT20/PL01/16. [foto K. Stuchlíková, 27. 1. 2021]

Obr. 16: negativní vzorek BT20/PL02/16. [foto K. Stuchlíková, 27. 1. 2021]

Obr. 17: negativní vzorek BT20/PL03/16. [foto K. Stuchlíková, 27. 1. 2021]

Obr. 18: pozitivní vzorek BT20/PL04/16. [foto K. Stuchlíková, 27. 1. 2021]

Obr. 19: ST20/AS01/16 obsahující ricin. [foto K. Stuchlíková, 27. 1. 2021]

Obr. 20: ST20/AS02/16 obsahující abrin. [foto K. Stuchlíková, 27. 1. 2021]

Grafy:

Graf 1: Kalibrační řada

Graf 2: Chromatogram kalibrační řady

Graf 3: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL01/16; V1 – fragment T11, řetězec A

Graf 4: Fragmentační spektrum v iontové pasti pro vzorek BT20/PL01/16; V1 – fragment T11, řetězec A

Graf 5: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL01/16; V1 – fragment T7, řetězec A

Graf 6: Fragmentační spektrum v iontové pasti pro vzorek BT20/PL01/16; V1 – fragment T7, řetězec A

Graf 7: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL01/16; V1 – fragment T6b, řetězec B

Graf 8: Fragmentační spektrum v iontové pasti pro vzorek BT20/PL01/16; V1 – fragment T6b, řetězec B

Graf 9: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL01/16; V1 – fragment T14b-CAM, řetězec B

Graf 10: Fragmentační spektrum v iontové pasti pro vzorek BT20/PL01/16; V1 – fragment T14b-CAM, řetězec B

Graf 11: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL04/16; V2– fragment T11, řetězec A

Graf 12: Fragmentační spektrum v iontové pasti pro vzorek BT20/PL04/16; V2 – fragment T11, řetězec A

Graf 13: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL04/16; V2 – fragment T7, řetězec A

Graf 14: Fragmentační spektrum v iontové pasti pro vzorek BT20/PL04/16; V1 – fragment T7, řetězec A

Graf 15: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL04/16; V2 – fragment T13b, řetězec B

Graf 16: Fragmentační spektrum v iontové pasti pro vzorek BT20/PL04/16; V2 – fragment T13b, řetězec B

Graf 17: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL04/16; V1 – fragment T6b, řetězec B

Graf 18: Fragmentační spektrum v iontové pasti pro vzorek BT20/PL04/16; V1 – fragment T6b, řetězec B

Graf 19: LC-FLD chromatogram pro vzorek BT20/PL05/16

Graf 20: LC-FLD chromatogram pro vzorek BT20/PL06/16

Graf 21: LC-FLD chromatogram pro vzorek BT20/PL07/16

Graf 22: LC-FLD chromatogram pro vzorek BT20/PL08/16

Graf 23: LC-FLD chromatogram pro vzorek standard STX; 0,5µg/ml

Graf 24: LC-FLD chromatogram čisté plazmy bez STX

Graf 25: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL05/16

Graf 26: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL07/16

Graf 27: LC-MS/MS chromatogram pro vzorek BT20/PL08/16

Graf 28: LC-MS/MS chromatogram pro standard

Graf 29: LC-MS/MS chromatogram pro blank

Tabulky:

Tab. 1: Seznam vzorků s očekávanými toxiny

Tab. 2: Seznam standardů

Tab. 3: Použitý gradient – LC-MS/MS

Tab. 4: Použitý gradient – LC-FLD

Tab. 5: Kalibrační řada

Tab. 6: Použitý gradient – LC-MS/MS

Tab. 7: Proteospecifická sekvence peptidu po štěpení trypsinem pro fragment T11, řetězec A, vzorek BT20/PL01/16; V1

Tab. 8: Tabulka teoretických fragmentů peptidu LEQLAGNLR (T11) s vyznačením fragmentů reálně detekovaných během analýzy

Tab. 9: Proteospecifická sekvence peptidu po štěpení trypsinem pro fragment T7, řetězec A, vzorek BT20/PL01/16; V1

Tab. 10: Tabulka teoretických fragmentů peptidu VGLPINQR (T7) s vyznačením fragmentů reálně detekovaných během analýzy

Tab. 11: Proteospecifická sekvence peptidu po štěpení trypsinem pro fragment T6b, řetězec B, vzorek BT20/PL01/16; V1

Tab. 12: Tabulka teoretických fragmentů peptidu SNTDANQLWTLK (T6b) s vyznačením fragmentů reálně detekovaných během analýzy

Tab. 13: Proteospecifická sekvence peptidu po štěpení trypsinem pro fragment T14b-CAM, řetězec B, vzorek BT20/PL01/16; V1

Tab. 14: Tabulka teoretických fragmentů peptidu DNCLTSDSNIR (T14b-CAM) s vyznačením fragmentů reálně detekovaných během analýzy

Tab. 15: Proteospecifická sekvence peptidu po štěpení trypsinem pro fragment T11, řetězec A, vzorek BT20/PL04/16; V2

Tab. 16: Tabulka teoretických fragmentů peptidu LEQLAGNLR (T11) s vyznačením fragmentů reálně detekovaných během analýzy

Tab. 17: Proteospecifická sekvence peptidu po štěpení trypsinem pro fragment T7, řetězec A, vzorek BT20/PL04/16; V1

Tab. 18: Tabulka teoretických peptidů VGLPINQR (T7) s vyznačením fragmentů reálně detekovaných během analýzy

Tab. 19: Proteospecifická sekvence peptidu po štěpení trypsinem pro fragment T13b, řetězec A, vzorek BT20/PL04/16; V2

Tab. 20: Tabulka teoretických fragmentů peptidu AEQQWALYADGSIRPQQNR (T13b) s vyznačením fragmentů reálně detekovaných během analýzy

Tab. 21: Proteospecifická sekvence peptidu po štěpení trypsinem pro fragment T6b, řetězec B, vzorek BT20/PL04/16; V1

Tab. 22: Tabulka teoretických fragmentů peptidu SNTDANQLWTLK (T6b) s vyznačením fragmentů reálně detekovaných během analýzy

Tab. 23: srovnání času analýzy STX a plochy pod píkem

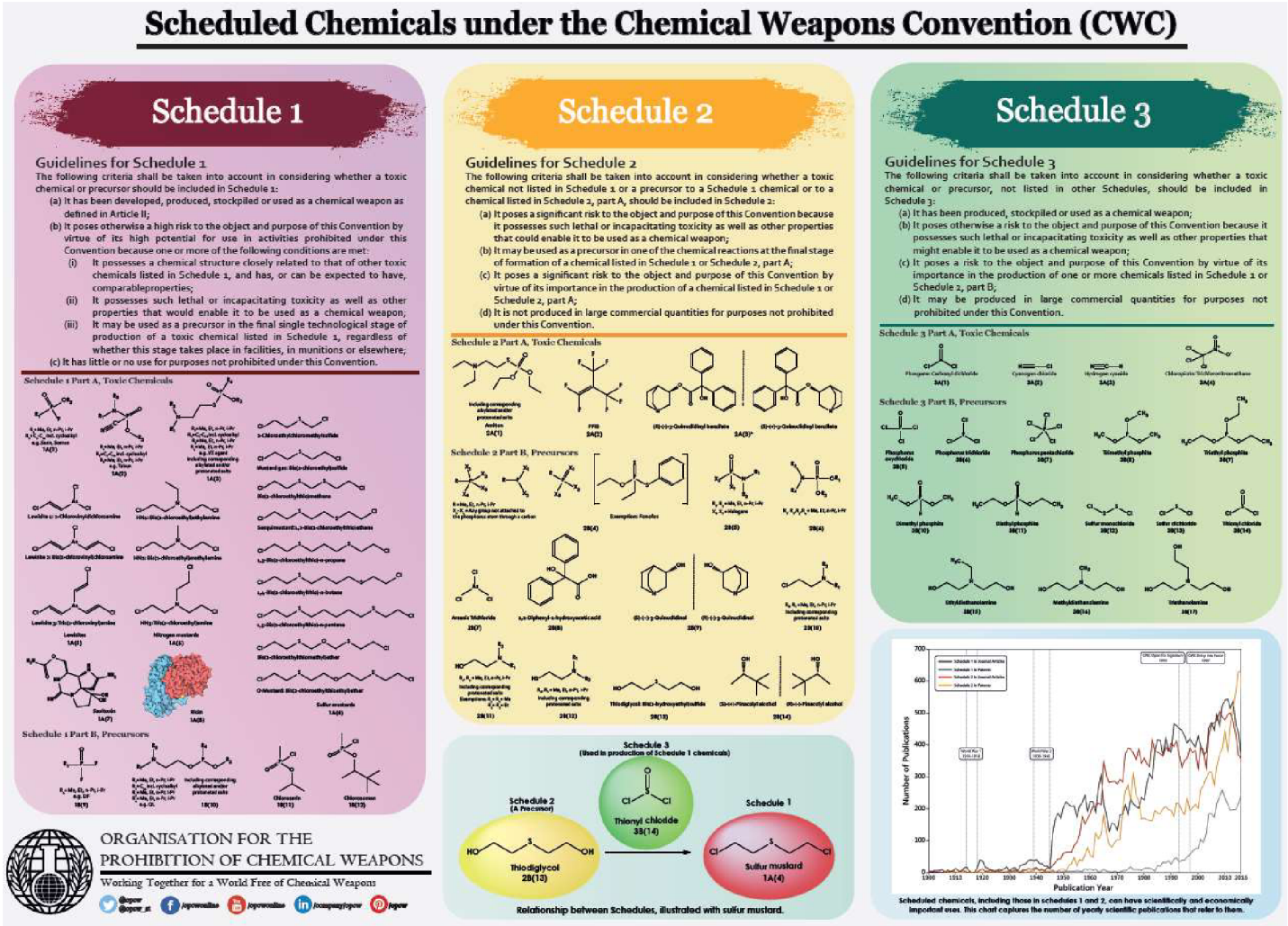
Tab. 24: Iontové přechody, vzorek BT20/PL05/16

Tab. 25: Iontové přechody, vzorek BT20/PL07/16

Tab. 26: Iontové přechody, vzorek BT20/PL08/16

Tab. 27: Použité přidané chemikálie/toxiny ve vzorcích

Tab. 28: Vyhodnocení vzorků a použitých metod

PŘÍLOHY

Příloha 1: Kategorizace chemikálií dle OPCW na základě Úmluvy o chemických zbraní