

UNIVERZITA KARLOVA
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ
Katedra biochemických věd

**STANOVENÍ SYMETRICKÉHO A ASYMETRICKÉHO
DIMETHYLARGININU V LIDSKÉ PLAZMĚ METODOU
VYSOKOÚČINNÉ KAPALINOVÉ CHROMATOGRRAFIE**

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Lucie Zemanová, Ph.D.

Školitel bakalářské práce: Ing. Ladislav Trefil

Hradec Králové 2017

Pavel Prokop

„Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.“

.....

.....

Pavel Prokop

Děkuji RNDr. Lucii Zemanové, Ph.D., za trpělivost a cenné rady při vypracování této práce a Ing. Ladislavu Trefilovi za odborné metodické vedení. Dále bych chtěl poděkovat MUDr. Danielu Rajdlovi, Ph.D., za pomoc při statistickém zpracování získaných dat, svým kolegyním laborantkám Mileně Schejbalové a Lence Rubášové za pomoc při přípravě vzorků a všem zaměstnancům ÚKBH FN Plzeň za podporu při studiu.

OBSAH

1	ÚVOD	5
2	TEORETICKÁ ČÁST	6
2.1	Vznik a působení NO.....	6
2.2	Metabolismus methylargininů	7
2.2.1	Syntéza methylargininů.....	8
2.2.2	Eliminace methylargininů	10
2.2.3	Transport přes membránu	11
2.3	L-Arginin paradox	13
2.4	L-Homoarginin	14
2.5	Význam stanovení ADMA a SDMA	15
2.5.1	ADMA a SDMA u zdravé populace	15
2.5.2	ADMA a SDMA u kardiovaskulárních onemocnění	15
2.5.3	ADMA a SDMA u renálních onemocnění.....	16
2.6	Metody stanovení ADMA a SDMA	17
2.6.1	Kapalinová chromatografie s UV a fluorescenční detekcí.....	17
2.6.2	Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí.....	19
2.6.3	Plynová chromatografie (GC).....	20
2.6.4	Kapilární elektroforéza (CE).....	21
2.6.5	Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC).....	21
2.6.6	Enzymová imunoanalýza na imunosorbentech (ELISA).....	22
3	CÍL PRÁCE	23
4	MATERIÁL A METODIKA	24
4.1	Použitý materiál a chemikálie.....	24
4.1.1	Použité chemikálie	24
4.1.2	Použitý materiál a soupravy	24
4.1.3	Použité přístroje	25
4.1.4	Použitý software.....	25
4.1.5	Ostatní použitý materiál, přístroje a pomůcky	25
4.1.6	Použité pufry	25
4.2	Příprava roztoků.....	26
4.2.1	Mobilní fáze	26
4.2.2	Standardy	27

4.2.3	Roztoky pro SPE.....	27
4.2.4	Derivatizační činidlo	27
4.3	Biologické vzorky.....	28
4.4	Stanovení argininu a jeho derivátů metodou HPLC	28
4.4.1	Příprava vzorku.....	28
4.4.2	Derivatizace	29
4.4.3	Chromatografie	29
4.4.4	Kalibrace	30
4.4.5	Validace	30
4.5	Stanovení ADMA a SDMA metodou ELISA.....	31
4.6	Statistika.....	31
5	VÝSLEDKY A DISKUSE	32
5.1	Zavedení metody HPLC	32
5.1.1	Chromatografická separace.....	32
5.1.2	Příprava vzorků.....	34
5.1.3	Derivatizace OPA	35
5.1.4	Analytické vlastnosti metody.....	37
5.2	Porovnání HPLC a ELISA metody.....	38
6	ZÁVĚR	41
	POUŽITÉ ZKRATKY.....	42
	POUŽITÁ LITERATURA	44
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	50
	SEZNAM TABULEK	51

1 ÚVOD

Při sledování metabolismu vzniku, pro život důležité molekuly, oxidu dusnatého identifikoval v 90. letech 20. století prof. Patrick Vallance se svými spolupracovníky ve vzorcích lidské moči dva deriváty L-argininu, asymetrický a symetrický dimethylarginin.

L-arginin a jeho deriváty jsou důležité pro sledování metabolismu souvisejícího se vznikem a účinky oxidu dusnatého. Pro jejich stanovení jsou výhodné separační chromatografické metody, které v jedné analýze umožňují, na rozdíl od imunochemických metod, stanovení více analytů najednou a výpočet jejich vzájemných poměrů. V mnoha pracích byla popsána metodika stanovení pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie nejen pro asymetrický a symetrický dimethylarginin, ale i pro ostatní deriváty L-argininu.

2 TEORETICKÁ ČÁST

Cévní endotel je jednovrstevná cévní výstelka tvořená z plochých buněk, oddělujících prostor cévního lumina od hlubších vrstev cévní stěny. Kromě úlohy bariérové má tento orgán celou řadu dalších rozličných funkcí. Narušení rovnováhy funkcí endotelu se projeví jeho dysfunkcí.

Důležitou fyziologickou roli při ochraně cévního endotelu hraje oxid dusnatý (NO). Endotelem tvořený NO je účinným vasodilatátorem a hraje klíčovou roli v udržení homeostázy cév. Pokles koncentrace NO je hlavní známkou dysfunkce endotelu.

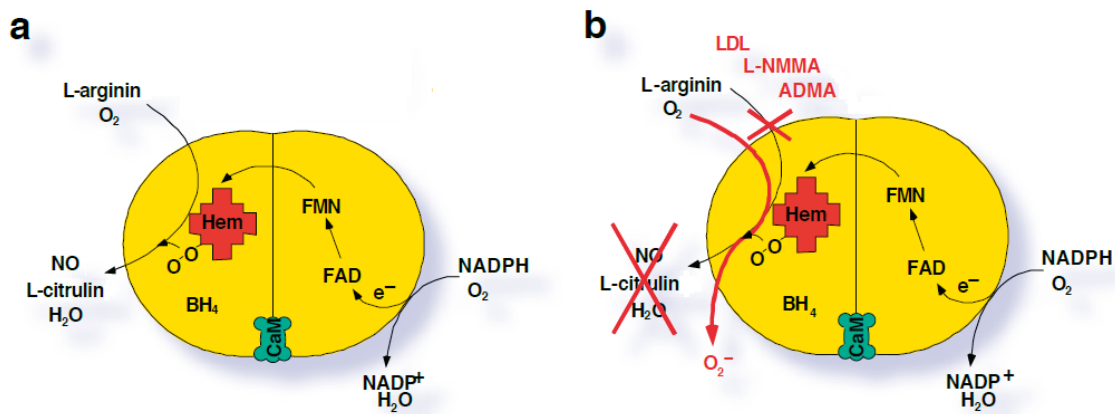
Poměr koncentrací L-argininu a jeho methylovaných derivátů určuje aktivitu NO synthasy *in vivo* a tím ovlivňuje vaskulární funkci. Endotelová dysfunkce, jako časné stadium aterosklerózy, je způsobena právě nedostatkem NO.

2.1 Vznik a působení NO

Oxid dusnatý vzniká v endotelu z aminokyseliny L-argininu dvoustupňovou reakcí katalyzovanou enzymem NO synthasou (nitroxidsynthasa, NOS). NO synthasa byla identifikována v neuronech, endoteliálních buňkách, makrofázích a hepatocytech v různých izoformách. Jsou známy dva typy NO synthasy, konstituční a inducibilní. Konstituční NO synthasa (cNOS) zahrnuje neuronální izoformu I (nNOS) v nervových a epiteliálních buňkách a endoteliální izoformu III (eNOS) v endoteliálních buňkách. Inducibilní izoforma II (iNOS) se vyskytuje v cytokiny indukovaných buňkách (Aldámiz-Echevarría & Andrade, 2012; Tsikas et al., 2000). Konstituční NO synthasa je závislá na vápenatých iontech a kalmodulinu (Šíroková et al., 2005; Tsikas et al., 2000).

Enzym NO synthasa se skládá ze dvou podjednotek a katalyzuje reakci přenosu elektronů z molekulárního kyslíku na L-arginin, což vede k produkci L-citrulinu a NO (Obr. 1a) (Böger, 2008). V prvním kroku reakce vzniká hydroxylací *N*-hydroxy-L-arginin, který je následně oxidován na L-citrulin a uvolňuje se NO (Tsikas, 2007). Za patofyziologických podmínek, při inhibici NOS, je mechanismus reakce syntézy NO blokován a je přerušen přenos elektronů a tím i oxidace L-argininu (Obr. 1b). Akceptorem elektronů se pak stává kyslík a vzniká superoxidový radikál (Böger, 2008).

NOS, a tím i syntéza NO, je kompetitivně inhibována dvěma endogenními deriváty L-argininu: N^G -monomethyl-L-argininem (L-NMMA) a N^G,N^G -dimethyl-L-argininem (asymetrický dimethylarginin, ADMA) (Šíroková et al., 2005).



Obr. 1: Mechanismus reakce katalyzované NO syntasou.

a) mechanismus přenosu elektronu a vzniku NO u neinhibované reakce, b) mechanismus přenosu elektronu při inhibici NOS (Böger, 2008). CaM – kalmodulin, FAD – flavinadenindinukleotid, FMN – flavinmononukleotid, NADPH, NADP – nikotinamidadenindinukleotid, LDL – lipoproteiny o nízké hustotě, L-NMMA – monomethylarginin, ADMA – asymetrický dimethylarginin

NO je relativně nestabilní volný radikál, hrající roli v mnoha biologických procesech, jako je nervová komunikace, antimikrobiální aktivita, hormonální sekrece, imunitní odpověď nebo cévní tonus (Aldámiz-Echevarría & Andrade, 2012). Oxid dusnatý způsobuje vazodilataci, inhibuje adhezi a agregaci trombocytů, produkci tkáňového faktoru, adhezi monocytů, proliferaci buněk hladké svaloviny, uvolňování superoxidových radikálů a LDL oxidaci (Böger, 2008; Široká et al., 2005).

U pacientů se zvýšenou hladinou inhibitorů NOS je blokována NO syntasa a je narušena na oxidu dusnatém závislá vazodilatace, ale i další účinky NO. Oslabení účinků NO vede ke změnám v endotelu, označovaným jako endotelová dysfunkce (Böger, 2008). Endotelová dysfunkce je zodpovědná za řadu zdravotních problémů, jako je ateroskleróza, hypertenze, trombóza, vaskulitida (Aldámiz-Echevarría & Andrade, 2012).

2.2 Metabolismus methylargininů

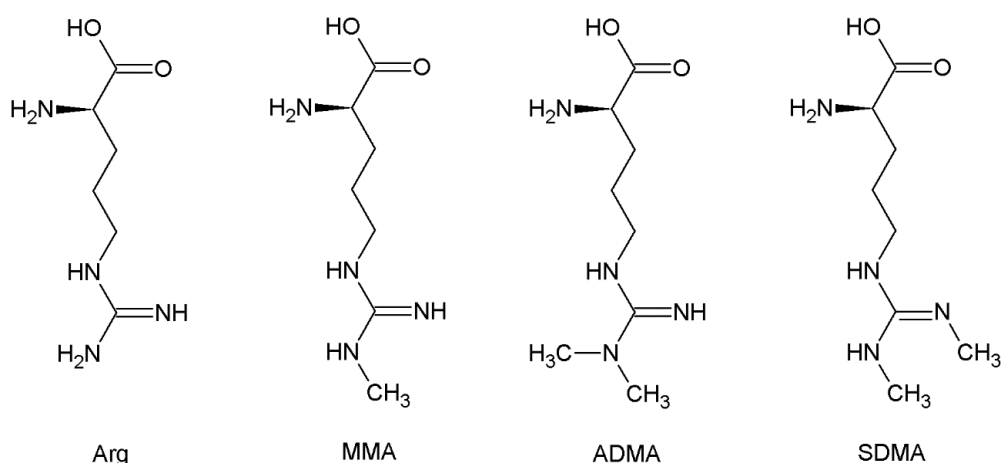
Methylargininy jsou deriváty odvozené od L-argininu. L-Arginin je bazická aminokyselina, která obsahuje polární disociovanou guanidinovou skupinu. Hodnoty disociačních konstant pro L-arginin jsou: pK_1 (karboxylová skupina) = 2,1; pK_2 (α -amino skupina) = 8,99; pK_3 (guanidinová skupina) = 12,48. Normální koncentrace v plazmě je velmi variabilní a pohybuje se mezi 21–138 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (Burtis et al., 2013). L-Arginin řadíme mezi semiesenciální aminokyseliny, esenciální je pouze v době růstu.

V močovinovém cyklu je L-arginin v cytoplazmě hydrolyticky štěpen enzymem arginasou na močovinu a L-ornitin.

2.2.1 Syntéza methylargininů

Methylace proteinů je posttranslační modifikací, která připojuje methylovou skupinu do polypeptidového řetězce. Je katalyzována enzymy methyltransferasami. Tyto reakce lze rozdělit do dvou skupin. Reakce patřící do první skupiny vedou k reverzibilní modifikaci karboxylové skupiny za vzniku methylesterů. Výsledkem reakcí druhé skupiny je ireverzibilní přenos methylu na atomy síry nebo dusíku několika aminokyselin (Tran et al., 2003).

Methylací koncové guanidinové skupiny L-argininu za účasti enzymů *N*-methyltransferas z rodiny protein-arginin methyltransferas (PRMT) vznikají methylované deriváty L-argininu (Obr. 2).

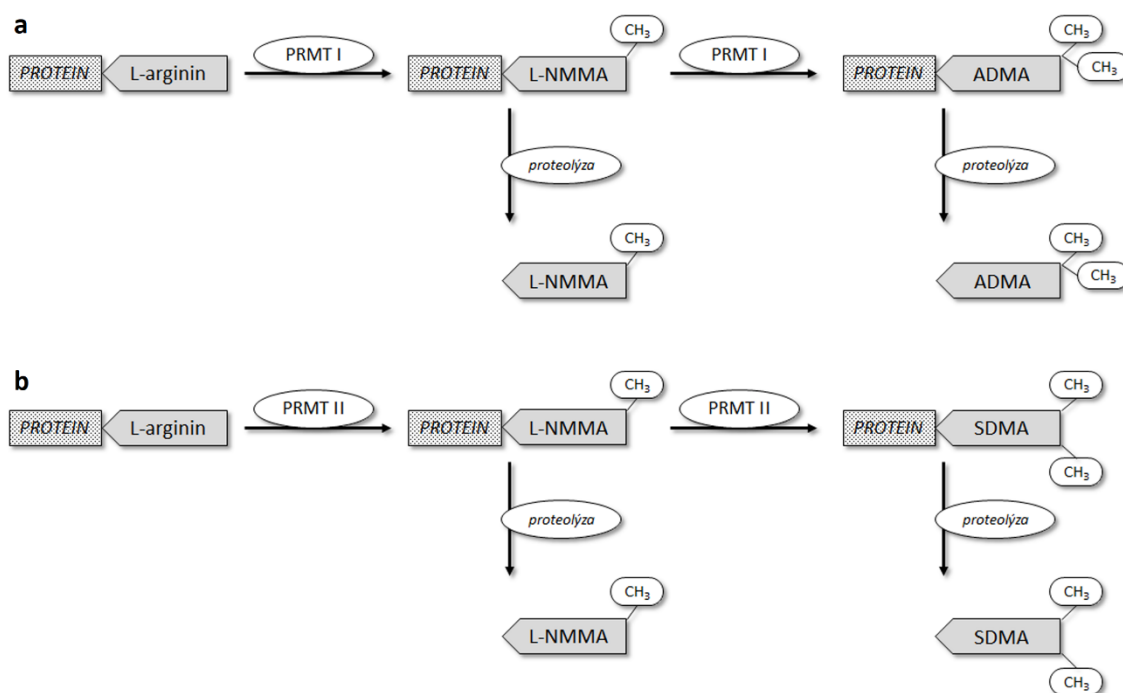


Obr. 2: Arginin a jeho methylované deriváty.

Arg – L-arginin, MMA – monomethylarginin, ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

Protein-arginin methyltransferasy (PRMT) se podle substrátu a produktu reakce rozlišují na dva typy. Působením protein-arginin methyltransferasy typu I (PRMT I) vzniká monomethylarginin (MMA) a *N*^G,*N*^G-dimethyl-L-arginin (asymetrický dimethylarginin, ADMA). Methylace L-argininu probíhá ve dvou krocích, nejprve vzniká *N*^G-monomethyl-L-arginin (L-NMMA) a další methylací pak *N*^G,*N*^G-dimethyl-L-arginin (ADMA) (Obr. 3a) (Pope et al., 2009).

Asymetrického dimethylargininu je v plazmě přibližně desetkrát více než monomethylargininu, stává se tak důležitým endogenním regulátorem produkce oxidu dusnatého z L-argininu (Tran et al., 2003; Vallance et al., 1992b). ADMA je tedy hlavním inhibítorem NO synthasy. Biosyntézu a metabolismus ADMA přehledně zachycuje Obr. 4. PRMT typu I se nachází převážně v endotelu a buňkách hladkého svalstva kardiiovaskulárního systému (Aldámiz-Echevarría & Andrade, 2012).



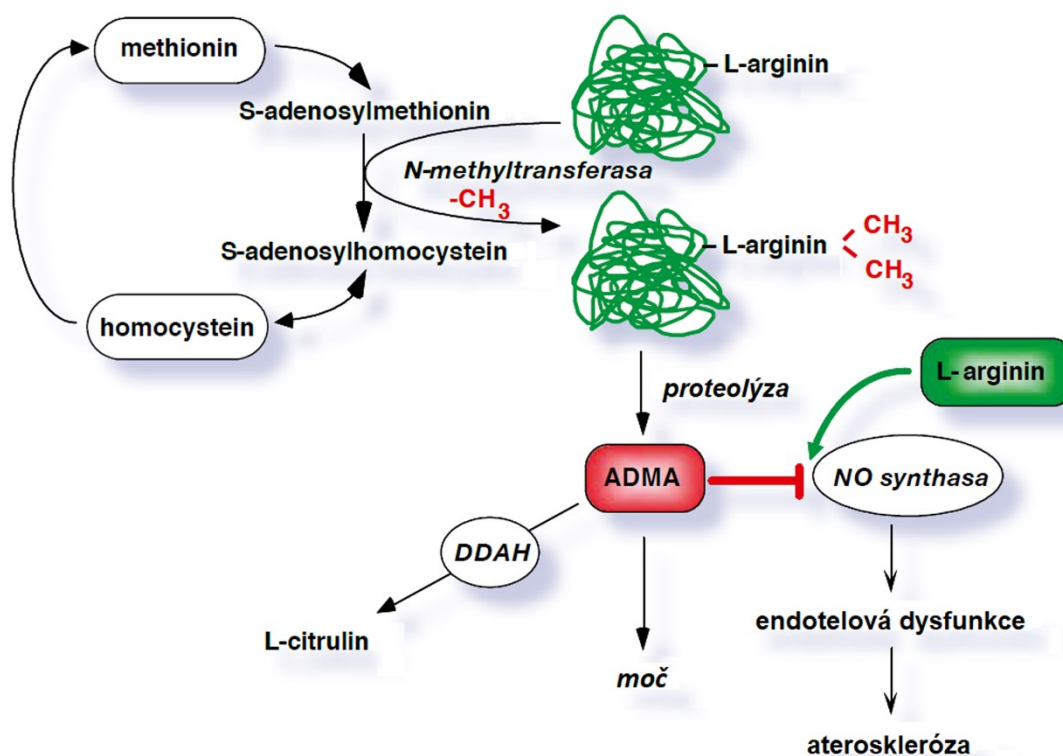
Obr. 3: Schéma vzniku methylargininů.

a) vznik monomethylargininu (L-NMMA) a asymetrického dimethylargininu (ADMA) účinkem protein-arginin methyltransferasy typu I (PRMT I), b) vznik monomethylargininu a symetrického dimethylargininu (SDMA) účinkem protein-arginin methyltransferasy typu II (PRMT II).

Symetrický dimethylarginin (SDMA, $N^G, N^{G'}$ -dimethyl-L-arginin) vzniká rovněž methylováním L-argininu za účasti enzymů protein-arginin methyltransferas, ale druhého typu (PRMT II). Protein-arginin methyltransferasa typu II vytváří v prvním kroku také N^G -monomethyl-L-arginin (L-NMMA) a ten je pak v druhém kroku methylován na $N^G, N^{G'}$ -dimethyl-L-arginin (SDMA) (Obr. 3b) (Pope et al., 2009). Na rozdíl od asymetrického dimethylargininu však nemá SDMA přímý vliv na aktivitu NO synthasy (Tran et al., 2003; Vallance et al., 1992a).

Methylové skupiny, které jsou nutné ke vzniku dimethylargininů přenáší obě protein-arginin methyltransferasy z *S*-adenosylmethioninu, který je součástí metabolického cyklu homocysteinu (Aldámiz-Echevarría & Andrade, 2012).

Volné methylované deriváty L-argininu vznikají endogenně jako výsledek proteolýzy posttranslačně methylovaných proteinů (Tran et al., 2003). Proteolýza těchto proteinů umožňuje uvolnění volných methylargininů do cytoplazmy, kde mohou inhibovat NO syntasu (Pope et al., 2009).



Obr. 4: Biosyntéza a metabolismus asymetrického dimethylargininu.

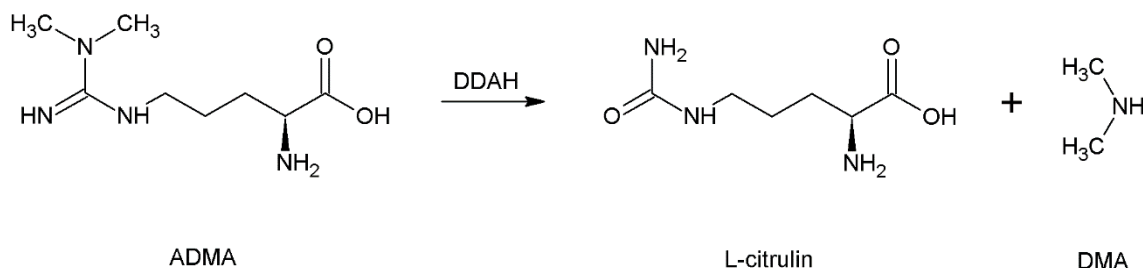
Působením *N*-methyltransferas dochází k methylaci argininových zbytků v molekulách proteinů, po jejichž proteolýze se uvolňuje volný asymetrický dimethylarginin (ADMA), který inhibuje NO syntasu a způsobuje tak endotelovou dysfunkci. ADMA je metabolizován dimethylarginindimethylaminohydrolasou (DDAH) na L-citrulin, částečně je také vylučován močí (Böger, 2008).

Při oxidačním stresu mohou lipoproteiny o nízké hustotě (LDL) a oxidované LDL částice zvyšovat aktivitu protein-arginin methyltransferas v endoteliálních buňkách, což vede ke zvýšení produkce ADMA (Aldámiz-Echevarría & Andrade, 2012).

2.2.2 Eliminace methylargininů

Volné methylargininy jsou odstraňovány enzymatickou degradací nebo transportem ven z buňky s následnou exkrecí ledvinami (Teerlink et al., 2009). Většina ADMA je degradována na L-citrulin, SDMA je naopak téměř úplně vylučován ledvinami.

Hlavní metabolickou degradací ADMA je hydrolýza, při které vzniká L-citrulin. Reakci katalyzuje enzym dimethylarginindimethylaminohydrolasa (DDAH). Ta specificky hydrolyzuje ADMA a MMA, ale nemá žádnou aktivitu vůči SDMA (Tran et al., 2003). Při degradaci asymetrického dimethylargininu a monomethylargininu vzniká kromě L-citrulinu ještě dimethylamin (DMA) nebo methylamin (Obr. 5) (Aldámiz-Echevarría & Andrade, 2012; Pope et al., 2009). Více než 70 % ADMA je metabolizováno právě enzymem DDAH (Pope et al., 2009).



Obr. 5: Hydrolýza ADMA katalyzovaná DDAH.

ADMA – asymetrický dimethylarginin, DMA – dimethylamin, DDAH – dimethylarginin-dimethylaminohydrolasa

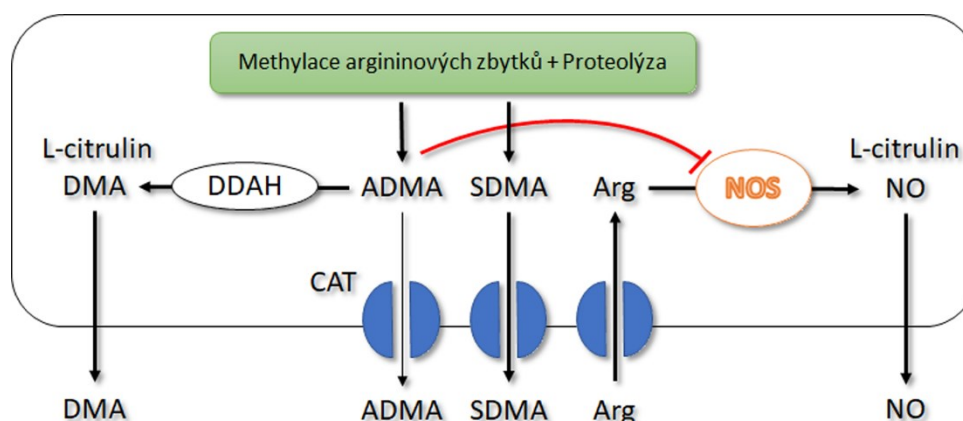
Jsou známy dvě izoformy DDAH s rozdílnou orgánovou specifitou. DDAH-1 je spojena s tkáněmi exprimujícími neuronální NO syntasu, DDAH-2 s tkáněmi exprimujícími endoteliální NO syntasu (Aldámiz-Echevarría & Andrade, 2012; Pope et al., 2009). Lokalizace DDAH v buňkách endotelu spolu s NOS podporuje teorii o přímém vlivu ADMA na buňky tvořící NO. Aktivita DDAH je klíčovým faktorem určujícím hladinu ADMA *in vivo* (Tran et al., 2003).

SDMA je eliminován primárně renální exkrecí, nicméně částečně podléhá také metabolické přeměně. ADMA i SDMA mohou být metabolizovány i alternativní cestou (Martens-Lobenhoffer & Bode-Böger, 2015; Rodionov et al., 2016).

2.2.3 Transport přes membránu

L-Arginin a jeho methylované deriváty jsou přenášeny přes membránu y^+ transportním systémem specifickým pro kationtové aminokyseliny (Teerlink et al., 2009; Tsikas et al., 2000). Tento transport zajišťují molekuly patřící do rodiny transportérů kationtových aminokyselin (CAT) (Obr. 6). Transportéry kationtových aminokyselin se dělí na několik typů, z nichž CAT-1, CAT-2A a CAT-2B jsou pro transmembránový přenos L-argininu a methylargininů nejdůležitější (Teerlink et al., 2009).

Transportér kationtových aminokyselin CAT-1 se vyskytuje ve všech tkáních a orgánech kromě jater, CAT-2A je výrazně exprimován v játrech a CAT-2B je indukován prozánětlivými cytokiny v různých tkáních spolu s inducibilní arginaseou a NO syntasou. Dibazické aminokyseliny, jako právě L-arginin, mají při neutrálním pH krevní plazmy pozitivní náboj a jsou přenášeny CAT-1 a CAT-2B, methylované deriváty argininu jsou dobře přenášeny CAT-2B (Teerlink et al., 2009).



Obr. 6: Metabolismus a transport argininu a dimethylargininů v buňce.

Asymetrický dimethylarginin (ADMA) je hydrolyzován dimethylarginindimethylamino-hydrolasou (DDAH) na L-citrulin a dimethylamin (DMA). Nezmetabolizovaný ADMA inhibuje NO syntasu (NOS). Symetrický dimethylarginin (SDMA) a částečně také ADMA opouští buňku a soutěží s L-argininem (Arg) o přenos přes transportér kationtových aminokyselin (CAT).

ADMA, SDMA a MMA soutěží s L-argininem o transport zprostředkovaný inducibilním γ^+ transportním systémem prostřednictvím CAT-2B (Teerlink et al., 2009; Tsikas et al., 2000). Vysoká koncentrace intracelulárního ADMA, který není zmetabolizován DDAH, může nejen inhibovat aktivitu NOS, ale také blokovat transport přes CAT a omezit tak vychytávání L-argininu buňkou, čímž se také podílí na endotelové dysfunkci a vzniku mikrovaskulárního oxidačního stresu (Teerlink et al., 2009). Ke snížení produkce NO může docházet také v důsledku blokace transportu L-argininu při vysokých koncentracích SDMA (Markowski et al., 2007). Snížená schopnost vychytávání L-argininu buňkou lze zvrátit zvýšením exogenního přísunu L-argininu (Tsikas et al., 2000).

2.3 L-Arginin paradox

U savců byl pozorován jev, který se nazývá L-arginin paradox. Fyziologická plazmatická koncentrace L-argininu několikanásobně převyšuje Michaelisovu konstantu pro endoteliální NOS. Při fyziologických koncentracích L-argininu by tedy NO syntasa měla být dobře nasycena substrátem a přidání exogenního L-argininu by nemělo ovlivňovat aktivitu tohoto enzymu. Nicméně i malé změny v koncentraci L-argininu přesto mohou způsobit viditelnou změnu aktivity NO synthasy (Böger, 2004).

L-Arginin paradox může být vysvětlen tím, že izoformy NOS jsou silně inhibovány endogenně produkovanými sloučeninami. V roce 2000 uvedl Tsikas et al. (2000) hypotézu vysvětlení L-arginin paradoxu přítomností endogenních inhibitorů NO synthasy, asymetrického dimethylargininu a monomethylargininu. Autor uvádí, že koncentrace ADMA $1 \mu\text{mol l}^{-1}$ sníží aktivitu NOS zhruba na polovinu, koncentrace $2 \mu\text{mol l}^{-1}$ na jednu pětinu ve srovnání s aktivitou při stejné koncentraci substrátu L-argininu bez inhibitoru. Také Böger (2004) demonstroval, že ADMA inhibuje endoteliální a neuronální NO syntasu v závislosti na koncentraci a jako nejsilnější endogenní inhibitor NO synthasy tak hraje ústřední roli v regulaci aktivity NOS.

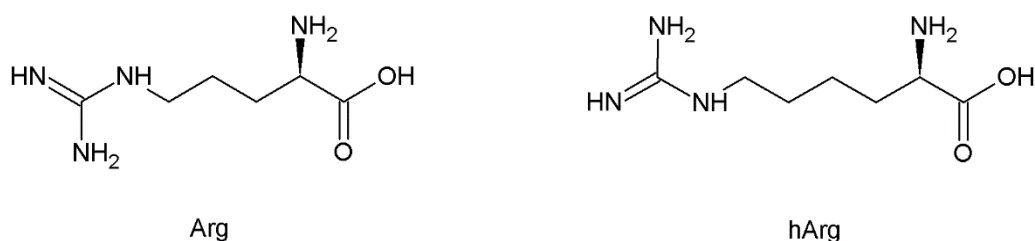
Za fyziologických podmínek je aktivita izoform NOS snížena na zlomek jejich maximálních aktivit. Za patologických podmínek pak způsobuje zvýšení intracelulární koncentrace inhibitorů, zejména patofyziologicky relevantní koncentrace ADMA, i při normální koncentraci L-argininu, další pokles aktivity NO synthasy, jehož výsledkem je produkce NO pod fyziologickou normou (Bode-Böger et al., 2007; Tsikas et al., 2000).

Intravenózní nebo perorální podávání L-argininu zvyšující jeho plazmatickou koncentraci vede k výměně intracelulárních inhibitorů s extracelulárním L-argininem, ke zvýšení koncentrace intracelulárního L-argininu a obnovení fyziologického poměru argininu a jeho inhibitorů. Antagonizace L-argininu s kompetitivními inhibitory a snížení intracelulárních koncentrací kompetitivních i nekompetitivních inhibitorů extracelulárním L-argininem způsobují zvýšení aktivity NOS a zvýšení produkce NO (Tsikas et al., 2000). L-arginin paradox tedy naznačuje, že aktivita endoteliální NOS je spojena s transportem L-argininu a extracelulární hladiny L-argininu a ADMA jsou zodpovědné za modulaci aktivity endoteliální NOS (Bode-Böger et al., 2007).

2.4 L-Homoarginin

L-Homoarginin (hArg) je endogenní, neproteinogenní aminokyselina, která se odlišuje od L-argininu další methylenovou skupinou v řetězci (Obr. 7).

L-Homoarginin je syntetizován ze stejného prekurzoru jako asymetrický a symetrický dimethylarginin, z L-argininu. Za syntézu je zodpovědný enzym arginin:glycin amidinotransferasa (AGAT). Tento enzym se podílí na syntéze energetických metabolitů, přenáší amidin z L-argininu na L-glycin za vzniku guanidinoacetátu a L-ornitinu. Guanidinoacetát je pak methylován na kreatinin (Pilz et al., 2015; Tsikas & Wu, 2015). Stejným mechanismem přenáší AGAT amidin z L-argininu na L-lysin, přičemž vzniká L-homoarginin a L-ornitin. (Tsikas & Wu, 2015).



Obr. 7: Arginin a homoarginin.

Arg – L-arginin, hArg – L-homoarginin

Vzhledem k strukturní podobnosti s L-argininem se předpokládá, že L-homoarginin ovlivňuje metabolismus L-argininu a následně i syntézu NO. L-Homoarginin slouží jako substrát pro NO synthasu a může být metabolizován na NO a L-homocitrulin, i když je pro NOS horším substrátem než L-arginin. L-Homoarginin konkuruje L-argininu při přenosu transportéry kationtových aminokyselin a trans-stimulací CAT může zvýšit buněčné ztráty L-argininu. Na druhou stranu inhibuje enzym argininasu a může tak zvýšit dostupnost argininu a syntézu NO (Pilz et al., 2015).

Koncentrace L-homoargininu v plazmě je 2,63 $\mu\text{mol l}^{-1}$, tedy 4–5krát vyšší než koncentrace ADMA a 20–40krát nižší než koncentrace L-argininu (Pilz et al., 2015). Bylo zjištěno, že koncentrace hArg je nižší u pacientů trpících různými onemocněními. Na rozdíl od ADMA nebo SDMA jsou nízké koncentrace L-homoargininu v plazmě a v moči spojeny s vysokým rizikem morbidit a mortality (Tsikas & Wu, 2015).

V posledních letech označilo několik epidemiologických studií nízké plazmatické koncentrace L-homoargininu za nezávislý rizikový faktor kardiovaskulárních, cerebrovaskulárních a renálních onemocnění (Pilz et al., 2015). U zvířecích modelů mrtvice a obezity má L-homoarginin příznivé účinky (Tsikas & Wu, 2015).

2.5 Význam stanovení ADMA a SDMA

ADMA a SDMA, ale i ostatní metabolity L-argininu a on sám, jsou důležité pro sledování metabolismu souvisejícího s oxidem dusnatým. V některých publikacích jsou uváděny nejen koncentrace jednotlivých derivátů L-argininu, ale jsou také vypočítávány i různé poměry, např. Arg/ADMA, Arg/SDMA, hArg/ADMA, ADMA/SDMA a další.

2.5.1 ADMA a SDMA u zdravé populace

Teerlink (2007) uvádí referenční meze v plazmě pro ADMA 0,39–0,63 $\mu\text{mol l}^{-1}$ a pro SDMA 0,38–0,73 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Koncentrace dimethylargininů se však v různých studiích značně liší, a to i při použití podobných metod stanovení (Meinitzer et al., 2007).

Meinitzer et al. (2007) uvedli ve své práci referenční rozmezí pro ADMA, SDMA, L-homoarginin a L-arginin. Také zjistili, že koncentrace ADMA a SDMA je závislá na věku, s rostoucím věkem stoupá, zatímco u L-homoargininu a L-argininu nebyl nárůst koncentrací s věkem pozorován.

Extracelulární koncentrace ADMA je 5–10krát nižší než intracelulární. I nepatrné změny plazmatické koncentrace jsou dostatečné k významné změně intracelulární hladiny ADMA a produkce NO. Za patologických podmínek může dojít k 3–9násobnému zvýšení plazmatických koncentrací ADMA, což může inhibovat produkci NO o 30–70 % (Aldámiz-Echevarría & Andrade, 2012).

2.5.2 ADMA a SDMA u kardiovaskulárních onemocnění

Zvýšená plazmatická koncentrace ADMA má vysokou prevalenci u onemocnění spojených s endoteliální dysfunkcí, zahrnujících hypertenzi, hyperlipidemii, hypercholesterolemii, hyperhomocysteinemii, diabetes mellitus, preeklampsii, ischemickou chorobu srdeční (ICHS), chronické srdeční selhání, erektilní dysfunkci a další, u kterých bylo zjištěno, že koncentrace plazmatického L-argininu je v normě (Bode-Böger et al., 2007; Böger and Ron, 2005; Pope et al., 2009; Tsikas et al., 2000).

U stavů spojených s endoteliální dysfunkcí je pozorována snížená aktivita nebo exprese DDAH, která je zodpovědná za zvýšení koncentrace methylargininů s následnou inhibicí NOS (Pope et al., 2009).

Bode-Böger et al. (2006) naměřili u pacientů s ischemickou chorobou srdeční (ICHS) významně vyšší hladiny ADMA a SDMA. Bylo prokázáno, že koncentrace

ADMA koreluje s rozsahem a závažností koronární aterosklerózy a je silným ukazatelem kardiovaskulárních příhod a nezávislým rizikovým faktorem ICHS a mortality u pacientů s ICHS (Bode-Böger et al., 2006; Pope et al., 2009).

Ve velké studii zahrnující 3 952 respondentů, při které byly měřeny oba dimethylderiváty argininu, prokázal Schwedhelm et al. (2014), že SDMA je nezávislý parametr predikce mortality kardiovaskulárního onemocnění.

Böger et al. (1998) naměřili významně vyšší hladiny ADMA u pacientů s hypercholesterolemií, plazmatická koncentrace SDMA se u těchto pacientů od kontrolní skupiny zdravých jedinců nelišila. Zvýšení plazmatické koncentrace ADMA mělo u těchto pacientů za následek nižší poměr Arg/ADMA. Byla také nalezena pozitivní korelace mezi LDL-cholesterolem a ADMA a celkovým cholesterolem a ADMA.

Vzhledem k tomu, že ADMA a L-homoarginin mohou na syntézu NO a kardiovaskulární onemocnění působit antagonisticky, může při predikci kardiovaskulárního rizika sloužit poměr hArg/ADMA jako užitečnější nástroj než tyto dva parametry samostatně (Pilz et al., 2015).

2.5.3 ADMA a SDMA u renálních onemocnění

Při renálním selhání je vylučování methylargininů sníženo a ADMA i SDMA se akumuluje v cirkulaci, dochází ke snížení poměru Arg/ADMA a Arg/SDMA. Hladina SDMA se zvyšuje více než ADMA, jejíž koncentrace je snižována aktivitou DDAH. Zvýšení koncentrace ADMA při onemocnění ledvin a snížení poměru Arg/ADMA s následnou inhibicí tvorby NO je příčinou hypertenze, zvýšené aterogeneze a imunitní dysfunkce spojené s renálním onemocněním (Aldámiz-Echevarría and Andrade, 2012; Fleck et al., 2003; Tran et al., 2003). U pacientů s chronickým onemocněním ledvin jsou aterosklerotické vaskulární komplikace hlavní příčinou morbidity a mortality (Busch et al., 2006).

Protože SDMA je metabolicky inaktivní a není substrátem pro DDAH, koreluje se sníženou renální funkcí více. Relativní nárůst intracelulárního SDMA může být nápadnější než nárůst ADMA, což vede ke snížení poměru ADMA/SDMA (Teerlink et al., 2009). Některé studie ukazují velmi těsnou korelaci mezi sérovým kreatininem, glomerulární filtrací a SDMA, naznačující, že SDMA může sloužit jako dobrý ukazatel renálních funkcí (Bode-Böger et al., 2006).

2.6 Metody stanovení ADMA a SDMA

Asymetrický a symetrický dimethylarginin jsou nejčastěji stanovovány separačními chromatografickými metodami, hlavně kapalinovou chromatografií. Základní metodou stanovení ADMA a SDMA je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) v různých modifikacích, lišících se hlavně úpravou vzorku a způsobem detekce. Další možností stanovení je plynová chromatografie nebo elektromigrační metody. Často se používají také metody imunochemické.

2.6.1 Kapalinová chromatografie s UV a fluorescenční detekcí

Metody využívající detekci v UV oblasti při 200 nm pracují bez derivatizace vzorku. Tyto metody však nejsou dostatečně citlivé, protože koncentrace ADMA a SDMA je v lidské plazmě více než stokrát nižší než koncentrace L-argininu a některých dalších aminokyselin (Lluch et al., 2004; MacAllister et al., 1996).

Více rozšířené jsou metody HPLC využívající prekolonovou derivatizaci a fluorescenční detekci. Derivatizace působí nejen zvýšení citlivosti metody, ale i změnu chromatografického chování vzorku (Teerlink, 2007).

Jelikož nebyla popsána selektivní činidla pro derivatizaci L-argininu a jeho methylderivátů, je třeba vzorek upravit, nejčastěji extrakcí na pevné fázi (SPE) (Teerlink, 2007). Extrakce spočívá v iontové výměně na katexových kolonkách, využívajících bazických vlastností L-argininu a jeho methylovaných derivátů. Při čištění dochází k odstranění většiny balastních látek a složek matrice vzorku, včetně kyselých a neutrálních aminokyselin. Výhodou postupu extrakce na SPE kolonkách je také možnost zakoncentrování stanovovaných analytů ve vzorku.

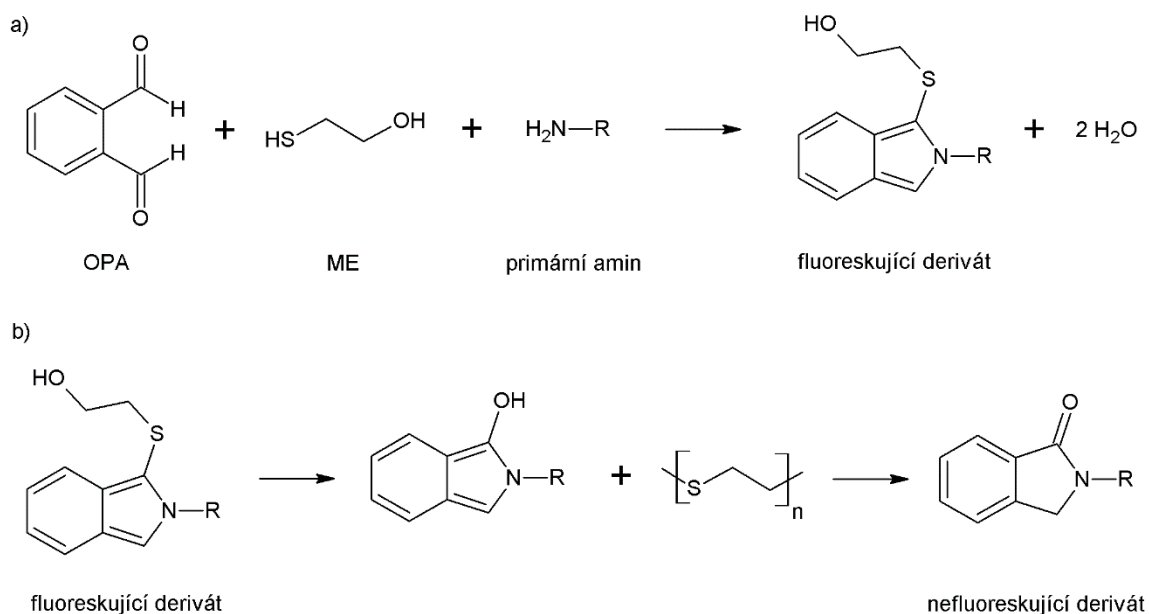
Zhang & Kaye (2004) použili pro čištění vzorků srážení ethanolem s následnou lyofilizací. To jim umožňovalo spolu s L-argininem a jeho methylovanými deriváty stanovovat také L-citrulin, což při čištění vzorků pomocí SPE není možné.

Při derivatizaci dochází ke vzniku aduktů analytu s derivatizačním činidlem, které lze stanovit citlivějším fluorescenčním detektorem. Zároveň se zvyšuje hydrofobnost analytu s možností použití HPLC na reverzních fázích. Nejčastěji se využívá derivatizace *ortho*-ftaldialdehydem (OPA) (Teerlink, 2007).

Derivatizace pomocí OPA není selektivní, reagují všechny sloučeniny s α -amino-skupinou. Reakce primárních aminů s OPA vyžaduje přítomnost thiolové skupiny a

poskytuje fluoreskující izoindolové deriváty (Obr. 8a), které však podléhají spontánnímu přesmyku za vzniku nefluoreskujících derivátů (Obr. 8b) (Goto, 1990).

Pro reakci potřebnou thiolovou skupinu poskytuje ethanthiol, 3-merkaptopropanol, častěji 2-merkptoethanol (ME), 3-merkaptopropionová kyselina (MPA) nebo *N*-acetyl-L-cystein (Goto, 1990; Teerlink, 2007). Na Obr. 9 jsou znázorněny adukty L-argininu a jeho derivátů s OPA a 3-merkaptopropionovou kyselinou.



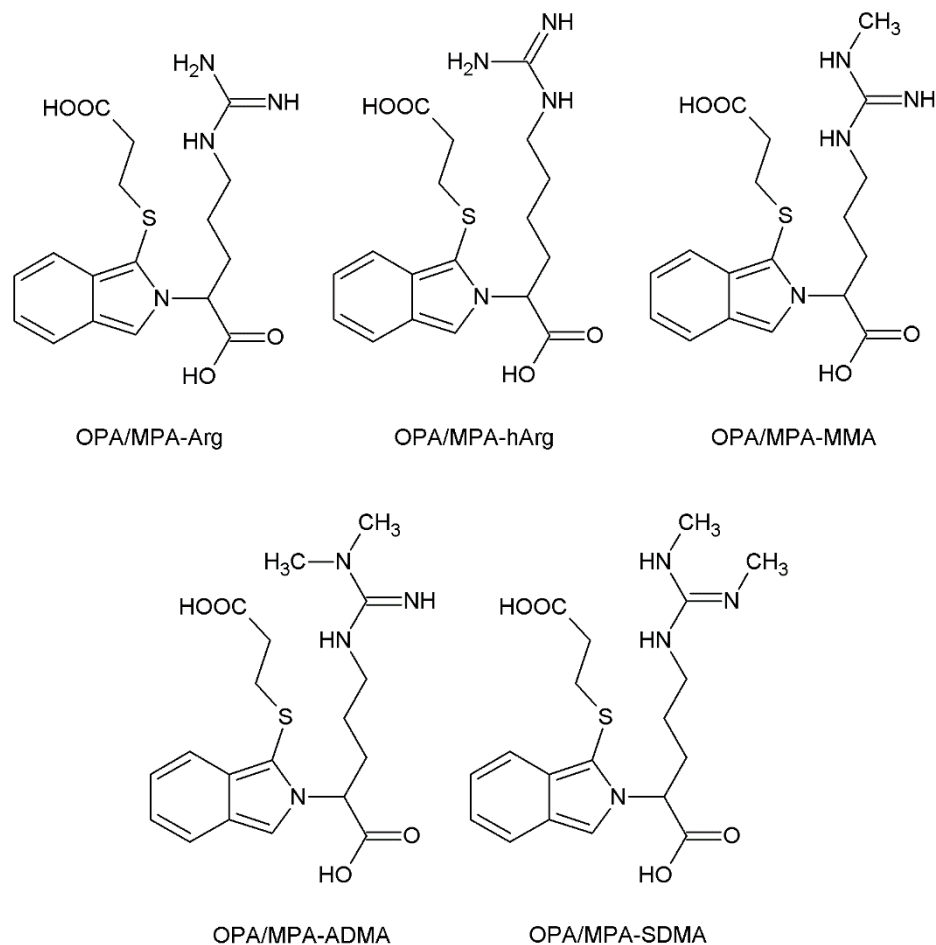
Obr. 8: Derivatizace primárních aminů s *ortho*-ftaldialdehydem.

a) derivatizační reakce a vznik fluoreskujícího derivátu, b) spontánní přesmyk na nefluoreskující derivát. OPA – *ortho*-ftaldialdehyd, ME – 2-merkptoethanol

Derivatizace probíhá velmi rychle při pokojové teplotě a samotné činidlo nevykazuje fluorescenci, chromatogram je relativně čistý (Teerlink, 2007). Nevýhodou OPA derivátů je jejich krátká časová stabilita. Často používaná 3-merkaptopropionová kyselina poskytuje oproti 2-merkptoethanolu stabilnější deriváty, které jsou také vzhledem k přítomnosti další karboxylové skupiny polárnější (Marra et al., 2003; Teerlink, 2007).

Byla popsána i jiná derivatizační činidla se stabilnějšími deriváty nebo lepší separací analytů, např. naftalen-2,3-dikarboxaldehyd (Heresztyn et al., 2004; Marra et al., 2003; Teerlink, 2007), 6-aminochinolyl-*N*-hydroxysukcinimidyl karbamát (Heresztyn et al., 2004; Jones et al., 2010; Teerlink, 2007), 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (Teerlink, 2007) nebo fenylozothiokyanát (Pi et al., 2000; Teerlink, 2007). Přesto zůstává nejpoužívanějším derivatizačním činidlem OPA.

Vzhledem k podobnému chemickému a fyzikálnímu chování a nízké plazmatické koncentraci se při stanovení derivátů L-argininu pomocí HPLC jako interní standard nejčastěji používá monomethylarginin (Teerlink, 2007). Pro svoji vysokou intracelulární koncentraci však MMA není příliš vhodný u tkáňových vzorků, proto je v takovém případě lépe volit L-homoarginin (Pi et al., 2000; Teerlink, 2007). Jako interní standard lze také použít propylarginin (Teerlink, 2007) nebo monoethylarginin (Blackwell et al., 2007).



Obr. 9: OPA/MPA adukty derivátů L-argininu.

OPA – *ortho*-ftaldialdehyd, MPA – 3-merkaptopropionová kyselina, Arg – L-arginin, hArg – L-homoarginin, MMA – monomethylarginin, ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin,

2.6.2 Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

V poslední době neustále roste spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem (LC-MS). Tento detektor je specifitější a citlivější než fluorimetrická

detekce derivatizovaného vzorku (Martens-Lobenhoffer & Bode-Böger, 2007). Časté je také tandemové uspořádání hmotnostní detekce, metoda MS/MS.

Při LC-MS lze vynechat derivatizaci a čištění vzorku extrakcí na SPE kolonkách, obvykle stačí pouze vysrážení proteinů pomocí organického rozpouštědla a jeho odpaření. Běžně se k precipitaci používá acetonitril, kyselina sulfosalicylová nebo směs acetonitril-methanol (Davids et al., 2012; Martens-Lobenhoffer & Bode-Böger, 2007). Při přípravě vzorků lze použít také ultracentrifugaci (Saigusa et al., 2011).

Některé metody využívající MS také pracují s derivatizací vzorku, používá se např. 1-butanol, který esterifikuje karboxylové skupiny za vzniku butylesterů stanovovaných analytů, nebo derivatizace OPA (Martens-Lobenhoffer & Bode-Böger, 2007).

Kvantitativní analýzu při stanovení hmotnostní spektrometrií mohou u komplexních biologických vzorků ohrozit tzv. matricové efekty. Efektivním způsobem, jak minimalizovat tyto jevy, je použití stabilním izotopem značených interních standardů. Ke standardizaci lze využít komerčně dostupné izotopy (Martens-Lobenhoffer & Bode-Böger, 2007, 2012).

Metodami LC-MS lze provést stanovení L-argininu a jeho derivátů v séru, moči i vzorcích tkáně. Vzhledem k tomu, že není třeba upravovat vzorek SPE extrakcí, je možné při jedné analýze spolu s L-argininem, MMA, ADMA, SDMA a L-homo-argininem současně stanovovat také L-citrulin nebo kreatinin (Martens-Lobenhoffer & Bode-Böger, 2007; Saigusa et al., 2011).

2.6.3 Plynová chromatografie (GC)

L-Arginin a jeho deriváty lze také stanovit plynovou chromatografií. Používá se ve spojení s hmotnostním detektorem (GC-MS). Vzorky je nutné před vlastním chromatografickým dělením upravit derivatizací. Hlavními důvody derivatizace je potlačení polárního charakteru L-argininu a jeho derivátů a převedení analytů na těkavé sloučeniny.

Stanovení L-argininu a methylargininů popsali Tsikas et al. (2003). Derivatizace probíhá ve dvou krocích, nejprve vznikají esterifikací karboxylové skupiny methanolem v kyselém prostředí methylestery, následuje acylace aminoskupiny s anhydridem pentafluoropropionové kyseliny (PFPA) za vzniku těkavých amidů pentafluoropropionové kyseliny. Vzorky plazmy byly upraveny ultracentrifugací.

Stejný postup derivatizace methanolem a PFPA použili i Albsmeier et al. (2004). U vzorků plazmy byla před derivatizací provedena precipitace acetonem, tkáňové supernatanty byly vyčištěny extrakcí na SPE kolonkách.

K standardizaci lze využít komerčně dostupné izotopy. Albsmeier využil jako interní standard izotopicky značený ADMA vyrobený v laboratoři. Metody GC-MS jsou využívány pro stanovení v plazmě, tkáních a v moči (Albsmeier et al., 2004; Tsikas et al., 2003).

2.6.4 Kapilární elektroforéza (CE)

Kapilární elektroforéza (CE) patří k elektromigračním metodám s velmi ostrým dělením jednotlivých píků. Pro měření nízkých koncentrací argininových derivátů je nutné použít kapilární elektroforézu s laserem indukovanou fluorescencí (CE-LIF).

Caussé et al. (2000) popsali metodu rychlého stanovení L-argininu a methylargininů pomocí CE-LIF, derivatizací fluorescein-5-isothiokyanátem (FITC) a s homoargininem jako interním standardem. Derivatizace FITC probíhala dlouhou dobu. Při analýze v alkalickém prostředí (pH pufru musí mít hodnotu vyšší než 9,5) jsou migrační časy analytů poměrně krátké, okolo deseti minut (Caussé et al., 2000).

Také Trapp et al. (2004) použili kapilární elektroforézu, k derivatizaci vzorku však zvolili jiné činidlo, 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan.

Vzorky pro stanovení není třeba upravovat extrakcí, jsou pouze deproteinovány. Rozlišení píků ADMA a SDMA však není vždy dokonalé, velmi záleží na složení, iontové síle a pH dělicího pufru. Pracuje se v alkalickém prostředí (Caussé et al., 2000; Trapp et al., 2004).

2.6.5 Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC)

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) je metoda kombinující kapilární elektroforézu a chromatografii. K dělení dochází v elektrolytu s přidaným vhodným tensidem, který vytváří micely, tzv. pseudostacionární fázi. Pomocí fluorescenčního derivatizačního činidla je zajištěn nízký detekční limit stanovení.

Metodu micelární elektrokinetické chromatografie s laserem indukovanou fluorescencí (MEKC-LIF) použili pro stanovení L-argininu a jeho methylderivátů Trapp et al. (2004). Jako surfaktant slouží deoxycholát. Přidání deoxycholátu umožní separaci

nitrobenzafurazanových derivátů L-argininu a methylargininů s vysokým rozlišením, ale čas separace je výrazně delší než u CE (Trapp et al., 2004).

2.6.6 Enzymová imunoanalýza na imunosorbentech (ELISA)

Snaha o dostupné a rychlé stanovení ADMA vedla Schulze et al. (2004) k vývoji nové ELISA metody. Pro stanovení použili mikrotitrační destičku s jamkami potaženými ADMA vázaným na albumin, acylační činidlo *N*-hydroxysukcinimido-karbonovou kyselinu v dimethylformamidu, králičí anti-*N*-acyl-ADMA antisérum a enzymový konjugát křenové peroxidasy s anti-králičím IgG. Pro vytvoření imunogenu pro imunizaci králíků navázali ADMA na kyselinu jantarovou a následně na bovinní sérový albumin.

Stanovení dimethylargininů metodou ELISA je založeno na kompetitivním principu a je u obou analytů obdobné. Lze rozdělit na acylační reakci a vlastní imunochemickou reakci. ADMA ve vzorku po acylaci soutěží s *N*-acyl-ADMA (obdobně SDMA soutěží s *N*-acyl-SDMA) vázaným na pevnou fázi mikrotitrační destičky o přidanou králičí protilátku proti ADMA (SDMA). Po ustavení rovnováhy se odstraní volný antigen a nenavázaný komplex antigen-protilátka. Protilátka v komplexu na vázaném antigenu reaguje s anti-králičí IgG protilátkou označenou křenovou peroxidasou. Přidáním substrátu obsahujícího peroxid vodíku a tetramethylbenzidin vzniká zbarvení, jehož intenzita se po zastavení reakce okyselením měří fotometricky. Intenzita zbarvení je nepřímo úměrná koncentraci ADMA nebo SDMA ve vzorku (*ADMA ELISA: Instruction for use*, 2011, *SDMA ELISA: Instruction for use*, 2016; Široká et al., 2007).

Metody ELISA na mikrotitračních destičkách se hodí na stanovení velkých sérií vzorků v klinických studiích. Výhodou je kromě možnosti zpracování většího počtu vzorků najednou také potřeba malých objemů vzorku i reagensů. U metody ELISA lze v literatuře nalézt rozdílné názory na srovnání s HPLC metodami s různým provedením. Pro stanovení je dostupných jen několik komerčních ELISA souprav (Schulze et al., 2004; Široká et al., 2007; Valtonen et al., 2005).

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo zavedení metody stanovení asymetrického a symetrického dimethylargininu pomocí HPLC s fluorescenční detekcí. Práce byla rozdělena na několik dílčích cílů:

- zavedení metody s použitím standardních látek a její optimalizace,
- použití metody s reálnými vzorky a optimalizace přípravy vzorků,
- porovnání zavedené metody s metodou ELISA.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Použitý materiál a chemikálie

4.1.1 Použité chemikálie

N^G, N^G -Dimethyl-L-arginin dihydrochlorid ≥ 98 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),

$N^G, N^{G'}$ -dimethyl-L-arginin di(*p*-hydroxyazobenzen-*p'*-sulfonát) ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),

L-homoarginin hydrochlorid ≥ 98 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),

N^G -methyl-L-arginin acetát ≥ 98 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),

L-arginin hydrochlorid ≥ 98 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),

ortho-ftaldialdehyd p.a. (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),

3-merkaptopropionová kyselina ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),

acetonitril pro HPLC (VWR International, Radnor, PA, USA),

methanol p.a. (VWR International, Radnor, PA, USA),

hydrogenfosforečnan draselný trihydrát p.a. (VWR International, Radnor, PA, USA),

dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý pro HPLC (VWR International, Radnor, PA, USA),

hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát p.a. (Penta, Chrudim, ČR),

dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p.a. (Penta, Chrudim, ČR),

kyselina chlorovodíková 35% p.a. (Penta, Chrudim, ČR),

hydroxid sodný p.a. (Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové, ČR),

amoniak vodný roztok (min. 25 %) p.a. (Lachema, Brno, ČR),

chlorid sodný p.a. (Lachema, Brno, ČR),

chlorid draselný p.a. (Lachema, Brno, ČR),

kyselina boritá p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR).

4.1.2 Použitý materiál a soupravy

SPE kolonky Oasis MCX 1 ml (30 mg) Extraction Cartridges (Waters Corp., Milford, MA, USA),

SPE kolonky Oasis MCX 6 ml (150 mg) Extraction Cartridges (Waters Corp., Milford, MA, USA),

chromatografická kolona ACE Equivalence 5 μm C18 Column, 150 \times 4,6 mm (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Scotland, UK),
ochranné předkolony ACE Equivalence 5 C18 Guard Cartridges (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Scotland, UK),
nylonové filtry Nylon filter membranes 0,45 μm , 47 mm (Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
injekční filtry Minisart RC4 Syringe Filter 0,20 μm (Sartorius, Göttingen, Německo),
ADMA ELISA (DLD Diagnostika, Hamburg, Německo),
SDMA ELISA (DLD Diagnostika, Hamburg, Německo).

4.1.3 Použité přístroje

Kapalinový chromatograf Thermo Separation Products SpectraSYSTEM: odplyňovač SCM 1000, pumpa P 2000, automatický dávkovač AS 3000, UV detektor UV 2000, fluorescenční detektor FL 3000, řídicí jednotka SN 4000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA),
automatický analyzátor na zpracování mikrotitračních destiček NexGen Four (Adaltis, Guidonia di Montecelio, Itálie).

4.1.4 Použitý software

ChromQuest 2.51 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA),
MS Excel 2016 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA),
MedCalc 17.7.2 (MedCalc Software, Ostend, Belgie).

4.1.5 Ostatní použitý materiál, přístroje a pomůcky

Filtrační systém na filtraci roztoků pro chromatografii, vakuový SPE manifold, vakuová pumpa, stlačený plynný dusík, suchý termostat, ultrazvuková vodní lázeň, orbitální třepačka.

4.1.6 Použité pufrы

0,5 mol l^{-1} K-fosfátový pufr, pH 6,5: Pufr byl připraven ze dvou zásobních roztoků: A – 0,5 mol l^{-1} hydrogenfosforečnan draselný, B – 0,5 mol l^{-1} dihydrogenfosforečnan draselný. Zásobní roztok A byl připraven rozpuštěním 57,05 g $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ v 500 ml

redestilované vody, zásobní roztok B rozpuštěním 68 g KH_2PO_4 v 1 000 ml redestilované vody. Pracovní roztok se skládá z 33 ml zásobního roztoku A a 67 ml zásobního roztoku B. Připravený pufr byl uchováván v chladničce.

0,1 mol l^{-1} Na-fosfátový pufr, pH 7,0: Pufr byl připraven ze dvou zásobních roztoků: A – 0,2 mol l^{-1} hydrogenfosforečnan sodný, B – 0,2 mol l^{-1} dihydrogenfosforečnan sodný. Zásobní roztok A byl připraven rozpuštěním 7,1629 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ve 100 ml redestilované vody, zásobní roztok B rozpuštěním 3,1202 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ v 100 ml redestilované vody. Pracovní roztok se skládá z 30,5 ml zásobního roztoku A a 19,5 ml zásobního roztoku B a doplní se do 100 ml redestilovanou vodou. Připravený pufr byl uchováván v chladničce.

0,2 mol l^{-1} borátový pufr, pH 9,5: Pufr byl připraven ze dvou zásobních roztoků: A – 0,2 mol l^{-1} kyselina boritá + 0,2 mol l^{-1} chlorid draselný, B – 0,2 mol l^{-1} hydroxid sodný. Zásobní roztok A byl připraven rozpuštěním 1,237 g H_3BO_3 a 1,491 g KCl ve 100 ml redestilované vody, zásobní roztok B rozpuštěním 0,8 g NaOH ve 100 ml redestilované vody. Pracovní roztok obsahuje 50 ml zásobního roztoku A a 30 ml zásobního roztoku B. Připravený pufr byl uchováván v chladničce.

4.2 Příprava roztoků

4.2.1 Mobilní fáze

Mobilní fáze A se skládá z 50 mmol l^{-1} K-fosfátového pufru pH 6,5 s 8,7 % acetonitrilu (ACN): Byla připravena ze 100 ml 0,5 mol l^{-1} K-fosfátového pufru pH 6,5, zředěna redestilovanou vodou na objem cca 800 ml, přidalo se 87 ml ACN a doplnilo redestilovanou vodou na 1 000 ml. Připravená mobilní fáze byla vakuově filtrována přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,45 μm a v ultrazvukové lázni při 40 °C po dobu 15 minut bylo provedeno odplynění.

Mobilní fáze B se skládá z ACN a redestilované vody v poměru 50/50 (v/v). Připravená mobilní fáze byla vakuově filtrována přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,45 μm a v ultrazvukové lázni při 40 °C po dobu 15 minut bylo provedeno odplynění.

Obě zásobní mobilní fáze byly uchovávány v chladničce.

4.2.2 Standardy

Zásobní standardní roztoky L-argininu, L-homoargininu, ADMA, SDMA a MMA byly připraveny o koncentraci 1 mmol l^{-1} v 10 mmol l^{-1} HCl, rozděleny do mikrozkušavek a zamraženy na $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Kalibrační roztoky ADMA a SDMA byly připraveny ze zásobních standardních roztoků naředěním 10 mmol l^{-1} HCl na finální koncentrace jednotlivých kalibrátorů: 0,125; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 a $3 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ pro ADMA a 0,125; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4 a $5 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ pro SDMA. Každý kalibrační roztok obsahoval $20 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ MMA.

Pracovní směsný standard byl připraven ze zásobních standardních roztoků naředěním 10 mmol l^{-1} HCl na koncentrace jednotlivých složek: L-arginin $50 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$, MMA $20 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$, L-homoarginin $2 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$, ADMA $1 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ a SDMA $1 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$. Alikvoty pracovního směsného standardu v mikrozkušavkách byly uchovávány při teplotě $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Interní standard MMA (IS) byl připraven ze zásobního standardního roztoku monomethylargininu naředěním 10 mmol l^{-1} HCl na koncentraci $40 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$. Alikvoty interního standardu v mikrozkušavkách byly uchovávány při $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.3 Roztoky pro SPE

PBS pH 7,0 se skládá z 10 mmol l^{-1} Na-fosfátového pufru pH 7,0 a 140 mmol l^{-1} chloridu sodného. Byl připraven z 50 ml $0,1 \text{ mol l}^{-1}$ Na-fosfátového pufru pH 7,0, přidalo se 4,09 g NaCl a doplnilo do 500 ml redestilovanou vodou. Připravený PBS pufr byl uchováván v chladničce.

Promývací roztok HCl byl 100 mmol l^{-1} HCl. Promývací roztok byl uchováván v chladničce.

Eluční činidlo se skládá z amoniaku, destilované vody a methanolu v poměru 10/40/50 (v/v/v) s přísávkem 0,5 ml 1 mol l^{-1} NaOH na 100 ml elučního činidla. Připravené eluční činidlo bylo uchováváno v chladničce.

4.2.4 Derivatizační činidlo

Derivatizační činidlo se skládá z *ortho*-ftaldialdehydu a kyseliny 3-merkaptopropionové. Navážka 0,05 g *ortho*-ftaldialdehydu byla rozpuštěna v 1 ml methanolu, doplněna 9 ml

0,2 mol l⁻¹ borátového pufru pH 9,5 a bylo přidáno 50 µl 3-merkaptopropionové kyseliny. Alikvoty derivatizačního činidla v mikrozkušavkách byly uchovávány při -80 °C.

4.3 Biologické vzorky

Vzorky krve byly odebrány do zkumavek s heparinátlem lithným. Plazma byla získána standardním způsobem centrifugací při 2 170 g po dobu 8 minut při 4 °C a rozdělena do mikrozkušavek na více alikvotů, které byly uchovány až do analýzy při -80 °C.

Výběr vzorků byl proveden podle zdravotní historie jedinců tak, aby zahrnoval různé vysoké očekávané koncentrace ADMA a SDMA.

Pro kontrolu kvality byla použita směsná plazma od 10 dobrovolníků. Plazma od všech dobrovolníků byla homogenizována a rozdělena do alikvotů v mikrozkušavkách, které byly uchovávány při -80 °C.

4.4 Stanovení argininu a jeho derivátů metodou HPLC

Arginin, ADMA a SDMA byly měřeny metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s předkolonovou derivatizací *ortho*-ftaldialdehydem a detekcí fluorescenčním detektorem. Vzorky plazmy byly zbaveny balastních látek extrakcí na SPE kolonkách.

4.4.1 Příprava vzorku

Pro extrakci na pevné fázi byly použity SPE kolonky Oasis MCX firmy Waters. Před extrakcí na kolonce se vzorek plazmy nejprve naředil PBS. Ke 200 µl plazmy bylo přidáno 100 µl interního standardu a doplnilo se 700 µl PBS pufru na 1 ml.

Příprava SPE kolonky před nanesením vzorku byla provedena nejprve promytím 1 ml methanolu (kondicionace), následovaným 1 ml PBS (ekvilibrace kolonky). Na takto připravenou SPE kolonku byl nanesen 1 ml PBS pufrem ředěného vzorku s IS. Následovalo vymývání balastních látek nejprve 1 ml 100 mmol l⁻¹ HCl, poté 1 ml methanolu. Eluce byla provedena do čistých skleněných zkumavek elučním činidlem složení amoniak : voda : methanol v poměru 10/40/50 (v/v/v) s přísadkem 0,5 ml 1 mol l⁻¹ NaOH na 100 ml elučního činidla.

SPE extrakcí získaný eluát byl odpařen při teplotě 60–80 °C dosucha pod horkým dusíkem. Odparek byl rozpuštěn ve 200 µl 10 mmol l⁻¹ HCl a celý objem zfiltrován na

injekčním filtru o velikosti pórů 0,2 μm . Finální koncentrace IS ve filtrátu rekonstituovaného vzorku byla 20 $\mu\text{mol l}^{-1}$.

4.4.2 Derivatizace

Pro vlastní reakci s OPA/MPA derivatizačním činidlem bylo do mikrozkušavky odměřeno 40 μl filtrátu vzorku a přidáno 40 μl derivatizačního činidla. Po intenzivním promíchání a inkubaci 5 minut byla reakční směs pipetována do vialky a vložena do dávkovacího zařízení HPLC chromatografu a přesně 10 minut od smíchání vzorku a derivatizačního činidla byla spuštěna analýza. Každý den analýzy byl rozmražen a použit čerstvý alikvot derivatizačního činidla, který byl uchováván v temnu v chladničce.

4.4.3 Chromatografie

K chromatografickému dělení na kapalinovém chromatografu Thermo Separation Products SpectraSYSTEM byla použita chromatografická kolona ACE Equivalence s C18 sorbentem o velikosti částic 5 μm o délce 15 cm a průměru 4,6 mm s ochrannou předkolonou.

Nástřik derivatizovaného vzorku na kolonu byl 10 μl . Separace byla izokratická, 100 % mobilní fáze A o průtoku 1,10 ml/min při 33 °C. Po eluci všech analytů byla mobilní fáze přeprnuta na 100 % B a průtok zvýšen na 1,15 ml/min, kvůli vymytí silně zadržovaných komponent. Následoval gradient mobilní fáze B od 100 % do 0 % a pokračovalo se 100 % mobilní fáze A o průtoku 1,10 ml/min (ekvilibrace kolony před dalším nástřikem vzorku).

Fluorescence byla měřena při excitační vlnové délce 342 nm a emisní vlnové délce 520 nm a 450 nm. Podmínky separace a detekce jsou přehledně shrnuty v Tab. 1.

Tab. 1: Podmínky separace a detekce.

Čas (min)	MP A (%)	MP B (%)	Průtok (ml/min)	λ excitace (nm)	λ emise (nm)
0–12,0	100	0	1,10	342	520
12,1–22,0	100	0	1,10	342	450
22,1–25,0	0	100	1,15	342	520
25,1–30,0	0<100	100>0	1,10	342	520
35,1–40,0	100	0	1,10	342	520

MP A – mobilní fáze A, MP B – mobilní fáze B

Celková doba separace byla 40 minut. Píky byly kvantifikovány určením plochy pod křivkou (AUC), respektive plochy pod křivkou analytu vztažené na plochu pod křivkou interního standardu (AUC/IS) v ovládacím programu chromatografu ChromQuest.

4.4.4 Kalibrace

Určení koncentrace jednotlivých analytů ve vzorcích bylo provedeno metodou porovnání s jedním externím standardem s použitím metody interního standardu. Pro určení koncentrací argininu a jeho derivátů ve vzorku byl použit směsný standard o koncentraci jednotlivých složek: Arg 50 $\mu\text{mol l}^{-1}$, MMA 20 $\mu\text{mol l}^{-1}$, hArg 2 $\mu\text{mol l}^{-1}$, ADMA 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$ a SDMA 1 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Jako interní standard pro vzorky plazmy byl použit MMA o koncentraci 40 $\mu\text{mol l}^{-1}$.

4.4.5 Validace

Linearita u ADMA a SDMA nebyla ověřována v celém rozsahu, ale jen v rozsahu koncentrací končícím nad maximální očekávanou koncentrací ADMA a SDMA ve vzorku. Byly proměřeny kalibrační roztoky s kalibračními body 0,125; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 a 3 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro ADMA a 0,125; 0,25; 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4 a 5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro SDMA. Každý kalibrační roztok obsahoval 20 $\mu\text{mol l}^{-1}$ MMA. Kalibrační křivka byla sestrojena vynesemím poměrů AUC píků jednotlivých analytů ku AUC interního standardu MMA a koncentrací jednotlivých kalibračních roztoků do grafu. Data byla podrobena regresní analýze a byly získány hodnoty směrnice, interceptu a koeficientu determinance.

Preciznost stanovení byla určena za podmínek opakovatelnosti z 6 měření směsné plazmy během jednoho dne a jako mezilehlá preciznost z 20 měření směsné plazmy v různých dnech. Směsná plazma byla uchovávána při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a každý den byl použit čerstvý alikvot. Preciznost byla vyjádřena jako variační koeficient v %.

Návratnost byla ověřena na směsné plazmě se standardním přídatkem ADMA a SDMA. Vzorek bez přídatku a s přídatkem ADMA a SDMA prošel SPE extrakcí. Relativní návratnost byla vypočítána jako procentuální poměr mezi rozdílem koncentrace vzorku s přídatkem a koncentrace vzorku bez přídatku ku koncentraci standardního přídatku. Absolutní návratnost byla vypočítána jako procentuální poměr rozdílu AUC/IS vzorku s přídatkem a AUC/IS vzorku bez přídatku ku AUC/IS odpovídajícímu koncentraci standardního přídatku přímo dávkovaného na kolonu bez SPE extrakce.

Limit detekce a limit kvantifikace ADMA a SDMA nebyly určovány. Jako měřicí rozsah byl brán interval koncentrací vymezený nejnižším a nejvyšším kalibračním roztokem.

4.5 Stanovení ADMA a SDMA metodou ELISA

ADMA a SDMA byly stanoveny kompetitivní metodou ELISA soupravami firmy DLD diagnostika. Test byl proveden přesně podle instrukcí v příbalové dokumentaci soupravy. První část testu, acylace vzorku, byla provedena manuálním zpracováním, vlastní imunochemické stanovení bylo provedeno automatickým analyzátozem pro zpracování mikrotitračních destiček NexGen Four.

4.6 Statistika

Pro jednodušší statistické výpočty a analýzu dat byly použity statistické nástroje programu MS Excel, porovnání metod HPLC a ELISA bylo zpracováno ve statistickém programu MedCalc.

5 VÝSLEDKY A DISKUSE

5.1 Zavedení metody HPLC

Základem pro experimentální část zavedení HPLC metody pro stanovení asymetrického a symetrického dimethylargininu byla práce Teerlinka et al. (2002), kterou jsme částečně modifikovali a přizpůsobili našim podmínkám a možnostem sestavy našeho HPLC kapalinového chromatografu.

5.1.1 Chromatografická separace

Pro chromatografickou separaci jsme použili chromatografickou kolonu ACE Equivalence s reverzní C18 stacionární fází (oktadecylsilikagel) a endcappingem volných sialových skupin a ochrannou předkolonu ACE Equivalence 5 C18 Guard Cartridge. Velikost částic sorbentu je 5 μm , délka kolony 15 cm, průměr 4,6 mm. Použité mobilní fáze a rychlost průtoku systémem byly stejné jako u Teerlinka.

K identifikaci píků a určení retenčních časů L-argininu a jeho derivátů jsme použili standardní roztoky L-argininu, MMA, L-homoargininu, ADMA a SDMA, které jsme stanovovali izolovaně. Retenční časy za našich podmínek separace jsou oproti původní Teerlinkově metodě o trochu delší. Tab. 2 přehledně shrnuje retenční časy L-argininu a jeho derivátů.

Tab. 2: Retenční časy L-argininu a jeho derivátů.

	t_R (min)
L-Arginin	10,1
Monomethylarginin	13,9
L-Homoarginin	15,6
Asymetrický dimethylarginin	18,4
Symetrický dimethylarginin	19,4

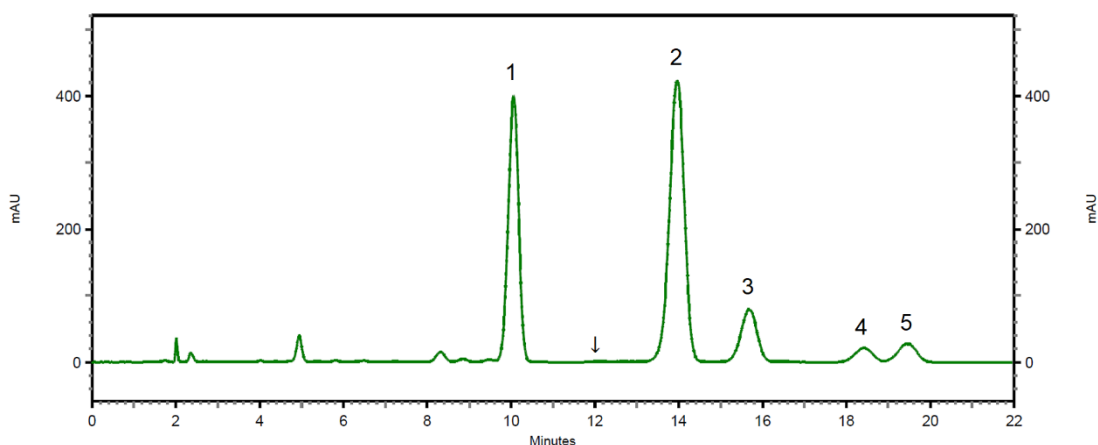
t_R – retenční čas

Teplota kolony při separaci byla 33 °C. Separace za nižší teploty 30 °C jako u Teerlinka nebyla možná, protože jsme v našich podmínkách nemohli zamezit jejímu nárůstu a zajistit tak stabilní teplotu po celou dobu separace.

Na použitém chromatografickém systému nelze během analýzy měnit citlivost detektoru. Vzhledem k rozdílným hodnotám koncentrace L-argininu a dimethylovaných

derivátů ADMA a SDMA v biologických vzorcích, nebylo možné na vysokou citlivost fluorescenčního detektoru změřit vysoké koncentrace L-argininu, při snížení citlivosti naopak byly plochy píků ADMA a SDMA příliš nízké. Tento problém jsme vyřešili tak, že jsme odezvu fluorescence L-argininu měřili při 520 nm, vlnové délce mimo maximum emisního záření. K přepnutí na vlnovou délku maxima emisního záření (450 nm) pro detekci methylovaných derivátů argininu a opětovnému vynulování základní linie jsme využili dostatečně dlouhé prodlevy mezi retenčním časem L-argininu a retenčním časem interního standardu monomethylargininu.

Po eluci všech analytů, kdy dochází k promytí kolony, jsme opět vlnovou délku emisního záření posunuli mimo maximum, protože se občas stávalo, že došlo k přetížení fluorescenčního detektoru. Při využití našeho nastavení excitace a emise během separace analytů je změna na základní linii velmi malá. Na Obr. 10 je znázorněn chromatografický záznam směsného standardu.



Obr. 10: Chromatogram směsného standardu.

1 – L-arginin ($c = 50 \mu\text{mol l}^{-1}$), 2 – monomethylarginin ($c = 20 \mu\text{mol l}^{-1}$), 3 – L-homoarginin ($c = 2 \mu\text{mol l}^{-1}$), 4 – asymetrický dimethylarginin ($c = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$), 5 – symetrický dimethylarginin ($c = 1 \mu\text{mol l}^{-1}$), šipka ukazuje místo změny vlnové délky pro emisní záření

Kvalitu chromatografické separace jsme vyjádřili jako faktor asymetrie jednotlivých píků, určený jako poměr šířky sestupné části píku ku vzestupné části píku v 10 % výšky píku. Faktory asymetrie píků jednotlivých analytů jsou v Tab. 3. Píky získané separací byly symetrické, bez výrazné deformace tvaru.

Dalším zjišťovaným znakem kvality separace bylo rozlišení ADMA a SDMA. Rozlišení píků jsme určili na základě rozdílu retenčních časů a součtu šířky píků v polovině jejich výšky. Při našich podmínkách separace jsme sice nedosáhli úplného

rozdělení píků obou dimethylargininů na základní linii, přesto bylo rozlišení ADMA a SDMA velmi dobré ($R_{1,2} = 1,36$).

Tab. 3: Faktory asymetrie píků argininu a jeho derivátů.

	A_s píku
L-Arginin	0,96
Monomethylarginin	0,91
L-Homoarginin	0,92
Asymetrický dimethylarginin	1,0
Symetrický dimethylarginin	1,0

A_s – faktor symetrie

Pro určení počtu teoretických pater, počtu efektivních pater, výškového ekvivalentu teoretického patra a redukované výšky teoretického patra, jakožto charakteristik účinnosti chromatografické separace (Tab. 4), bylo ve výpočtech použito šířky píků v polovině jejich výšky u chromatografického záznamu směsného standardu.

Tab. 4: Účinnost separace chromatografické kolony.

	N	N_{ef}	H (μm)	h (μm)
Arg	11 690,043	46 760,172	12,831	2,566
MMA	12 242,455	48 969,820	12,252	2,450
hArg	11 752,717	47 010,868	12,763	2,552
ADMA	12 292,311	49 169,244	12,202	2,404
SDMA	12 542,213	50 168,852	11,960	2,392

Arg – arginin, hArg – homoarginin, MMA – monomethylarginin, ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin, N – počet teoretických pater, N_{ef} – počet efektivních pater, H – výškový ekvivalent teoretického patra, h – redukovaná výška teoretického patra

5.1.2 Příprava vzorků

Asymetrický a symetrický dimethylarginin jsme stanovovali v plazmě získané po centrifugaci vzorků krve odebraných do zkumavek s protisrážlivým činidlem heparinátem lithným. Názory na rozdílné koncentrace v plazmě a séru se v různých studiích poněkud liší. Nelze jednoznačně říci, zda se mohou vzorky séra a plazmy kombinovat. Všechna naše stanovení jsme proto prováděli z heparinové plazmy a případné sérové vzorky jsme ze souboru vyřadili.

Pro extrakci na pevné fázi jsme použili SPE kolonky Oasis MCX s vysokou selektivitou extrakce pro bazické sloučeniny a vysokou stabilitou i při extrémním pH. Stejně SPE kolonky volil i Teerlink, který však na rozdíl od nás kolonky používal přímo, bez kondicionace. Naše příprava kolonky zahrnovala promytí methanolem a PBS. Dalším rozdílem oproti původní metodě byla úprava elučního činidla. Analyty byly z kolonek eluovány elučním činidlem složení amoniak : voda : methanol s přídatkem 1 mol l^{-1} NaOH podle de Jonga a Teerlinka (2006).

Malé množství NaOH přidané do elučního činidla poskytuje přebytek hydroxidových iontů, pomáhající k úplnému odstranění amonných iontů během odpařování vzorku. Bez tohoto přídatku může docházet během derivatizace k reakci zbytkových amonných iontů s derivatizačním činidlem OPA za vzniku fialového nebo hnědého zabarvení (de Jong and Teerlink, 2006).

Tab. 5 ukazuje návratnost ADMA a SDMA po SPE extrakci. Absolutní návratnost je nižší, než byla u Teerlinka, který dosahoval 85 % u obou dimethylargininů. Podobnou návratnost uvedli také Pettersson et al. (1997) a Jones et al. (2010). Naproti tomu Pi et al. (2000) dosáhli absolutní návratnosti jen okolo 70 % u ADMA a 65 % u SDMA. Relativní návratnost je zcela v pořádku mírně přes 100 %.

Tab. 5: Absolutní a relativní návratnosti ADMA a SDMA.

	Absolutní návratnost (%)	Relativní návratnost (%)
ADMA	81,9	104,4
SDMA	75,7	102,6

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

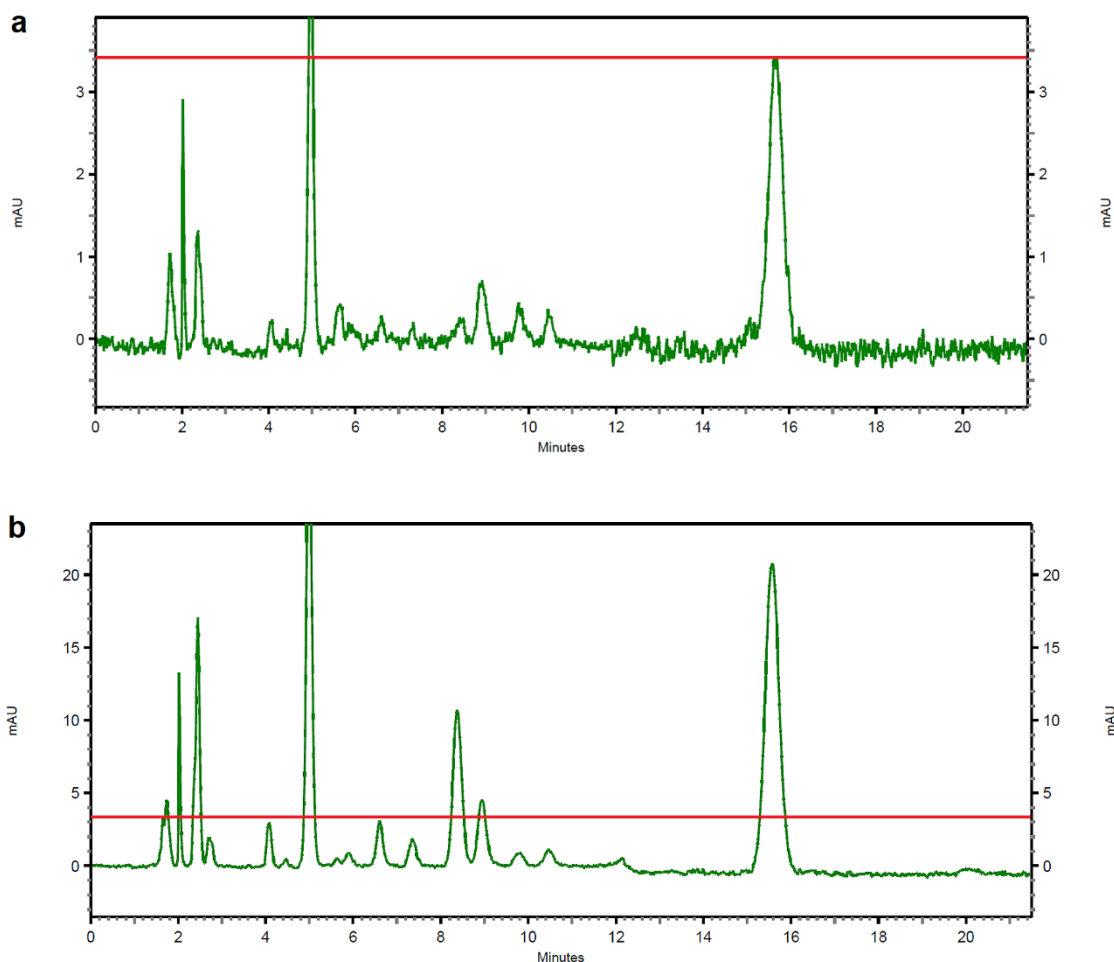
Jelikož jsme pro SPE extrakci použili 200 μl plazmy a 100 μl interního standardu, nedošlo při rozpuštění odparku 200 μl 10 mmol l^{-1} HCl k zakoncentrování vzorku, ale naopak naředění IS. Výsledná koncentrace interního standardu MMA ve vzorku byla 20 $\mu\text{mol l}^{-1}$. Větší objem přečištěného vzorku nám poskytl možnost v případě potřeby derivatizaci a analýzu opakovat.

5.1.3 Derivatizace OPA

Dávkovací zařízení použitého chromatografu neumožňovalo chlazení derivatizovaných vzorků. Při studiu stability derivatizačního činidla OPA/MPA určili Molnár-Perl a Vasánits (1999) jako dobu potřebnou pro proběhnutí derivatizační reakce

u všech analytů ve vzorku nejméně 7 minut. Různou rychlost průběhu derivatizace jsme si ověřili vlastním experimentem, oproti ostatním analytům ve vzorku výrazně zaostával ADMA. Derivatizaci jsme proto prováděli manuálně u každého vzorku přesně 10 minut před spuštěním analýzy a nástřikem na kolonu.

V našich chromatogramech vykazoval občas pík L-homoargininu náznak nepravidelného tvaru. S podobným problémem u vzorků plazmy se setkali i Alkaitis et al. (2016). Nestandardní tvar píku přičkly drobné kontaminaci, pravděpodobně s přispěním SPE extrakce, neidentifikovaným kontaminantem. Při chromatografické analýze samotného derivatizačního činidla jsme zaznamenali přítomnost píku právě v blízkosti retenčního času L-homoargininu (Obr. 11).



Obr. 11: Chromatogram derivatizačního činidla OPA/MPA.

a) chromatogram čerstvého derivatizačního činidla, b) chromatogram 24 hodin starého derivatizačního činidla. Červená linka znázorňuje v obou chromatogramech stejnou hladinu.

Hanczkó et al. (2007) ukázali, že použitelnost OPA derivatizačních činidel je velmi limitovaná jejich stářím a konstatovali, že jimi studované derivatizační činidlo OPA/ET

je po dvou dnech nepoužitelné. Při studiu tohoto derivatizačního činidla zaznamenali značný nárůst autofluorescence v čase způsobený přítomnými nečistotami.

Stejný fenomén jsme zaznamenali i my při analýze samotného derivatizačního činidla OPA/MPA, a to čerstvého a 24 hodin starého, uchovávaného v temnu v chladničce. V oblasti retenčního času L-homoargininu (15,6 min) lze pozorovat nárůst fluorescence v čase a vznik interferujícího píku (Obr. 11).

Tento jev značně snižuje preciznost stanovení a může vést k získání falešně vyšších výsledků. Z tohoto důvodu jsme L-homoarginin vyloučili z hodnocení. Do jaké míry se uplatňuje autofluorescence derivatizačního činidla způsobená nečistotami, SPE extrakce nebo přítomnost nečistot v ostatních použitých roztocích jsme nemohli určit, k tomu by bylo potřeba se problémem zabývat podrobněji.

5.1.4 Analytické vlastnosti metody

Linearita byla ověřována u ADMA a SDMA v rozmezí koncentrací 0,125–3,0 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro ADMA a 0,125–5,0 $\mu\text{mol l}^{-1}$ pro SDMA. Byla provedena lineární regresní analýza a byly získány rovnice regrese a koeficienty determinance (Tab. 6). Obě kalibrační křivky jsou lineární s koeficientem determinance 0,9999.

Tab. 6: Charakteristiky kalibračních přímků ADMA a SDMA.

	Kalibrační rozsah ($\mu\text{mol l}^{-1}$)	Rovnice regrese	Koeficient determinance
ADMA	0,125–3,0	$y = 0,0556x - 0,0011$	0,9999
SDMA	0,125–5,0	$y = 0,0715x + 0,0009$	0,9999

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

Preciznost stanovení L-argininu a jeho derivátů byla určena za podmínek opakovatelnosti ze 6 stanovení směsné plazmy v jeden den a jako mezilehlá preciznost z 20 stanovení směsné plazmy v různé dny (Tab. 7).

Tab. 7: Preciznosti stanovení argininu a jeho derivátů.

	Opakovatelnost CV (%)	Mezilehlá preciznost CV (%)
L-Arginin	1,37	1,53
L-Homoarginin	19,53	26,34
Asymetrický dimethylarginin	4,63	7,18
Symetrický dimethylarginin	4,71	7,75

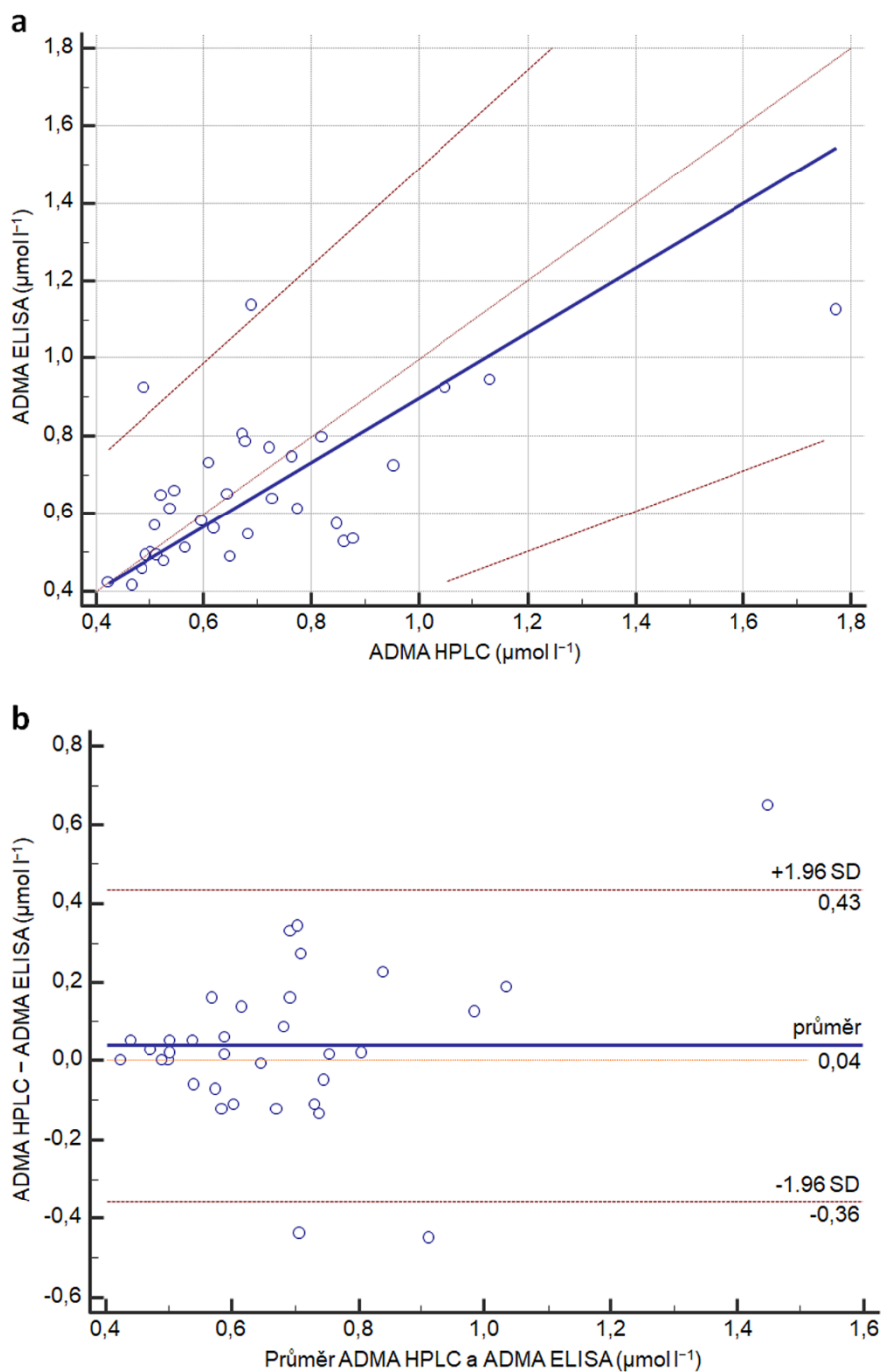
Výsledky vyjádřené jako variační koeficient v procentech jsou slušné a srovnatelné s jinými autory. Jedinou výjimkou je L-homoaginin, jehož preciznost stanovení je ovlivněna interferencí. Teerlink (2007) uvádí přibližné rozmezí běžně dosahované mezilehlé preciznosti 2–10 %.

5.2 Porovnání HPLC a ELISA metody

Zavedenou HPLC metodu jsme porovnali s metodou ELISA jak pro ADMA, tak pro SDMA. Na imunochemické stanovení metodou ELISA byly použity soupravy ADMA ELISA a SDMA ELISA. Výběr vzorků byl proveden tak, aby zahrnoval různě vysoké koncentrace ADMA a SDMA, vzorky byly měřeny v duplikátu.

Pro porovnání metod HPLC a ELISA byla využita Passingova-Bablokova regrese ve statistickém programu MedCalc (Obr. 12 a Obr. 13). Regresní rovnice pro ADMA byla $y = 0,8329 x + 0,0673$, pro SDMA $y = 1,0343 x - 0,0127$. Korelace metody HPLC s ELISA byla vyjádřena Spearmanovým korelačním koeficientem. Pro ADMA u 34 vzorků v koncentračním rozsahu 0,42–1,77 $\mu\text{mol l}^{-1}$ se $r = 0,571$ ($p = 0,0004$), pro SDMA u 30 vzorků v rozmezí koncentrací 0,45–2,63 $\mu\text{mol l}^{-1}$ byl $r = 0,735$ ($p < 0,0001$).

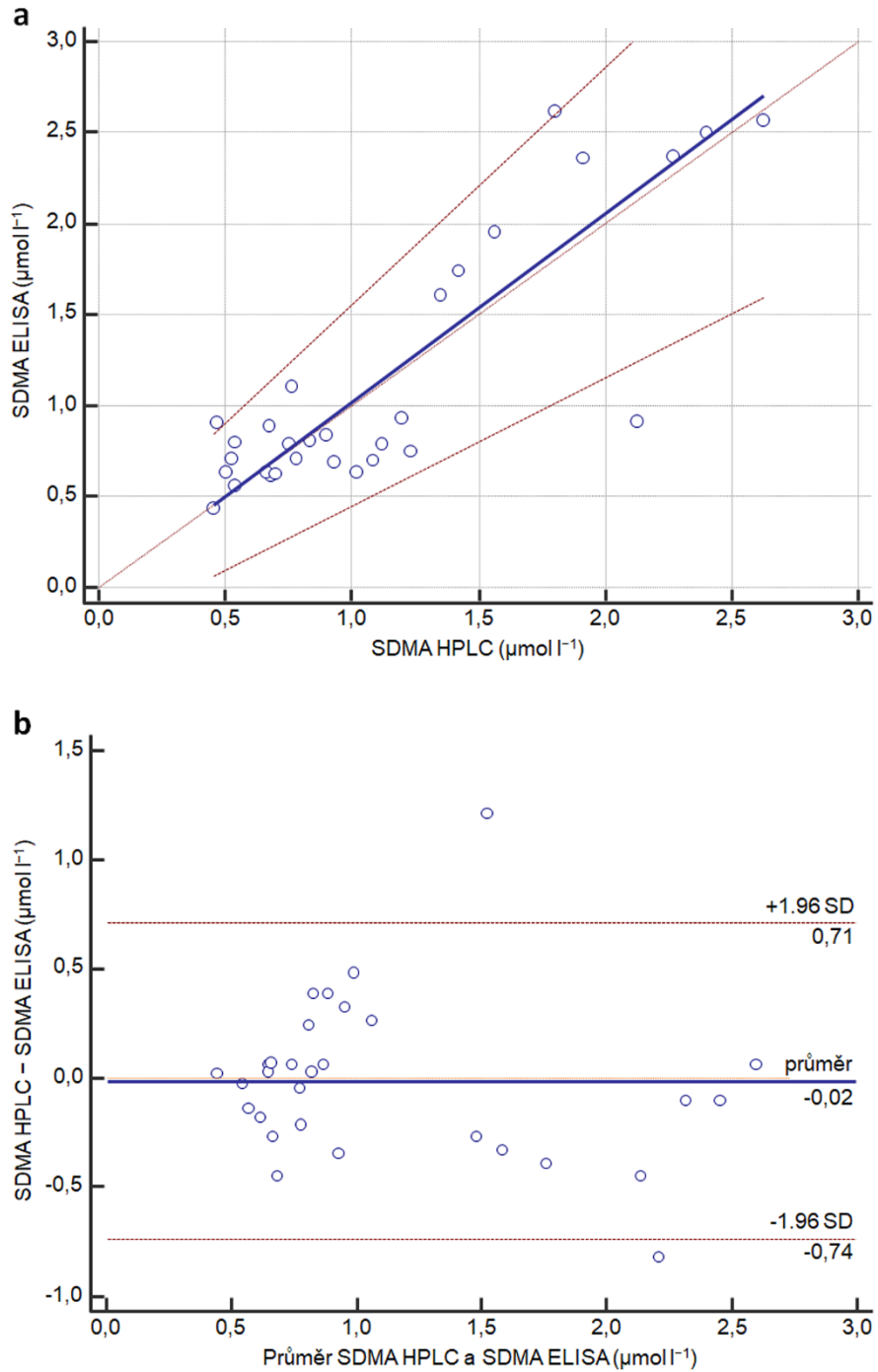
Porovnáním HPLC a ELISA metody jsme prokázali korelaci u ADMA i SDMA (Obr. 12 a Obr. 13). Výsledky porovnání metody HPLC a ELISA se v literatuře poměrně rozcházejí. Schulze et al. (2004) prokázali velmi silnou korelaci mezi metodami LC-MS/MS a GC-MS. Také Šíroková et al. (2007) dosáhli dobrých výsledků u HPLC s fluorescenční detekcí. Naproti tomu Valtonen et al. (2005) neprokázal mezi HPLC s fluorescenční detekcí a metodou ELISA korelaci žádnou. Jako možné vysvětlení uvádí nespecifickou vazbu protilátek v testech ELISA nebo vliv matrice vzorku.



Obr. 12: Porovnání metody HPLC a ELISA u ADMA.

a) bodový diagram s regresní přímkou (modře regresní přímka, čárkovaně interval spolehlivosti),

b) Blandův-Altmanův diagram. $y = 0,8329 x + 0,0673$, $n = 34$, $r = 0,571$, $p = 0,0004$.



Obr. 13: Porovnání metody HPLC a ELISA u SDMA.

a) bodový diagram s regresní přímkou (modře regresní přímka, čárkovaně interval spolehlivosti),

b) Blandův-Altmanův diagram. $y = 1,0343 x - 0,0127$, $n = 30$, $r = 0,735$, $p < 0,0001$.

6 ZÁVĚR

Byla zavedena a optimalizována metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí, která umožňuje stanovení asymetrického a symetrického dimethylargininu v reálných vzorcích lidské plazmy. Výhodou metody je možnost současného stanovení obou analytů, které jsou separovány s velmi dobrým rozlišením. Relativní návratnost stanovovaných dimethylargininů je okolo 100 % a preciznost metody vyjádřená jako mezilehlá preciznost variačním koeficientem je pod 10 % a je srovnatelná s metodami jiných autorů. Byla prokázána korelace mezi metodou HPLC a metodou ELISA.

POUŽITÉ ZKRATKY

ACN	acetonitril
ADMA	asymetrický dimethylarginin , N^G, N^G -dimethyl-L-arginin
AGAT	arginin:glycin amidinotransferasa
Arg	L-arginin
AUC	plocha pod křivkou
AUC/IS	plocha pod křivkou analytu / plocha pod křivkou interního standardu
CAT	transportér kationtových aminokyselin
CE	kapilární elektroforéza
CE-LIF	kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescencí
cNOS	konstituční NO synthasa
CV	variační koeficient
DDAH	dimethylarginindimethylaminohydrolasa
DMA	dimethylamin
ELISA	enzymová imunoanalýza na imunosorbentech
eNOS	endoteliální NO synthasa
FAD	flavinadenindinukleotid
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
FMN	flavinmononukleotid
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
hArg	L-homoarginin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
HPLC-MS/MS	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
ID-LC-MS/MS	izotopová diluce s kapalinovou chromatografií a hmotnostní spektrometrií
ICHS	ischemická choroba srdeční
iNOS	inducibilní NO synthasa
IS	interní standard
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
L-NMMA	N^G -monomethyl-L-arginin

ME	2-merkptoethanol
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MEKC-LIF	micelární elektrokinetická chromatografie s laserem indukovanou fluorescencí
MeOH	methanol
MMA	monomethylarginin
MP A	mobilní fáze A
MP B	mobilní fáze B
MPA	3-merkptopropionová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
NADP, NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
nNOS	neuronální NO synthasa
NOS	NO synthasa, nitroxidsynthasa
OPA	<i>ortho</i> -ftaldialdehyd
PFPA	anhydrid kyseliny pentafluoropropionové
PRMT I	protein-arginin methyltransferasa typu I
PRMT II	protein-arginin methyltransferasa typu II
PRMT	protein-arginin methyltransferasa
SD	směrodatná odchylka
SDMA	symetrický dimethylarginin, $N^G, N^{G'}$ -dimethyl-L-arginin
SPE	extrakce na pevné fázi
TMB	tetramethylbenzidin

POUŽITÁ LITERATURA

ADMA ELISA: Instruction for use, 2011. . DLD Diagnostika, Hamburg.

Albsmeier, J., Schwedhelm, E., Schulze, F., Kastner, M., Böger, R.H., 2004. Determination of NG,NG-dimethyl-L-arginine, an endogenous NO synthase inhibitor, by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 809, 59–65.

Aldámiz-Echevarría, L., Andrade, F., 2012. Asymmetric dimethylarginine, endothelial dysfunction and renal disease. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 11288–11311.

Alkaitis, M.S., Nardone, G., Chertow, J.H., Ackerman, H.C., 2016. Resolution and quantification of arginine, monomethylarginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in plasma using HPLC with internal calibration. *Biomed. Chromatogr.* 30, 294–300.

Blackwell, S., O'Reilly, D.S.J., Talwar, D., 2007. Biological variation of asymmetric dimethylarginine and related arginine metabolites and analytical performance goals for their measurement in human plasma. *Eur. J. Clin. Invest.* 37, 364–371.

Bode-Böger, S.M., Scalera, F., Ignarro, L.J., 2007. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacol. Ther.* 114, 295–306.

Bode-Böger, S.M., Scalera, F., Kielstein, J.T., Martens-Lobenhoffer, J., Breithardt, G., Fobker, M., Reinecke, H., 2006. Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 1128–1134.

Böger, R.H., 2008. All about ADMA: A novel risk factor is discovered, 2nd ed. DLD Diagnostika, Hamburg.

Böger, R.H., 2004. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the “L-arginine paradox” and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J. Nutr.* 134, 2842S–2847S; discussion 2853S.

Böger, R.H., Bode-Böger, S.M., Szuba, A., Tsao, P.S., Chan, J.R., Tangphao, O., Blaschke, T.F., Cooke, J.P., 1998. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): A novel risk factor for endothelial dysfunction. *Circulation* 98, 1842–1847.

- Böger, R.H., Ron, E.S., 2005. L-Arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.* 10, 14–23.
- Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E., Tietz, N.W. (Eds.), 2013. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 5th ed. Saunders, St. Louis, MO.
- Busch, M., Fleck, C., Wolf, G., Stein, G., 2006. Asymmetrical (ADMA) and symmetrical dimethylarginine (SDMA) as potential risk factors for cardiovascular and renal outcome in chronic kidney disease – possible candidates for paradoxical epidemiology? *Amino Acids* 30, 225–232.
- Caussé, E., Siri, N., Arnal, J.F., Bayle, C., Malatray, P., Valdiguié, P., Salvayre, R., Couderc, F., 2000. Determination of asymmetrical dimethylarginine by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 741, 77–83.
- Davids, M., Swieringa, E., Palm, F., Smith, D.E.C., Smulders, Y.M., Scheffer, P.G., Blom, H.J., Teerlink, T., 2012. Simultaneous determination of asymmetric and symmetric dimethylarginine, L-monomethylarginine, L-arginine, and L-homoarginine in biological samples using stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 900, 38–47.
- de Jong, S., Teerlink, T., 2006. Analysis of asymmetric dimethylarginine in plasma by HPLC using a monolithic column. *Anal. Biochem.* 353, 287–289.
- Fleck, C., Schweitzer, F., Karge, E., Busch, M., Stein, G., 2003. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases. *Clin. Chim. Acta* 336, 1–12.
- Goto, J., 1990. Fluorescence Derivatization, in: *Detection-Oriented Derivatization Techniques in Liquid Chromatography*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Hanczkó, R., Jámbor, A., Perl, A., Molnár-Perl, I., 2007. Advances in the o-phthalaldehyde derivatizations: Comeback to the o-phthalaldehyde-ethanethiol reagent. *J. Chromatogr. A* 1163, 25–42.
- Heresztyn, T., Worthley, M.I., Horowitz, J.D., 2004. Determination of L-arginine and NG,NG- and NG,NG'-dimethyl-L-arginine in plasma by liquid chromatography as AccQ-Fluor™ fluorescent derivatives. *J. Chromatogr. B* 805, 325–329.

- Jones, C.E., Darcy, C.J., Woodberry, T., Anstey, N.M., McNeil, Y.R., 2010. HPLC analysis of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, homoarginine and arginine in small plasma volumes using a Gemini-NX column at high pH. *J. Chromatogr. B* 878, 8–12.
- Lluch, P., Torondel, B., Medina, P., Segarra, G., Olmo, J.A. del, Serra, M.A., Rodrigo, J.M., 2004. Plasma concentrations of nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in human alcoholic cirrhosis. *J. Hepatol.* 41, 55–59.
- MacAllister, R.J., Rambausek, M.H., Vallance, P., Williams, D., Hoffmann, K.H., Ritz, E., 1996. Concentration of dimethyl-L-arginine in the plasma of patients with end-stage renal failure. *Nephrol. Dial. Transplant.* 11, 2449–2452.
- Markowski, P., Baranowska, I., Baranowski, J., 2007. Simultaneous determination of L-arginine and 12 molecules participating in its metabolic cycle by gradient RP-HPLC method: Application to human urine samples. *Anal. Chim. Acta* 605, 205–217.
- Marra, M., Bonfigli, A.R., Testa, R., Testa, I., Gambini, A., Coppa, G., 2003. High-performance liquid chromatographic assay of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, and arginine in human plasma by derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde. *Anal. Biochem.* 318, 13–17.
- Martens-Lobenhoffer, J., Bode-Böger, S.M., 2015. Amino acid N-acetylation: Metabolic elimination of symmetric dimethylarginine as symmetric N α -acetyldimethylarginine, determined in human plasma and urine by LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B* 975, 59–64.
- Martens-Lobenhoffer, J., Bode-Böger, S.M., 2012. Quantification of L-arginine, asymmetric dimethylarginine and symmetric dimethylarginine in human plasma: A step improvement in precision by stable isotope dilution mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 904, 140–143.
- Martens-Lobenhoffer, J., Bode-Böger, S.M., 2007. Chromatographic-mass spectrometric methods for the quantification of L-arginine and its methylated metabolites in biological fluids. *J. Chromatogr. B* 851, 30–41.
- Meinitzer, A., Puchinger, M., Winklhofer-Roob, B.M., Rock, E., Ribalta, J., Roob, J.M., Sundl, I., Halwachs-Baumann, G., März, W., 2007. Reference values for plasma concentrations of asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and other arginine

metabolites in men after validation of a chromatographic method. *Clin. Chim. Acta* 384, 141–148.

Molnár-Perl, I., Vasanits, A., 1999. Stability and characteristics of the o-phthaldialdehyde/3-mercaptopropionic acid and o-phthaldialdehyde/N-acetyl-L-cysteine reagents and their amino acid derivatives measured by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 835, 73–91.

Pettersson, A., Uggla, L., Backman, V., 1997. Determination of dimethylated arginines in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 692, 257–262.

Pi, J., Kumagai, Y., Sun, G., Shimojo, N., 2000. Improved method for simultaneous determination of L-arginine and its mono- and dimethylated metabolites in biological samples by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. App.* 742, 199–203.

Pilz, S., Meinitzer, A., Gaksch, M., Grübler, M., Verheyen, N., Drechsler, C., Hartaigh, B. ó, Lang, F., Alesutan, I., Voelkl, J., März, W., Tomaschitz, A., 2015. Homoarginine in the renal and cardiovascular systems. *Amino Acids* 47, 1703–1713.

Pope, A.J., Karuppiyah, K., Cardounel, A.J., 2009. Role of the PRMT–DDAH–ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. *Pharmacol. Res., The DDAH-ADMA pathway* 60, 461–465.

Rodionov, R.N., Martens-Lobenhoffer, J., Brillhoff, S., Burdin, D.V., Jarzebska, N., Demyanov, A.V., Hohenstein, B., Weiss, N., Bode-Böger, S.M., 2016. Acetylation of asymmetric and symmetric dimethylarginine: an undercharacterized pathway of metabolism of endogenous methylarginines. *Nephrol. Dial. Transplant.* 31, 57–63.

Saigusa, D., Takahashi, M., Kanemitsu, Y., Ishida, A., Abe, T., Yamakuni, T., Suzuki, N., Tomioka, Y., 2011. Determination of Asymmetric Dimethylarginine and Symmetric Dimethylarginine in Biological Samples of Mice Using LC/MS/MS. *Am. J. Anal. Chem.* 02, 303.

Schulze, F., Wesemann, R., Schwedhelm, E., Sydow, K., Albsmeier, J., Cooke, J.P., Böger, R.H., 2004. Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clin. Chem. Lab. Med.* 42, 1377–1383.

Schwedhelm, E., Wallaschofski, H., Atzler, D., Dörr, M., Nauck, M., Völker, U., Kroemer, H.K., Völzke, H., Böger, R.H., Friedrich, N., 2014. Incidence of all-cause and cardiovascular mortality predicted by symmetric dimethylarginine in the population-based study of health in pomerania. *PLoS ONE* 9, e96875.

SDMA ELISA: Instruction for use, 2016. . DLD Diagnostika, Hamburg.

Šíroká, R., Racek, J., Filipovský, J., 2005. Asymetrický dimethylarginin (ADMA). *Klin. Biochem. Metab.* 13 (34), 131–134.

Šíroká, R., Trefil, L., Rajdl, D., Racek, J., Cibulka, R., 2007. Asymmetric dimethylarginine – comparison of HPLC and ELISA methods. *J. Chromatogr. B* 850, 586–587.

Teerlink, T., 2007. HPLC analysis of ADMA and other methylated L-arginine analogs in biological fluids. *J. Chromatogr. B, Analysis of the L-Arginine/NO Pathway* 851, 21–29.

Teerlink, T., Luo, Z., Palm, F., Wilcox, C.S., 2009. Cellular ADMA: Regulation and action. *Pharmacol. Res., The DDAH-ADMA pathway* 60, 448–460.

Teerlink, T., Nijveldt, R.J., de Jong, S., van Leeuwen, P.A.M., 2002. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 303, 131–137.

Tran, C.T.L., Leiper, J.M., Vallance, P., 2003. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler. Suppl., Proceedings of the First International Symposium on ADMA as a Cardiovascular Risk Factor; Hamburg, October 4-6, 2002* 4, 33–40.

Trapp, G., Sydow, K., Dulay, M.T., Chou, T., Cooke, J.P., Zare, R.N., 2004. Capillary electrophoretic and micellar electrokinetic separations of asymmetric dimethyl-L-arginine and structurally related amino acids: quantitation in human plasma. *J. Sep. Sci.* 27, 1483–1490.

Tsikas, D., 2007. Analysis of the L-arginine/NO pathway. *J. Chromatogr. B, Analysis of the L-Arginine/NO Pathway* 851, 1–2.

Tsikas, D., Böger, R.H., Sandmann, J., Bode-Böger, S.M., Frölich, J.C., 2000. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS Lett.* 478, 1–3.

- Tsikakos, D., Schubert, B., Gutzki, F.-M., Sandmann, J., Frölich, J.C., 2003. Quantitative determination of circulating and urinary asymmetric dimethylarginine (ADMA) in humans by gas chromatography-tandem mass spectrometry as methyl ester tri(N-pentafluoropropionyl) derivative. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 798, 87–99.
- Tsikakos, D., Wu, G., 2015. Homoarginine, arginine, and relatives: Analysis, metabolism, transport, physiology, and pathology. *Amino Acids* 47, 1697–1702.
- Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J., Moncada, S., 1992a. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20 Suppl 12, S60-62.
- Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J., Moncada, S., 1992b. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *The Lancet* 339, 572–575.
- Valtonen, P., Karppi, J., Nyysönen, K., Valkonen, V.-P., Halonen, T., Punnonen, K., 2005. Comparison of HPLC method and commercial ELISA assay for asymmetric dimethylarginine (ADMA) determination in human serum. *J. Chromatogr. B* 828, 97–102.
- Zhang, W., Kaye, D.M., 2004. Simultaneous determination of arginine and seven metabolites in plasma by reversed-phase liquid chromatography with a time-controlled ortho-phthaldialdehyde precolumn derivatization. *Anal. Biochem.* 326, 87–92.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1:	Mechanismus reakce katalyzované NO synthasou.	7
Obr. 2:	Arginin a jeho methylované deriváty.	8
Obr. 3:	Schéma vzniku methylargininů.	9
Obr. 4:	Biosyntéza a metabolismus asymetrického dimethylargininu.	10
Obr. 5:	Hydrolyza ADMA katalyzovaná DDAH.	11
Obr. 6:	Metabolismus a transport argininu a dimethylargininů v buňce.	12
Obr. 7:	Arginin a homoarginin.	14
Obr. 8:	Derivatizace primárních aminů s <i>ortho</i> -ftaldialdehydem.	18
Obr. 9:	OPA/MPA adukty derivátů L-argininu.	19
Obr. 10:	Chromatogram směsného standardu.	33
Obr. 11:	Chromatogram derivatizačního činidla OPA/MPA.	36
Obr. 12:	Porovnání metody HPLC a ELISA u ADMA.	39
Obr. 13:	Porovnání metody HPLC a ELISA u SDMA.	40

SEZNAM TABULEK

Tab. 1:	Podmínky separace a detekce.....	29
Tab. 2:	Retenční časy L-argininu a jeho derivátů.....	32
Tab. 3:	Faktory asymetrie píků argininu a jeho derivátů.....	34
Tab. 4:	Účinnost separace chromatografické kolony.....	34
Tab. 5:	Absolutní a relativní návratnosti ADMA a SDMA.....	35
Tab. 6:	Charakteristiky kalibračních přímk ADMA a SDMA.....	37
Tab. 7:	Preciznosti stanovení argininu a jeho derivátů.....	37