

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2024

Bc. Dominik Novák

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

HPLC/MS stanovení symetrického a asymetrického dimethylargininu v lidské
plazmě

Bc. Dominik Novák

Diplomová práce

2024

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Dominik Novák**
Osobní číslo: **C22394**
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **HPLC/MS stanovení symetrického a asymetrického dimethylargininu v lidské plazmě**
Téma práce anglicky: **HPLC/MS Determination of Symmetric and Asymmetric Dimethylarginine in Human Plasma**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Seznamte se s aktuálními literárními údaji o klinickém využití a o možnostech stanovení methylovaných argininů. Zaměřte se zejména na asymetrický dimethylarginin.

Experimentální část:

Pokuste se vypracovat HPLC/MS metodu pro stanovení symetrického a asymetrického dimethylargininu v lidské plazmě. Zhodnoťte získané výsledky vzhledem k výsledkům publikovaným v literatuře.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Podle pokynů vedoucí diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Pavla Žáková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlášení autora

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnici Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 10. 05. 2024

Bc. Dominik Novák

PODĚKOVÁNÍ

Rád bych poděkoval Mgr. Pavle Žákové, Ph.D. za velkou pomoc, cenné rady, neskutečnou vstřícnost, velkou trpělivost a hlavě za skvělé vedení při vypracovávání této práce. Mé díky také patří prof. Mgr. Romanu Kand'árovi, Ph.D. za pomoc a věcné připomínky k praktickému provedení této práce. Dále bych chtěl poděkovat Tereze Brátové za podporu, trpělivost, a hlavně za pomoc při psaní této práce. Samozřejmě, chci poděkovat své rodině za podporu během celé doby mého studia. Také děkuji všem ostatním, kteří se na realizaci této práce nějakým způsobem podíleli.

ANOTACE

Tato práce se zabývá stanovením symetrického a asymetrického dimethyl-L-argininu. Oba jsou potenciálními biomarkery řady onemocnění. Ke stanovení byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí. Separace probíhala na koloně Arion Polar C18 určené pro reverzní fáze. Hmotnostní spektrometr se skládal ze tří kvadrupólů s ESI ionizací.

KLÍČOVÁ SLOVA

L-arginin, symetrický dimethyl-L-arginin, asymetrický dimethyl-L-arginin, HPLC, MS², tripl kvadrupól, ESI

TITLE

The HPLC/MS Determination of Symmetric and Asymmetric Dimethylarginine
in Human Plasma

ANNOTATION

This thesis deals with the measuring of asymmetric and symmetric dimethyl-L-arginine. Both are potential biomarkers for a lot of diseases. High performance liquid chromatography with tandem mass detection was used. Separation was run on the column Arion Polar C18 determined for reverse phase liquid chromatography. Mass spectrometry had a triple quadrupole and the ESI ionization.

KEYWORDS

L-arginine, symmetric dimethyl-L-arginine, asymmetric dimethyl-L-arginine, HPLC, MS², triple quadrupole, ESI

OBSAH

Úvod.....	16
Teoretická část	17
1. Methylované deriváty argininu	17
1.1 Metabolismus L-argininu.....	18
1.1.1 Vliv L-argininu na syntézu oxidu dusnatého	19
1.2 Metabolismus methyl-L-argininů	20
1.2.1 Eliminace methyl-L-argininů.....	22
1.3 Metabolismus oxidu dusnatého	24
1.4 Klinický význam asymetrického a symetrického L-argininu	26
1.4.1 Rizika pro rozvoj kardiovaskulárních chorob.....	27
1.4.2 Možné snížení asymetrického L-argininu.....	28
1.5 L-homoarginin	29
1.5.1 Biosyntéza L-homoargininu	30
1.5.2 Klinický význam L-homoargininu.....	30
2. Stanovení methylovaných L-argininů.....	31
2.1.1 Odběr a skladování vzorku	31
2.2 Stanovení dimethylovaných L-argininů v proteinech.....	31
2.3 Stanovení asymetrického a symetrického L-argininu pomocí imunochemických metod.....	32
2.4 Stanovení asymetrického a symetrického L-argininu pomocí plynové chromatografie	33
2.5 Stanovení asymetrického a symetrického L-argininu pomocí vysokoučinné kapalinové chromatografie	34
2.5.1 Vliv matrice	34
2.5.2 Interní standard	35
2.5.3 Přístupy k extrakci methylovaných L-argininů	35
2.5.4 Derivatizace vzorků	36

2.5.5	Vliv stacionární fáze na separaci	37
2.5.6	Přehled různých přístupů k stanovení asymetrického a symetrického L-argininu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie	38
	Praktická část	42
3.	Materiály a metoda stanovení	42
3.1	Přístroje, chemikálie a použitý materiál	42
3.1.1	Přístroje a software	42
3.1.2	Chemikálie a plyny	42
3.1.3	Pomůcky	43
3.2	Příprava roztoků	44
3.2.1	Standardy	44
3.2.2	Mobilní fáze	44
3.3	Stanovení dimethylovaných derivátů L-argininu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí	45
3.3.1	Chromatografická separace	45
3.3.2	Hmotnostní detekce	46
4.	Výsledky	47
	Diskuse	59
	Závěr	63
	Použitá literatura	64

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1 L-arginin, jeho methylované deriváty a homo-L-arginin	17
Obrázek 2 Metabolismus L-argininu	19
Obrázek 3 Struktura enzymu protein-arginin methyltransferasy 1	20
Obrázek 4 Struktura enzymu protein-arginin methyltransferasy 5	21
Obrázek 5 Schéma reakce syntézy methylovaných derivátů L-argininu	22
Obrázek 6 Schéma majoritní eliminační dráhy asymetrického dimethyl-L-argininu ...	23
Obrázek 7 Schéma minoritní eliminační reakce asymetrického dimethyl-L-argininu .	24
Obrázek 8 Syntéza oxidu dusnatého	25
Obrázek 9 Derivatizační reakce s činidlem ortoftalaldehydem	36
Obrázek 10 Schéma derivatizační reakce s butanolem.....	37
Obrázek 11 Retenční čas asymetrického dimethyl-L-argininu při 20 % acetonitrilu a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,8 mL/min, teplota kolony: 37 °C	47
Obrázek 12 Retenční čas asymetrického dimethyl-L-argininu při 5 % acetonitrilu a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,8 mL/min, teplota kolony: 37 °C	48
Obrázek 13 Retenční čas symetrického dimethyl-L-argininu při 5 % acetonitrilu a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,8 mL/min, teplota kolony: 37 °C	48
Obrázek 14 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 5 % acetonitrilu a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,8 mL/min, teplota kolony: 37 °C	48
Obrázek 15 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 3 % acetonitrilu a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,8 mL/min, teplota kolony: 37 °C	49
Obrázek 16 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 2 % acetonitrilu a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,8 mL/min, teplota kolony: 37 °C	49
Obrázek 17 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 2 % acetonitrilu a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,8 mL/min, včetně všech fragmentů, teplota kolony: 37 °C	50
Obrázek 18 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 11 % acetonitrilu a 10,3 mmol/L mravenčanu amonného a průtoku 0,8 mL/min, teplota kolony: 37 °C	50
Obrázek 19 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 10 % acetonitrilu a 18,5 mmol/L mravenčanu amonného a průtoku 0,8 mL/min, teplota kolony: 37 °C	51

Obrázek 20 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 4 % acetonitrilu a 40 mmol/L mravenčanu amonného a průtoku 0,8 mL/min, teplota kolony: 37 °C	51
Obrázek 21 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 2 % acetonitrilu, 0,1 % kyseliny mravenčí a 20 mmol/L mravenčanu amonného a průtoku 0,8 mL/min, teplota kolony: 37 °C	52
Obrázek 22 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 2 % acetonitrilu, 0,1 % kyseliny mravenčí a 20 mmol/L mravenčanu amonného a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 37 °C	52
Obrázek 23 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 37 °C, včetně všech fragmentů.....	53
Obrázek 24 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 25 °C	53
Obrázek 25 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 5 mmol/L mravenčanu amonného a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 25 °C	54
Obrázek 26 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 10 mmol/L mravenčanu amonného a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 25 °C	54
Obrázek 27 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 20 mmol/L mravenčanu amonného a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 25 °C.....	54
Obrázek 28 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 25 mmol/L mravenčanu amonného a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 25 °C	55
Obrázek 29 Závislost intenzity na koncentraci mravenčanu amonného	55
Obrázek 30 Závislost rozlišení na koncentraci mravenčanu amonného	56
Obrázek 31 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 20 mmol/L mravenčanu amonného a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 25 °C.....	56
Obrázek 32 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při gradientové eluci s konečnou koncentrací acetonitrilu 1 %, 20 mmol/L mravenčanu amonného a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 25 °C	57

Obrázek 33 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při gradientové eluci s konečnou koncentrací acetonitrilu 5 %, 20 mmol/L mravenčanu amonného a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 25 °C57

Obrázek 34 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při gradientové eluci s konečnou koncentrací acetonitrilu 10 %, 20 mmol/L mravenčanu amonného a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 25 °C58

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACN	Acetonitril
ADC	L-arginin dekarboxylasa
ADMA	Asymetrický dimethyl-L-arginin
AGAT	L-arginin:glycin aminotransferasa
AGXT2	Alanin-glyoxylát aminotransferasa
APCI	Chemická ionizace za atmosférického tlaku z angl. Atmospheric-Pressure Chemical Ionization
AQC	6-aminochinolyl-N-hydroxysukcinimidyl karbamát
ARG	Arginasa
ASL	Argininosukcinyl lyasa
ASS	Argininosukcinát synthasa
Atd	A tak dále
C18	Řetězec s osmnácti uhlíky
CAT	Transportéry kationtových aminokyselin z angl. Cationic Amino Acid Transporters
CID	Disociace vyvolaná kolizí z angl. Collision-Induced Dissociation
CVD	Kardiovaskulární choroby z ang. Cardiovascular diseases
DDAH	Dimethylarginin dimethylaminohydrolasa
DMGV	α -keto- δ -(NG, NG-dimethylguanidino) valerová kyselina
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
EC	Číslo EC z angl. Enzyme Commission Number
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ESI	Elektrosprejová ionizace z angl. Electrospray Ionization
GC	Plynová chromatografie z angl. Gas Chromatography
H ₂ O	Voda
HARG	L-homoarginin
HCl	Kyselina chlorovodíková
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie z angl. Hydrophilic Interaction Chromatography

HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie z angl. High-Performance Liquid Chromatography
LDL	Lipoprotein o nízké hustotě z angl. Low-Density Lipoprotein
Me ₂	Dva methyly
MEA	Monoethyl-L-arginin
MF	Mobilní fáze z angl. Mobile Phase
MMA	Monomethyl-L-arginin
MPA	3-merkaptopropionová kyselina
MRM	Monitorování více reakcí z angl. Multiple Reaction Monitoring
NADP	Oxidovaný nikotinadenindinukleotid fosfát z angl. icotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidated
NADPH	Redukovaný nikotinadenindinukleotid fosfát z angl. Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, reduced
NBD-F	4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol
NDA	Naftalen-2,3-dikarboxaldehyd
NO	Oxid dusnatý
NOHA	NG-hydroxy-L-arginin
NOS	Synthasa oxidu dusnatého
OAT	Ornithin aminotransferasa
ODC	Ornithin dekarboxylasa
OPA	Ortho-ftaldialdehyd
ORNT	Transportéry ornithinu z angl. Ornithine Transporters
OTC	Ornithin transkarbamylasa
P5C	L-Δ1-pyrrolin-5-karboxylát
PAGE	Polyakrylamidový gel z angl. Polyacrylamide Gel Electrophoresis
PITC	Fenylisothiokyanát
PRMT	Protein-arginin methyltransferasa z angl. Protein Arginine Methyltransferase
RNA	Ribonukleová kyselina
ROS	Reaktivní formy kyslíku z angl. Reactive Oxygen Species
SAMe	S-adenosylmethionin
SDMA	Symetrický dimethyl-L-arginin
SPE	Extrakce na pevnou fázi z angl. Solid Phase Extraction

TIC	Celkový iontový proud z angl. Total Ion Current
TOF	Doba letu z angl. Time-Of-Flight
UHPLC	Ultraúčinný kapalinový chromatograf z angl. Ultra-High-Performance Liquid Chromatography
UV	Ultrafialová oblast světla z angl. Ultraviolet spectrum
VIS	Viditelná oblast světla z angl. Visible spectrum

ÚVOD

Dimethylované deriváty L-argininu hrají zásadní roli v metabolismu oxidu dusnatého. Ten je zodpovědný za udržování cévní homeostázy, neboť se jedná o vasodilatátor. V případě nadměrné tvorby, zejména asymetrického dimethyl L-argininu, dochází k inhibici syntasy oxidu dusnatého, v důsledku čehož klesá plazmatická koncentrace oxidu dusnatého. Stejný efekt má i monomethyl L-arginin, jež je meziproduktem při syntéze dimethylovaných derivátů. Avšak z toho důvodu jsou jeho plazmatické koncentrace takřka nulové. Tato inhibice je způsobena tím, že asymetrický dimethyl-L-arginin soutěží o vazebné místo na synthase oxidu dusnatého s L-argininem, čímž nedochází k syntéze oxidu dusnatého.

Oproti tomu symetrický dimethyl L-arginin nemá schopnost se vázat do vazebného místa syntasy oxidu dusnatého, ale namísto toho soutěží s L-argininem o vazebné místo na kationtových transportérech. Což má za následek nepřímou inhibici syntézy oxidu dusnatého, protože se do buňky nedostává dostatek substrátu (L-argininu) pro jeho syntézu.

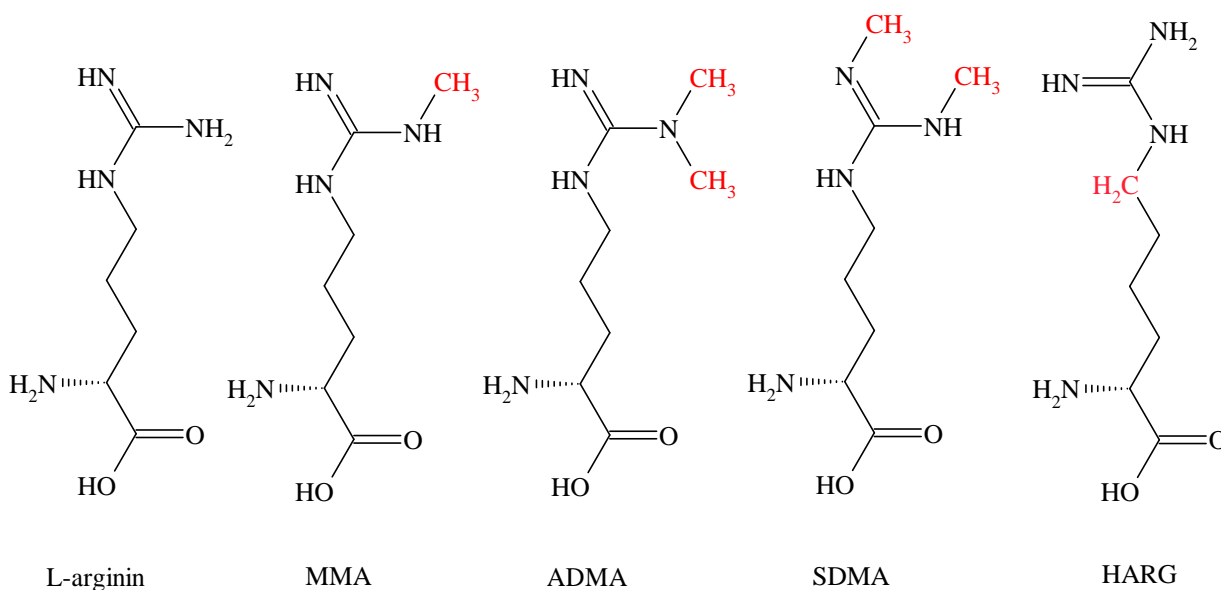
V současné době jsou proto dimethylované L-argininy zvažované jako biomarkery kardiovaskulárních a renálních onemocnění. Asymetrický dimethyl-L-arginin je pro svůj vliv na endoteliální funkci cév predikován jakožto biomarker pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění, zejména aterosklerózy, která přímo souvisí s flexibilitou cévní stěny. Symetrický dimethyl-L-arginin je brán v potaz jako potenciální biomarker správné funkce ledvin, to je dáno tím, že je takřka ze 100 % vylučován do moči.

Z tohoto důvodu je nezbytné přesné, rychlé a kvantitativní stanovení obou izomerů. Cílem práce bylo pokusit se vyvinout metodu pro simultánní stanovení asymetrický dimethyl-L-arginin a symetrický dimethyl-L-arginin.

TEORETICKÁ ČÁST

1. Methylované deriváty argininu

L-arginin je bazická semiesenciální aminokyselina s nejdelším postranním řetězcem ze všech aminosylin, viz obrázek 1. Semiesenciální je z toho důvodu, že je jeho produkce nedostatečná, zejména v období vývoje dítěte. K jeho syntéze dochází především v proximálních tubulech ledvin, dále pak také v močovinovém cyklu v játrech. Mechanismus vzniku L-argininu v ledvinách a játrech je shodný, ale liší se jeho následné využití. Zatímco arginin syntetizovaný v játrech není uvolňován do krevního řečiště, ten v ledvinách, ano. Je součástí proteinů, kde má význam hlavně při posttranslačních modifikacích. Při nich dochází k methylaci obdobně jako u histidinu a lysinu. Dalším významným zdrojem argininu je enzymatické štěpení proteinů, kdy jsou získávány i jeho methylované formy, viz obrázek 1. [1, 2, 12]



Obrázek 1 L-arginin, jeho methylované deriváty a homo-L-arginin, upraveno dle [5, 30]
Monomethyl-L-arginin (MMA), asymetrický dimethyl-L-arginin (ADMA), symetrický dimethyl-L-arginin (SDMA); L-homoarginin (HARG)

V minulosti byl zjištěn klinický význam methylovaných forem argininu, a to zejména kvůli vlivu na metabolickou dráhu oxidu dusnatého, což je významný vazodilatátor. Nejzásadnější vliv má asymetrický dimethyl-L-arginin (ADMA), který přímo ovlivňuje metabolickou dráhu oxidu dusnatého. Stejně tak působí i monomethyl-L-arginin (MMA). Druhý z dvojice dimethylovaných L-argininů, symetrický dimethyl-L-arginin (SDMA), již účinkuje nepřímě, a to přes nemethylovaný L-arginin, kdy inhibuje jeho příjem do buněk, a tím

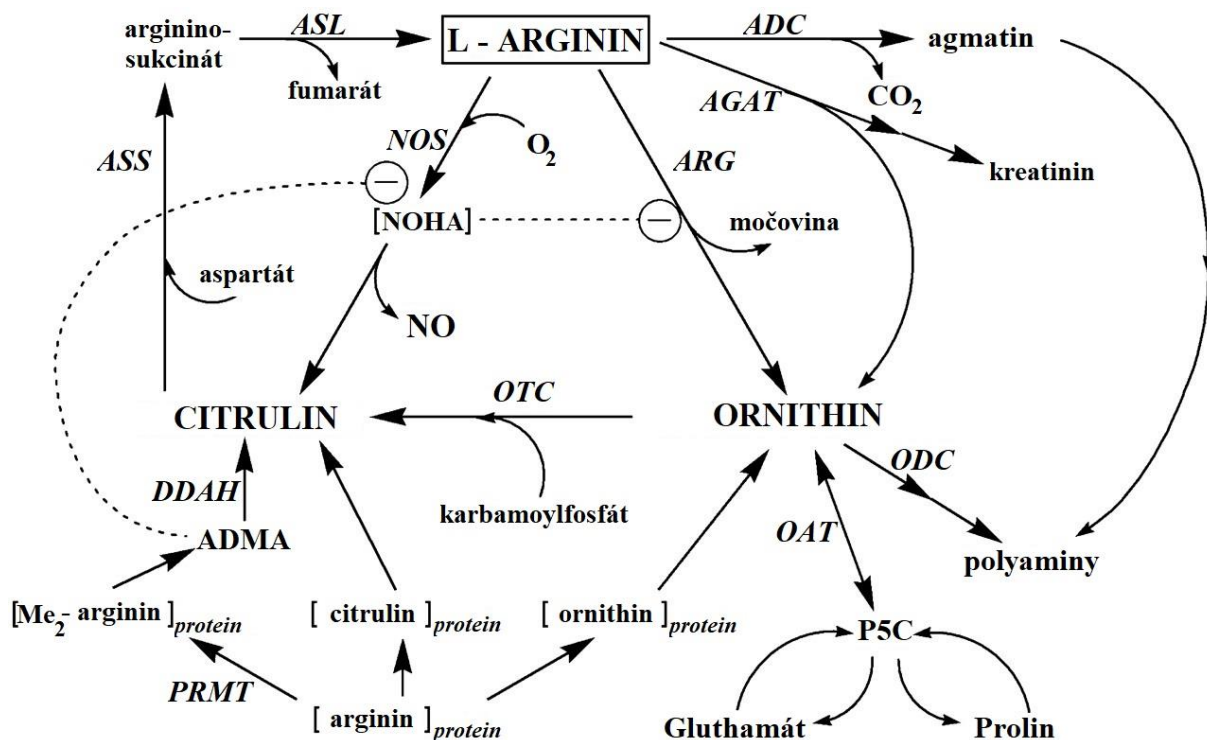
je omezena syntéza oxidu dusnatého. Homoarginin má, na rozdíl od methylovaných verzí, L-argininu pozitivní vliv na metabolickou dráhu oxidu dusnatého. [1, 2, 12]

1.1 Metabolismus L-argininu

Zdrojem volného L-argininu je v největší míře potrava, za ní hned následují endogenní syntézy a recyklace bílkovin. Přestože syntézu argininu mohou zprostředkovávat téměř všechny buňky v organismu, jeho endogenní produkce je primárně zastoupena v buňkách proximálního tubulu, jenž spolupracují s epiteliálními buňkami tenkého střeva. U zdravých jedinců je tudíž jeho endogenní syntéza dostatečně vysoká a není proto esenciální aminokyselinou. Produkce L-argininu se stává nedostatečnou, až v případě zánětu jater či tenkého střeva. U zdravých dospělých jedinců je plazmatická koncentrace L-argininu 80–120 $\mu\text{mol/L}$. Homeostáza argininu je regulována endogenní syntézou L-argininu, a zejména jeho katabolismem. [1, 2, 4, 12]

Syntéza argininu probíhá za katalýzy argininsukcinát syntasy (ASS) nebo argininsukcinyl lyasy (ASL), a to z L-citrulinu, viz obrázek 2. Tato reakce může být indukována řadou podnětů. Velmi často k této indukci dochází souběžně se zvýšenou produkcí syntasy oxidu dusnatého, protože je L-arginin substrátem pro jeho syntézu, při níž vzniká jako vedlejší produkt L-citrulin. Z toho vyplývá, že část L-citrulinu produkovaného během syntézy oxidu dusnatého je zpětně využita k syntéze L-argininu, viz obrázek 2. [1, 12]

Dalším regulačním mechanismem je aktivita transportérů argininu a dalších bazických aminokyselin. Ty jsou umístěny v cytoplazmatické membráně a jedná se o transportéry kationtových aminokyselin (CAT). V momentě, kdy je nedostatek aminokyselin k transportu, je omezena i syntéza těchto transportérů. V opačném případě však neschopnost indukce syntézy těchto přenašečů vede k nedostatku argininu v buňkách. To má vliv na syntézu proteinů a syntézu oxidu dusnatého. Mnohem více je omezena exprimace mitochondriálních transportérů, hovoříme o transportérech ornithinu (ORNT) a L-argininu, které jsou syntetizovány převážně v játrech. Jejich tvorba probíhá i v jiných typech buněk, ale v hepatocytech je nejvýznamnější. [1, 2, 4, 12]



Obrázek 2 Metabolismus L-argininu, upraveno dle [1, 12]

synthasa oxidu dusnatého (NOS), argininsukcinát synthasa (ASS), argininsukcinyl lyasa (ASL), L-arginin dekarboxyláza (ADC), arginin:glycin amidotransferasa (AGAT), arginasa (ARG); ODC – ornithin dekarboxyláza, ornithinamino transferasa (OAT), ornithin transkarbamylasa (OTC), protein-arginin methyltransferasa (PRMT), dimethylarginin aminohydrolasa (DDAH), N^G-hydroxy-L-arginin; P5C - L-Δ¹-pyrrolin-5-karboxylát (NOHA), Me₂ – dva methyly

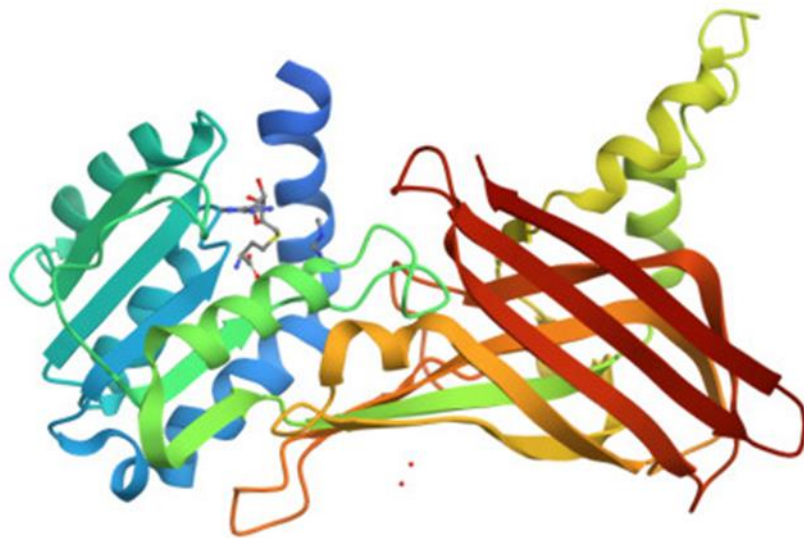
V těle je kladen velký důraz na recyklaci, a to nehovoříme jen o argininu. Arginin je využíván pro syntézu bílkovin v řadě metabolických drah, zejména v ornithinovém cyklu, je prekurzorem pro syntézu oxidu dusnatého atd. V situaci, kdy pro něj už tělo nemá využití, dochází k jeho degradaci pomocí arginin dekarboxylasy za vzniku produktu agmantinu, jenž je dále transformován agmatinasou na močovinu, viz obrázek 2. [1, 4, 12]

1.1.1 Vliv L-argininu na syntézu oxidu dusnatého

L-arginin je výchozí látkou pro syntézu oxidu dusnatého, z toho důvodu je i jedním z limitujících faktorů jeho tvorby, opomeneme-li nedostatečnou endogenní syntézu L-argininu a příjem v potravě. Další možnou příčinou jeho nedostatku pro syntézu oxidu dusnatého je nízká aktivita CAT transportérů. V neposlední řadě mají vliv i enzymy ornithinového cyklu. Výhodou ve prospěch oxidu dusnatého je několikaset násobně vyšší afinita syntasy oxidu dusnatého k L-argininu, oproti argininsukcinyl lyasám. Dalším kladem je fakt, že meziproduct syntézy oxidu dusnatého, N^G-hydroxy-L-arginin (NOHA), je výrazným inhibítoem argininsukcinyl lyasy. Mnohem zásadnější vliv ale mají methylované L-argininy, které plní regulační funkci při tvorbě oxidu dusnatého. [1, 2, 6]

1.2 Metabolismus methyl-L-argininů

Jak již bylo zmíněno, methylované deriváty vznikají při posttranslačních modifikacích u vázaného L-argininu v proteinech, anebo methylací volného L-argininu. K té může dojít jednou, anebo dvakrát. MMA je N^G-monomethyl-L-arginin, viz obrázek 1, jedná se o jedenkrát methylovanou aminokyselinu. Při dvojnásobné methylaci mohou vznikat dva různé produkty v závislosti na methylovaném dusíku, viz obrázek 1. Tehdy hovoříme o symetrickém N^G, N^{G'}-dimethyl-L-argininu, kdy jsou oba methyly na jednom dusíku, a asymetrickém N^G, N^G-dimethyl-L-argininu, kdy nejsou methyly na stejném dusíku. [1, 3, 5, 8, 9, 10]



Obrázek 3 Struktura enzymu protein-arginin methyltransferasy 1, převzato [44]

Jejich klíčová role v organismu spočívá v genové regulaci hlavních buněčných procesů, jakožto zpracování RNA a DNA, oprav a vysílání signálů okolním buňkám. Tato methylační reakce je zprostředkována enzymy PRMT, což jsou protein-arginin methyltransferasy. Ty jsou zodpovědné za methylaci L-argininu v histonových i nehistonových částech proteinů. V těle se vyskytuje celkem 9 izoform tohoto enzymu, které jsou rozděleny do 3 tříd. Strukturní vzorec enzymu PRMT 1 lze vidět na obrázku 3. Zástupce druhé třídy lze vidět na obrázku 4. [1, 3, 8, 9, 10]



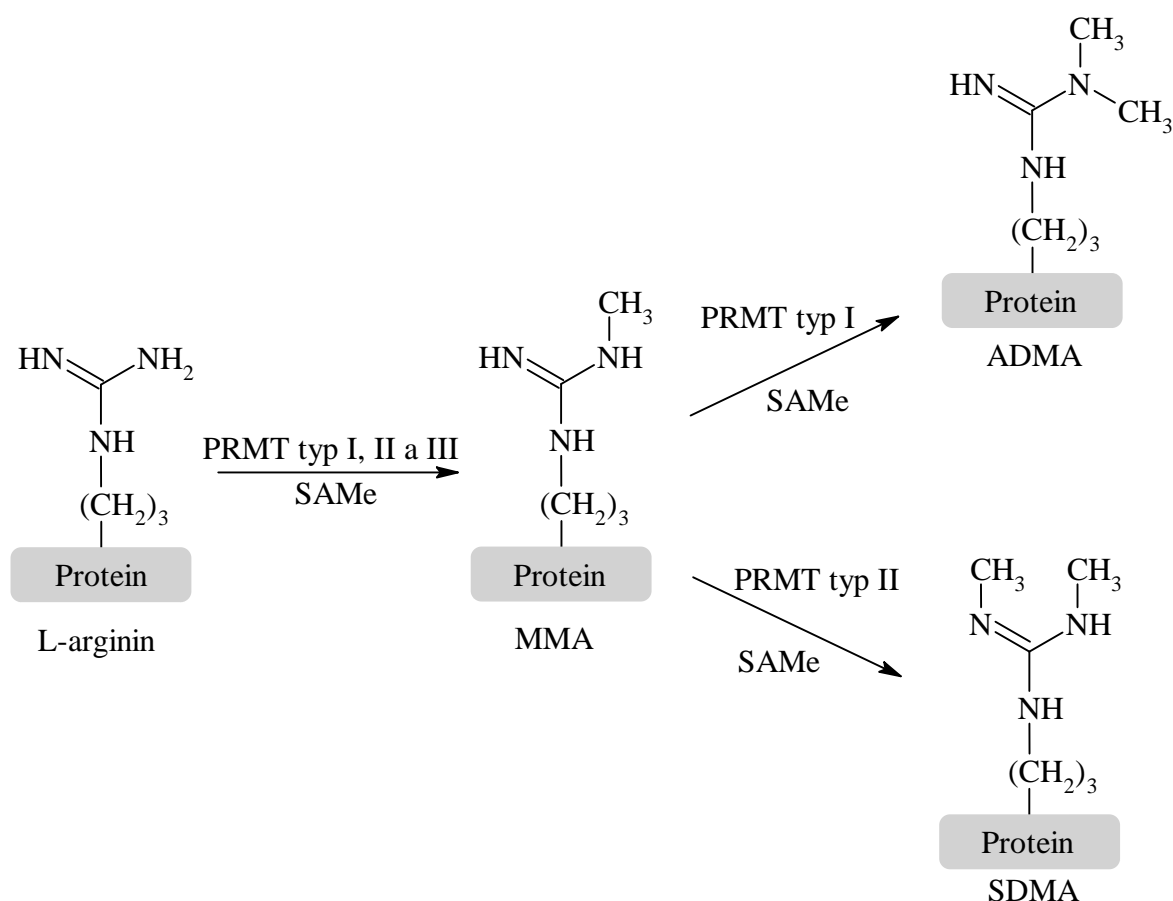
Obrázek 4 Struktura enzymu protein-arginin methyltransferasy 5, převzato [46]

Ve všech třídách je shodný první krok, kdy je jedna methylenová skupina zanesena na L-arginin za vzniku MMA. Druhá methylace je již pro každou třídu specifická. Do první třídy (EC 2.1.1.319) patří enzymy PRMT 1,2,3,4,6 a 8. Tyto enzymy katalyzují tvorbu ADMA. Nejvýznamnějším zástupcem první třídy je PRMT 1, který reguluje metabolismus RNA a signalizaci poškození DNA, stability proteinů a jejich buněčnou lokalizaci. [5, 7, 8, 9, 10, 11, 28]

Druhá třída (EC 2.1.1.320) je zodpovědná za tvorbu SDMA a patří do ní PRMT 5 a 9. PRMT 5 je hlavním enzymem, který je zodpovědný za methylaci histonů, transkripčních faktorů a proteinů zodpovědných za opravy DNA. Tento enzym tvoří, na rozdíl od enzymů první třídy, komplexy s takzvanými substrátovými adaptéry, které regulují jeho substrátovou specifitu. [5, 7, 8, 9, 10, 11, 28]

Do poslední, třetí třídy, patří pouze PRMT 7, který katalyzuje tvorbu MMA. PRMT 7 zodpovídá za transkripci a signalizaci poškození DNA, stresové a antivirové odpovědi. Reakční schéma syntézy lze vidět na obrázku 5 Schéma reakce syntézy methylovaných derivátů L-argininu. [5, 7, 8, 9, 10, 11, 28]

Methyly potřebné pro methylace jsou získány z S-adenosylmethioninu (SAMe). Ten je následně regenerován v metabolickém cyklu homocysteinu, do kterého se vrací S-adenosylhomocystein. Do cytoplazmy se methylované L-argininy dostávají díky hydrolýze proteinů, kde jsou následně zpracovány. Ještě před tím, než jsou eliminovány, mohou mít vliv na procesy v buňce, zejména na metabolismus oxidu dusnatého. [5, 7, 8, 9, 10, 11]

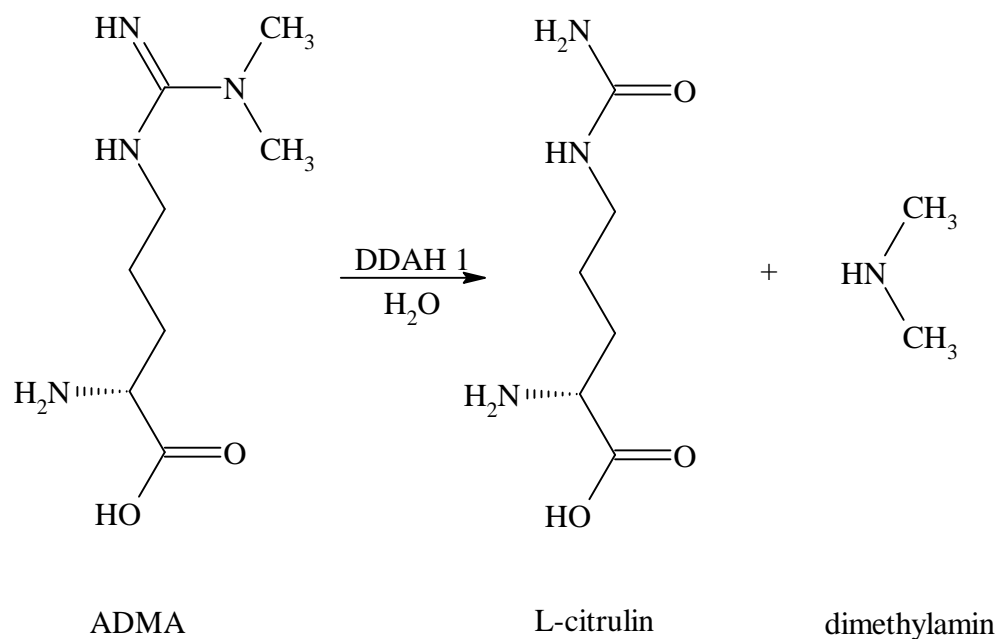


Obrázek 5 Schéma reakce syntézy methylovaných derivátů L-argininu, upraveno dle [8]

Monomethyl-L-arginin (MMA), asymetrický dimethyl-L-arginin (ADMA), symetrický dimethyl-L-arginin(SDMA), proteinarginmethyltransferasa (PRMT), S-adenosyl methionin (SAME)

1.2.1 Eliminace methyl-L-argininů

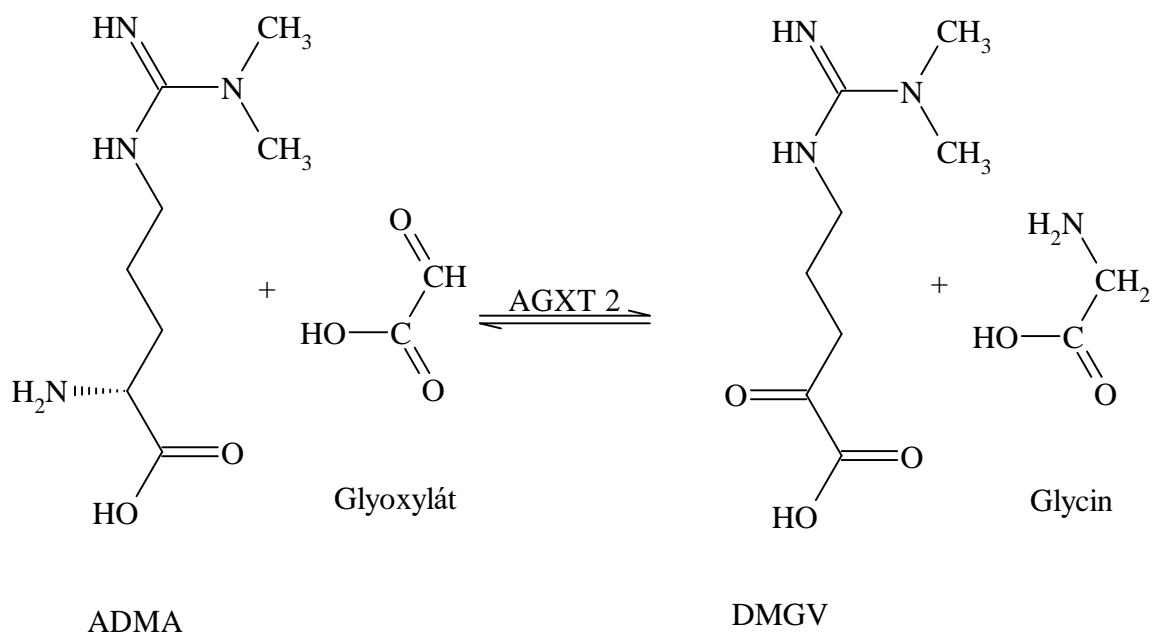
Volné methyl-L-argininy jsou po transportu z buňky z těla vyloučeny ledvinami. Další možností je enzymatická degradace. První variantu využívá SDMA, zatímco ADMA je enzymaticky degradován na L-citrulin za účasti enzymu dimethylarginin dimethylaminohydrolasy (DDAH, EC 3.5.3.18). Tento je specificky orientován na ADMA a MMA, kdy konečnými produkty reakce jsou L-citrulin a dimethylamin, viz obrázek 6. Enzym DDAH se v těle vyskytuje ve dvou izoformách, kdy bylo prokázáno, že s ADMA reaguje pouze DDAH 1. Tato reakce probíhá zejména v endotelových buňkách, ale i v hepatocytech. Oproti tomu SDMA s tímto enzymem nijak neinteraguje a je vyloučen takřka ze 100 %. ADMA je degradován asi z 80 % a renální exkrece představuje přibližně 15 %. Ačkoliv DDAH 2 nemá vliv na plazmatickou hladinu ADMA, bylo prokázáno, že má vliv na relaxaci endotelu. To je nejpravděpodobněji způsobeno jejím vlivem na oxid dusnatý pomocí ADMA nezávislých mechanismů, které jsou předmětem výzkumu. [12, 13, 14, 15, 16]



Obrázek 6 Schéma majoritní eliminační dráhy asymetrického dimethyl-L-argininu, upraveno dle [12]

Asymetrický dimethyl-L-arginin (ADMA), dimethylarginin dimethylaminohydrolasa (DDAH)

ADMA může být ještě v malé míře metabolizován mitochondriálním enzymem alanin-glyoxylát aminotransferasou 2 (AGXT2, EC 2.6.1.44) za účasti glyoxylátu, kdy vzniká α -keto- δ -(N^G , N^G -dimethylguanidino) valerová kyselina (DMGV) a glycin, viz obrázek 7. AGTX2 má širokou substrátovou specifitu, a tak kromě ADMA, zvládá zpracovávat MMA, a dokonce i SDMA. Při využití SDMA jako substrátu dochází ke vzniku symetrické α -keto- δ -(dimethylguanidino) valerové kyseliny a glycinu, jedná se ale o minoritní způsob. Jak již bylo řečeno, hlavní způsob vylučování SDMA je ledvinami v nezměněné podobě. Eliminace katalyzované pomocí AGXT2 probíhají zejména v ledvinách. Následné produkty jsou vyloučeny močí. Bylo prokázáno, že v moči se vyskytuje ADMA s jeho degradačním produktem v poměru 1:1, zatímco v ledvinách byl ADMA v několikanásobném nadbytku nad degradačním produktem. Z toho vyplývá, že renální eliminace produktu degradace je mnohem účinnější než samotného ADMA. Studie naznačují, že tato minoritní cesta pomáhá regulovat hladiny methylovaných L-argininů. [13, 14, 15, 16]



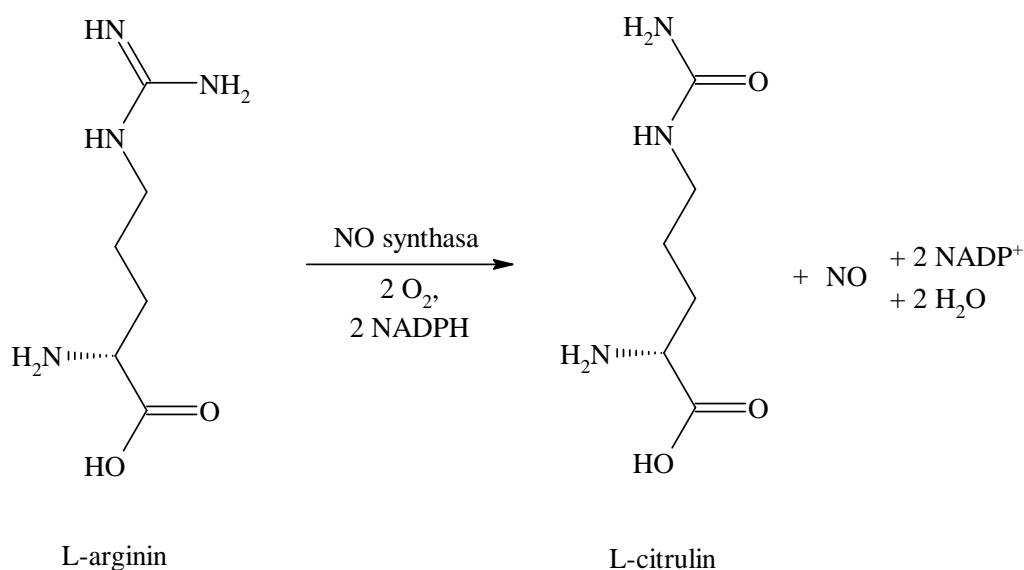
Obrázek 7 Schéma minoritní eliminační reakce asymetrického dimethyl-L-argininu, upraveno dle [14]

Asymetrický dimethyl-L-arginin (ADMA), alanin-glyoxylát aminotransferasa 2 (AGXT2), α -keto- δ -(N^G, N^G-dimethylguanidino) valerová kyselina (DMGV)

Další možností je acetylace, kdy dochází ke vzniku asymetrických a symetrických N- α -acetyldimethyl-L-argininů. K této reakci dochází primárně v játrech, ledvinách a tenkém střevě. Tělo pak tyto deriváty vylučuje ledvinami. [16]

1.3 Metabolismus oxidu dusnatého

Oxid dusnatý je bezbarvý, vysoce reaktivní plyn, jenž je omezeně rozpustný ve vodě. Jedná se o paramagnetickou molekulu, která má lichý počet elektronů, což předurčuje její vysokou reaktivitu a radikálovou povahu. Zároveň mu jeho nábojová neutralita umožňuje rychle difundovat napříč tkáněmi, a to je nezbytná vlastnost pro okamžitou reakci organismu. Jeho biologický význam spočívá v předávání signálu napříč organismem, vasodilataci a odpovědi imunitních buněk. Podstata účelu oxidu dusnatého vychází z tkáně, ve které došlo k jeho produkci. Ta závisí na synthase oxidu dusnatého (NOS, nitroxid synthasa, EC 1.14.13.39), u které jsou v současnosti známy čtyři izoformy tohoto enzymu. Těmi jsou endoteliální, indukovatelná, neuronální a mitochondriální NOS. Všechny tyto izoformy vytvářejí oxid dusnatý z L-argininu za přítomnosti kyslíku a NADPH, viz obrázek 8. Jejich aktivita je regulována množstvím substrátu, a zejména methylovanými L-argininy. ADMA je silný inhibitor, neboť působí přímo na NOS, zatímco SDMA je slabší a působí nepřímo přes kompetici s L-argininem o místo na transportérech do buňky. [17, 21, 22, 26, 39]



Obrázek 8 Syntéza oxidu dusnatého, upraveno dle [17]

Oxid dusnatý (NO[•]), redukovaný nikotinadenin dinukleotid fosfát (NADPH), oxidovaný nikotinadenin dinukleotid fosfát (NADP⁺)

Endoteliální NOS je aktivní zejména v endoteliální tkáni cév, kde zajišťuje stabilní produkci oxidu dusnatého o nízkých koncentracích. Indukovatelná NOS je aktivní v buňkách imunitního systému a gliových buňkách, zvládá vytvářet vysoké koncentrace oxidu dusnatého v krátkém čase. K její aktivaci dochází až po setkání s patogenem a uvolnění cytokinů, přičemž jejím hlavním úkolem je zprostředkování buněčné smrti vytvořením toxického množství oxidu dusnatého. [17, 21, 22, 26, 39]

Neuronální NOS je aktivní především v centrálních a periferních neuronech, kde vytváří stabilní nízké koncentrace oxidu dusnatého, jenž slouží jako neurotransmitter pro komunikaci mezi buňkami a při neuronální plasticitě. Neuroplasticita je termín popisující vývoj změn v mozku v průběhu života po vystavení různým situacím a novým informacím. [17, 21, 22, 26, 39]

Poslední izoformou syntasy oxidu dusnatého je mitochondriální varianta, která byla objevena teprve nedávno. Je umístěna na vnitřní mitochondriální membráně a její význam spočívá v regulaci bioenergetiky a udržování konstantní hladiny Ca²⁺. [17, 21, 22, 26, 39]

Oxid dusnatý působí jako lokální modulátor, jedná se zejména o ten z endoteliální produkce. Při nedostatku hemoglobinu rychle prostupuje tkáněmi a podél cév do buněk hladkého svalstva a mitochondrií kardiomyocytů, čímž ovlivní průtok krve a funkci hlavně levé komory. V tkáni myokardu je volný oxid dusnatý vázán na myoglobin, což vede k jeho stabilní koncentraci 0,1 – 0,3 μmol/L. V praxi ale může oxid dusnatý cestovat organismem na velké

vzdálenosti, při tom je vystaven působení molekulárního kyslíku či jeho reaktivním derivátům (ROS), thiolům a redukovaným hemoproteinům. To má za následek jeho rozklad a zeslabení, či ztrátu přenášeného signálu vlivem jeho oxidace za vzniku stabilnějších dusitanů a dusičnanů. [17, 21, 22, 23, 26, 38, 39]

Přestože v organismu hraje oxid dusnatý důležitou roli, má také řadu patofyziologických vlastností. Ty jsou způsobené jeho reakcemi zejména s ROS, při níž vznikají vysoce reaktivní sloučeniny, které poškozují buněčné struktury. Jedním ze způsobů je reakce se superoxidovými anionty, při kterých vznikají peroxonitryly, jenž v mitochondriích stimuluje syntézu cytochromu C. Ten je indikátorem mitochondriálního stresu, induktorem buněčné smrti a inhibítorem buněčného dýchání. Dalším negativním vlivem je S-nitrosylace proteinů, což má za následek dysfunkci bílkovin, která může vést až k rozvoji neurodegenerativních onemocnění, například: Parkinsonově chorobě či Alzheimerově chorobě. Dále může působit na glutamátové receptory v neuronech, to má za následek nadměrnou stimulaci receptorů a příliv Ca^{2+} iontů. Tím dochází ke stimulačnímu poškození neuronů. [17, 21, 22, 23, 38]

Stejně tak jako zvýšené hladiny oxidu dusnatého, viz výše, tak i jeho nízké hladiny mají patologický význam. Ty jsou nejčastěji způsobeny vysokými koncentracemi methylovaných derivátů L-argininu. V důsledku toho dochází ke změnám endotelu a rozvoji endotelové dysfunkce. S tou souvisí rozmach řady onemocnění, zejména kardiovaskulárních chorob. [17, 21, 22, 23, 26]

1.4 Klinický význam asymetrického a symetrického L-argininu

Obě posttranslační modifikace L-argininu jsou spojeny s průběhy řady chorob. Jedná se zejména o chronická onemocnění ledvin a onemocnění spojená s metabolismem oxidu dusnatého. Jejich fyziologické hodnoty se pohybují v rozmezí 0,4–0,6 $\mu\text{mol/L}$ pro ADMA a 0,5–0,7 $\mu\text{mol/L}$ pro SDMA, načež jejich intracelulární koncentrace je asi pětikrát vyšší. Tento významný rozdíl vysvětluje, proč i nepatrná změna plazmatické koncentrace má velký význam. Dále bylo prokázáno, že jejich koncentrace rostou s věkem, což může vysvětlovat snižující se glomerulární filtrace. [5][17][18][19][20] [29] [38] [39]

Ke zvýšení koncentrace obou izomerů dochází vlivem oxidačního stresu, při kterém mohou lipoproteiny o nízké hustotě (LDL) a oxidované LDL zvýšit produkci ADMA. To je způsobeno jejich vlivem na aktivitu enzymu produkujícího methylované L-argininy, PRMT. Tohle má za následek přehlcení eliminačních enzymů, čímž dochází ke zvýšení plazmatických

koncentrací. Další příčinou zvýšení koncentrací methylovaných reziduí L-argininu je selhání eliminačních enzymů, jenž může být způsobeno nedostatečnou anebo nulovou tvorbou těchto enzymů, zejména DDAH. Mezi možné příčiny inhibice řadíme hyperglykémii, hyperhomocysteinémii, oxidační stres, erytropoetin, anebo také léky. Mezi medikamenty, jenž inhibují DDAH, patří hlavně inhibitory protonové pumpy. To má za následek mimo jiné vysoké zatížení ledvin, jakožto cesty těchto sloučenin z těla ven. [17, 18, 19, 38]

Obě tyto neproteinogenní aminokyseliny se řadí do skupiny uremických toxinů, kdy řada studií prokázala silnou korelaci mezi zvýšenou hladinou SDMA a funkcí ledvin. U ADMA tato spojitost prokázána nebyla, obecně však platí, že kontrolní skupiny mají nižší hladiny ADMA než pacienti. SDMA je proto považován za biomarker akutního poškození ledvin, právě díky jeho takřka 100% vylučování v nezměněné podobě. Zde je SDMA vhodnější cestou než výpočet odhadu rychlosti glomerulární filtrace ze sérového kreatininu. [17,18, 19, 20, 29, 38, 39]

Dále jsou zvýšené hladiny ADMA a SDMA spojovány s endoteliální dysfunkcí, zejména s vysokým krevním tlakem, diabetes mellitus, cévní mozkovou příhodou, hyperurikémií, ischemickou chorobou srdeční, syndromem polycystických vaječnicků, erektilní dysfunkcí a řadou dalších, přičemž seznam neustále narůstá. U pacientů s diabetes mellitus 2. typu byla prokázána korelace mezi zvýšenými hladinami ADMA a C-reaktivním proteinem. Nejzásadnější význam mají pro rozvoj kardiovaskulárních chorob a chronických onemocnění ledvin. [5, 17,18, 19, 20, 29, 38, 39]

ADMA a SDMA mají také významný vliv na genovou expresi. Dojde-li k dimethylaci L-argininu v histonech, dochází právě k výraznému omezení genové exprese. V současné době je snaha využít methylované deriváty ke zpomalení či úplnému zvrácení proliferace rakovinových buněk. Díky tomu by byla možná tvorba specifické protinádorové léčby. [27, 28]

1.4.1 Rizika pro rozvoj kardiovaskulárních chorob

Řada studií prokázala, že zvýšené hladiny SDMA, ale zejména ADMA, mají významný vliv na rozvoj těchto onemocnění, kdy byla potvrzena korelace mezi extracelulární koncentrací ADMA a mortalitou u kardiovaskulárních chorob (CVD). To je způsobeno především jejich vlivem na metabolismus oxidu dusnatého, který významně ovlivňují. Z toho důvodu se o nich uvažuje jako o potenciálních biomarkerech kardiovaskulárních chorob. Nejvýznamnější spojitost je s ischemickou chorobou srdeční, onemocněními periferních tepen, chronickým srdečním selháním a dalšími. [5, 19, 20, 36, 38]

Nejvíce se v souvislosti s CVD hovoří o ADMA, jehož zvýšená plazmatická koncentrace významně koreluje s rostoucím rizikem a mortalitou na tuto onemocnění. Jeho zvýšené hladiny se nejvíce vyskytují u pacientů s endotelovou dysfunkcí. Mezi ně řadíme pacienty s hypercholesterolémií, hyperlipidémií, hypertenzí, diabetes mellitus, ischemickou chorobu srdeční, chronickým srdečním selháním, erektilní dysfunkcí a dalšími. Pro všechny tyto nemoci je nejčastěji společná normální hladina L-argininu a snížená aktivita nebo exprese DDAH. [19, 20, 36, 38]

Řada studií prokázala korelaci mezi závažností aterosklerózy a významně vyššími hladinami ADMA, to je nejspíše způsobeno jeho přímým vlivem na metabolismus oxidu dusnatého. ADMA je také zvýšený u pacientů s hypercholesterolémií, což souvisí s posílením jeho syntézy vlivem LDL. Kromě toho jsou také zvýšené hladiny ADMA spojovány s dalšími rizikovými faktory pro rozvoj CVD, a to se zvýšenými hladinami glukosy, triacylglycerolů, homocysteinu a mediátorů zánětu. [19, 20, 36, 38]

Oproti tomu zvýšené hladiny SDMA poukazují na vyšší riziko úmrtí z různých příčin, mezi něž patří i CVD. V jejich případě jsou zvýšené plazmatické koncentrace vyšším rizikem pro jejich progresi a případné komplikace spojené obzvláště s aterosklerózou. Jeho zvýšené hladiny jsou významným ukazatelem progresu CVD, a z toho důvodu ho lze využívat pro předpovídání dalšího průběhu CVD. [19, 20]

1.4.2 Možné snížení asymetrického L-argininu

Jelikož má ADMA nízkou molekulovou hmotnost (202,25 g/mol), nabízela by se možnost využití dialýzy k jeho eliminaci. Bohužel ale množství studií prokázalo, že tato úvaha vše až příliš zjednodušuje, neboť ADMA je v plazmě ve volné formě asi z 12 %, kdy zbytek je vázán na plazmatické proteiny. Bylo tedy zjištěno, že tento způsob jeho eliminace je v praxi nevyužitelný. [19, 20, 26]

Dále se nabízí jeho modifikace vlivem medikamentu. Zatímco inhibitory protonových pump mají za následek jeho zvýšení, a tím zhoršení průběhu CVD. Jako jeden z jeho možných inhibitorů byl zvažován paricalcitol, což je lék, který zvyšuje na endotelu závislou vazodilataci, čímž zlepšuje šance na lepší průběh, potažmo na přežití pacientů s CVD. Mechanismus jeho účinku je dosud neznámý. Bohužel však bylo prokázáno, že nemá žádný vliv na plazmatické koncentrace ADMA ani SDMA. Několik studií zabývajících se touto problematikou poukazuje na řadu léčiv zkoušených na zvířecích modelech, které snižují hladinu methylovaných L-argininů, mezi ně patří například rosiglitazol, amlodipin a další. [19, 20]

Dalším, bohužel, neprůkazným pokusem bylo podávání L-argininu pacientům ve snaze zvrátit kompetici u NOS ve prospěch nemethylované verze. Pozitivní vliv na endoteliální funkci byl prokázán pouze jednou a dále se ho nepovedlo zopakovat. Při jeho podávání pacientům po infarktu myokardu byl dokonce objeven opačný trend, při němž došlo ke zvýšení mortality. [19, 20]

Studie využívající léky k inhibici angiotenzinu konvertujícího enzymu, či blokátory receptoru pro angiotenzin II., dokázaly v některých studiích snížit hladiny ADMA, ale v dalších se efekt, a to i při dlouhodobém užívání, neprojevil. Do této kategorie léčiv patří například perindopril či enalapril. [19, 20, 26]

Oproti tomu léky, jež úspěšně snižují hladinu ADMA jsou perorální antidiabetika, lék metformin, kromě zdárné kontroly glykémie, upravuje koncentraci ADMA. Tento efekt byl prokázán i u resiglitazolu, který primárně působí na inzulinovou rezistenci. Nejpravděpodobnější příčina tohoto pozitivního efektu je vliv těchto léčiv na regulaci DDAH, jejíž exprese je posílena. Mezi další možné důsledky lze přidat i zvýšení produkce oxidu dusnatého. [19, 20]

Mezi další léčiva, která mají vliv i na DDAH, se řadí estrogenová terapeutika, jenž také zvyšují aktivitu daného enzymu. Další možnou potenciální metodou je snižování oxidačního stresu, podáváním například kyseliny listové či vitamínu E, kdy by mělo dojít k pozitivní zpětné vazbě. Avšak v tomto případě studie stále běží. Co ale již bylo prokázáno, je podávání vitamínu C, při kterém došlo k poklesu ADMA. Pacientům s CVD se také často podávají statiny, léky snižující hladinu cholesterolu, proto bylo zkoumáno, zda tato skupina medikamentů nemá vliv na methylovaná L-argininová rezidua, bohužel marně. [19, 20, 26]

V současné době je snaha o ověření funkčnosti specifického léku, antagonisty farnesoidního X receptoru GW 4064 (transkripční faktor), čímž by mělo dojít ke zvýšení exprese DDAH a snížení hladiny ADMA. Tento antagonistu také zvyšuje vylučování ADMA žlučí během jaterní ischemie. Bohužel však zatím nejsou žádné přesvědčivé důkazy, o snížení hladiny ADMA a SDMA. [19, 20]

1.5 L-homoarginin

Zatímco význam methylovaných L-argininů je znám již od 20. let minulého století, význam L-homoargininu byl objeven teprve nedávno. L-homoarginin je neesenciální, neproteinogenní aminokyselina, která se liší od L-argininu v délce uhlíkatého řetězce, neboť má o 1 methylenovou skupinu navíc, viz obrázek 1. [24, 25, 29]

Přestože se nejedná o L-arginin, ani o jeho methylované deriváty, díky strukturní podobnosti i L-homoarginin významně ovlivňuje metabolismus oxidu dusnatého. Na rozdíl však od svých dimethylovaných příbuzných, je jeho vliv spíše pozitivní. Zároveň má také významný vliv na homeostázu L-argininu. [24, 25, 29]

1.5.1 Biosyntéza L-homoargininu

Tato aminokyselina může vznikat sledem reakcí podobných těm, které se nachází v močovinovém cyklu, ornithin je však nahrazen lysinem. Přestože má lysin nižší afinitu k ornithin transkarbamoyl transferase, katalyzuje tento enzym i tuto transamidační reakci za vzniku L-homoargininu. [24]

Další cestou pro jeho biosyntézu je z L-argininu za přítomnosti arginin:glycin amidotransferasy (AGAT, EC 2.1.4.1). Tento enzym primárně katalyzuje přenos amido skupiny z argininu na glycin, čímž dochází k syntéze guanidinoacetátu, a je tak následně využit k syntéze kreatininu. V případě záměny lysinu za glycin dochází ke vzniku právě L-homoargininu. [24, 25]

1.5.2 Klinický význam L-homoargininu

L-homoarginin může díky své podobnosti k L-argininu také vstupovat do cyklu oxidu dusnatého. Na rozdíl však od methylovaných derivátů ADMA a SDMA je jeho vliv pozitivní. Přestože pro jeho podobnost soutěží o místo na transportérech do buňky CAT, stejně jako dimethylované deriváty. Oproti nim, on může působit jakožto alternativní substrát pro NOS, čímž neomezuje syntézu oxidu dusnatého, avšak oproti L-argininu má nižší afinitu. Touto reakcí pak vzniká oxid dusnatý a L-homocitrulin. Jeho další přínos spočívá v kompetitivní inhibici arginasy, enzymu zodpovědného za rozklad L-argininu. Tím přispívá ke zvyšování intracelulární koncentrace L-argininu. [24, 25, 29]

Vzhledem k tomu, že jeden z enzymů syntetizujících L-homoarginin (AGAT) je exprimován primárně v ledvinách, je také vhodným ukazatelem rychlosti glomerulární filtrace. Současně s tím bylo prokázáno, že HARG inhibuje zpětné vychytávání ARG z moči do ledvin. [24, 25]

Řada studií prokázala, že snížené hladiny L-homoargininu mohou být rizikovým faktorem pro rozvoj kardiovaskulárních chorob, zejména pak aterosklerózy. Z tohoto důvodu je zvažován jakožto nezávislý rizikový faktor pro kardiovaskulární a renální onemocnění. [24, 25]

2. Stanovení methylovaných L-argininů

Vzhledem k jejich potenciálu být biomarkerem pro kardiovaskulární onemocnění, je snaha o jejich co nejpřesnější stanovení. K tomu lze využít řadu metod. Jelikož se však jedná o izomery, je jejich kvantitativní stanovení obtížné. Dalším úskalím je jejich nízká plazmatická koncentrace. Ke stanovení lze využít enzymatickou imunoanalýzu (ELISA), která je využívána zejména pro kvantifikaci ADMA, dále také plynovou chromatografií (GC) či vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (HPLC) nebo ultra vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (UHPLC). Nejdůležitější částí je ale detekce, protože oba tyto methylované deriváty jsou bezbarvé aminokyseliny s téměř shodnými fyzikálními a chemickými vlastnostmi. [29, 32, 43]

Přestože bylo publikováno mnoho metod stanovení těchto izomerů, jen malé množství z nich vykazuje vhodnou přesnost a správnost. V současné době je nejvýznamnějším postupem využití HPLC s hmotnostní detekcí, případně s tandemovou hmotnostní detekcí. [32, 43, 45]

2.1.1 Odběr a skladování vzorku

Ke stanovení lze využít sérum, častěji se však používá plazma. Sérum je získáno stočením vysrážené krve. Oproti tomu, plazma je získána stočením nesrážené plné krve, jako protisrážlivé činidlo je využívána hlavně ethylendiamintetraoctová kyselina, která neruší další stanovení. Dále je možné využít heparin. Nelze však využít L-citrát. EDTA ani heparin nevykazují žádné rozdíly v plazmatických koncentracích ADMA a SDMA v porovnání k séru. Je nezbytné zabránit hemolýze, protože by to znamenalo uvolnění intracelulárního ADMA z erytrocytů. Po stočení je plazma či sérum krátkodobě uchováváno při 4 °C, pro středně dlouhodobé skladování při -20 °C, a pro dlouhodobé skladování až -80 °C. Bylo prokázáno, že opakované mražení a rozmrazování nemá vliv na stabilitu ADMA a SDMA. [5, 13]

Jako dalším biologickým materiálem je využívána moč. Ta je nejprve stočena a supernatant je následně odebírán ke stanovení. Ve vzácných, a zejména při výzkumných případech je využíván tkáňový supernatant anebo mozkomíšní mok, zde je však úskalím nižší koncentrace než v plazmě, což ještě více zvyšuje nároky na citlivost stanovení. Při zpracování homogenizátu je nezbytné zabránit proteolýze, která by měla za následek prudký nárůst methylovaných aminokyselin. Zkreslení může být způsobeno i přítomností arginas a DDAH. [5, 13]

2.2 Stanovení dimethylovaných L-argininů v proteinech

Jedna z možných metod stanovení je stanovení proteinů obsahujících methylované L-argininy pomocí elektroforézy, kdy je využit polyakrylamidový gel (PAGE) v kombinaci

s dodecylsulfátem sodným. Tato sůl plní důležitou funkci, při které dává proteinu stejný náboj, čímž umožní jeho separaci na základě molekulové hmotnosti. Následně je po elektroforetické separaci proveden western blotting. Proteiny přenesené na membránu jsou zvýrazněny protilátkami. K označení jsou využity polyklonální protilátky proti specifickým částem sekvencí aminokyselin. Tato specifická místa odpovídají sekvencím, kam se přirozeně váží enzymy PRMT před provedením methylace. Tyto protilátky jsou už značeny nejčastěji enzymem (peroxidasa), anebo je k tomu využita protilátka proti protilátce, která nese tento enzym. Provedením tohoto stanovení získáme informaci o úrovni methylace L-argininu v proteinech, což významně ovlivňuje genovou expresi. Následně, díky hydrolyze těchto proteinů to má vliv i na intracelulární hladiny ADMA a SDMA. [27]

Toto stanovení má význam zejména při studiu rakovinotvorných buněk, neboť výskyt dimetylovaných L-argininů v histonech zásadně ovlivňuje genovou expresi. PRMT, enzymy zodpovědné za metylaci L-argininu, jsou obecně nadměrně exprimovány v různých typech rakovinotvorných buněk. Studie se proto nejvíce zaměřují na histonové oblasti proteinů a poukazují tak na jejich významnost. Ta je způsobena vlivem histonů na genovou expresi, tím by bylo možné ovlivnit rozvoj rakoviny. [27, 28]

2.3 Stanovení asymetrického a symetrického L-argininu pomocí imunochemických metod

Enzymatická imunoanalýza je hojně využívaná metoda ke kvantitativním stanovením různých antigenů. Přestože má tato metoda několik různých postupů, pokaždé se jedná o reakci antigenu s protilátkou. Na jedné z těchto molekul je vždy kovalentně navázán enzym, který následně umožní spektrometrické, případně fluorimetrické stanovení. Nejčastěji je za tímto účelem využívána křenová peroxidasa. Pro měření ADMA je k dispozici omezené množství komerčně dostupných souprav pro jeho stanovení, avšak vyznačují se vysokou citlivostí. Problémem však u tohoto stanovení je reprodukovatelnost. [31]

VALTONEN a kolektiv prokázali, že kvantitativní stanovení ADMA pomocí ELISA kitů je zatíženo problematickou reprodukovatelností. Zatímco HPLC metoda s fluorimetrickou detekcí měla při analýze stejných vzorků reprodukovatelnost ukázkovou, tak ELISA v této oblasti selhala. Její reprodukovatelnost byla tristní, a to i naproti tomu, že bylo postupováno dle návodu výrobce. Valtonen a kolektiv se domnívali, že to mohlo být způsobeno použitím reálných vzorků, protože studie, ze které vycházeli, měla vzorky modelové. Dále uvažovali o možné nespecifitě vazeb protilátek. Tu však vyvrátili, protože se ukázala jako dobrá, neboť

množství zkřížených reakcí bylo pouze 1,2 %. Jejich porovnání obou metod ukázalo značné rozdíly ve stanovených koncentracích ADMA. Ještě prokázali, že HPLC metoda je mnohem výhodnější, kvůli vyšší citlivosti, reprodukovatelnosti, ale především díky možnosti stanovit všechny deriváty L-argininu, včetně něho zároveň. [31]

2.4 Stanovení asymetrického a symetrického L-argininu pomocí plynové chromatografie

Dimethylované deriváty L-argininu lze stanovit také pomocí plynové chromatografie, v tomto případě vždy se spojením s hmotnostní spektrometrií. Tato metoda umožňuje bezinterferentní kvantifikaci sérových proteinů obsahujících ADMA. [29]

BOLLENBACH a kolektiv využívali ke stanovení volného, celkového a v proteinech vázaného ADMA plynovou chromatografii za současného využití L-homoargininu pro zvýšení specifity stanovení. Díky kombinaci s MS detekcí zvládli simultánní stanovení všech zmíněných aminokyselin, samozřejmě v kombinaci se stabilními izotopy, jakožto vnitřními standardy. Ke stanovení byla využita 15metrová kolona Optima 17 s vnitřním průměrem 0,25 mm a tloušťkou filmu 0,25 μm . Teplota vstřikování byla 280 $^{\circ}\text{C}$. Separace probíhala při stabilním průtoku hélia 1,0 mL/min a teplotním gradientu. Ten měl průběh 0,5 minut při 40 $^{\circ}\text{C}$, pak byla teplota postupně zvednuta na 210 $^{\circ}\text{C}$, a to rychlostí 15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Následně byla zvýšena rychlostí 35 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na teplotu 320 $^{\circ}\text{C}$, která byla držena 1 minutu. Detekce byla zajištěna kvadrupólem, který separoval ionty vzniklé methanem zprostředkovanou chemickou ionizací. Pro přípravu vzorku séra byla využita hydrolyza pomocí HCl, která zajistila stabilní rozklad proteinů na jednotlivé aminokyseliny. [29]

TSIKAS využil ke stanovení plazmatické koncentrace plynovou chromatografii s tandemovou hmotnostní detekcí, s tím, že kvůli nedostatku komerčně dostupného a stabilního izotopu značeného derivátu ADMA aplikoval de novo syntézu právě tohoto interního standardu. Cílem jeho práce bylo ověřit jeho použitelnost a porovnat jeho schopnost v porovnání s komerčně dostupnou variantou. Při využití de novo syntetizovaného deuterovaného ADMA byla provedena O-methylace, jak u něj, tak i u plazmatického ADMA. Průběh reakce byl separátní a po ní byly oba methylované roztoky spojeny. Oproti tomu, komerčně dostupný interní standard byl pouze smíchán s plazmatickým alikvotem. Obě varianty byly následně derivatizovány N-pentyfluorpropionylem. Vzorky byly separovány na 30metrové koloně Optima 17 o vnitřním průměru 0,25 mm a tloušťce filmu 0,25 μm . Chromatografická separace probíhala při konstantním průtoku hélia 1 mL/min při teplotním

gradientu. Ten měl počáteční teplotu 90 °C po dobu 1 minuty, pak byl zvýšen na 320 °C rychlostí 15 °C/min. Detekce byla zprostředkována tripl kvadrupólem za současného využití argonu, jakožto kolizního plynu. Byla použita chemická ionizace pomocí metanu. Tsikas prokázal, že využití de novo syntetizovaných vnitřních standardů pro kvantifikaci látek bez vhodného vnitřního standardu je takřka stejně spolehlivou cestou. [30]

2.5 Stanovení asymetrického a symetrického L-argininu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Oproti plynové chromatografii nabízí kapalinová chromatografie širší možnosti detekce. Samozřejmě, že v dnešní době je nejvýznamnějším způsobem hmotnostní detekce, ať už ve své základní či tandemové verzi. Mezi další možnosti detekce je například elektrochemická detekce či UV detekce, v obou případech je ale nutností kvalitní derivatizace, bez které bude stanovení obou derivátů takřka nemožné. Oba tyto izomery sice poskytují UV odezvu při 200 nm, avšak vzhledem k nedostatečné citlivosti se toho nevyužívá. Právě kvůli tomu je nejčastějším způsobem fluorimetrická detekce s derivatizací. Tím ale dochází ke značnému prodloužení stanovení, dále se také zvyšuje riziko ztrát a interferencí vzniklých derivatizačním krokem. Zásadním krokem je také extrakce, kdy má tento krok významný vliv na výsledek celého stanovení. [32, 43, 45]

2.5.1 Vliv matrice

Složení vzorku má zásadní vliv na efektivitu stanovení, ionizaci a detekci. Do vzorku se mohou také uvolňovat látky z odběrového či transportního materiálu, včetně aditiv, jako jsou antikolagulančia. Vliv těchto dalších látek ve vzorku je nazýván matricovým efektem a můžeme ho pozorovat zejména u ESI a chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Matricové efekty jsou nepředvídatelné a můžou způsobit buď potlačení, anebo zvýšení ionizace. K potlačení ionizace může dojít při zkřížení reakce mezi analytem, metabolitem či interním standardem. Opačná situace nastává při silné vazbě analytu na matici či fragmentaci metabolitů již ve zdroji. V tom okamžiku hovoříme o zvýšené ionizaci. Matricový efekt může být také způsoben mobilními fázemi. Mezi tyto látky patří trifluoroctová kyselina a kyselina propionová či izopropanol, jsou-li přidány za kolonu. [47]

Matricový efekt má zásadní vliv na kvantitu a kvalitu stanovení, proto je snaha o jeho potlačení. K tomu je využíváno dávkování co nejmenších objemů vzorku, naředění vzorku, vhodná úprava vzorku či chromatografických podmínek. Nejvhodnější úpravou vzorku je využití SPE kolonek, které dokážou odstranit největší množství potenciálně interferujících

látek. Nejvýznamnějším přístupem pro potlačení matricového efektu je ale přidání vnitřního standardu. [47]

2.5.2 Interní standard

Před jakoukoliv první úpravou vzorku je přidán vnitřní standard. Ten je aplikován z toho důvodu, aby bylo zajištěno, že všechny přípravné kroky, kterými vzorek projde, nezpůsobí ztráty analytu. Dále slouží pro ověření účinnosti ionizace či citlivosti detekce. Díky němu je totiž potlačen vliv matricového efektu, protože se předpokládá, že vnitřní standard bude ovlivněn stejně jako analyt. V HPLC metodách stanovujících methylované L-argininy se nejčastěji využívají strukturní analogy. Zejména monomethyl L-arginin, jehož plazmatické koncentrace jsou takřka nulové. Některé studie také využívají monoethyl-L-arginin (MEA), který se v lidském organismu nevyskytuje. Jeho další výhodou je, že díky delšímu uhlíkatému řetězci je vždy jasně oddělen od zbylých analytů, na rozdíl od MMA. Oba tyto standardy lze využít při takřka všech metodách detekce, avšak pro hmotnostní detekci jsou přece jen vhodnější izotopicky značené vnitřní standardy. Ty jsou využívány obecně při každém hmotnostním stanovení kterékoliv látky. Jsou totiž separovány ve stejném čase jako neznačený analyt, ale liší se svojí hmotností. Neboť oproti klasické látce obsahují vhodný izotop. [32, 47]

2.5.3 Přístupy k extrakci methylovaných L-argininů

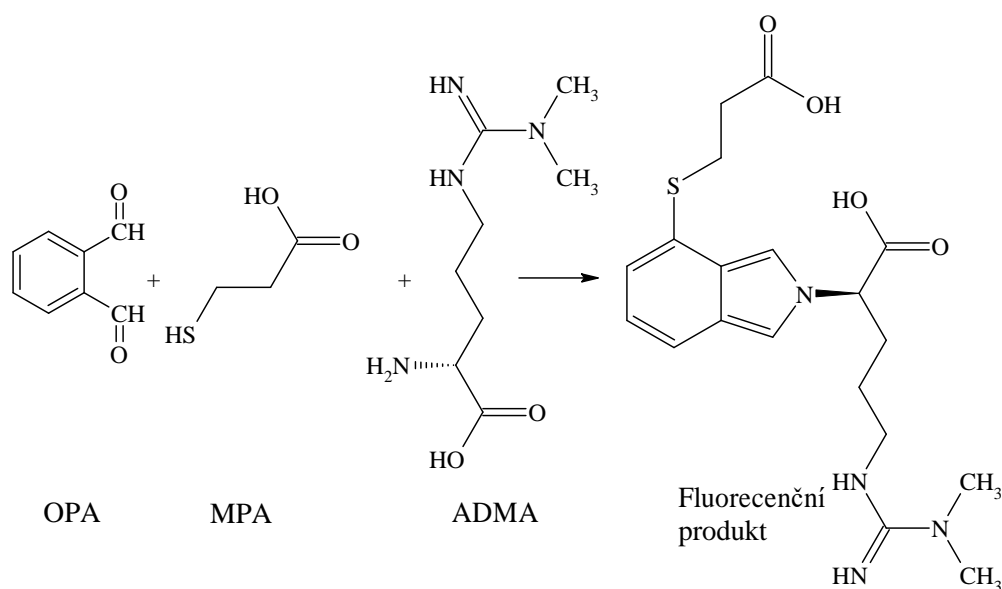
Existuje několik extrakčních postupů, jedním z nich je extrakce pomocí pevné fáze (SPE). V tomto případě jsou využívány kolonky s katexovou náplní. Kolonky jsou umístěny do podtlakových extrakčních systémů, které urychlí průchod kapaliny kolonou. Eluce analytů je po řádném promytí pufrem, vodou a methanolem zajištěna roztokem 50 % methanolu s 10 % amoniaku. Poté je eluent odpařen dosucha při 80 °C proudem dusíku. [5, 32]

Dalším extrakčním postupem je smíchání vzorku plazmy s methanolem, kdy je po řádném promíchání vzorek na 1 hodinu zmražen při -20 °C. Dojde tak k denaturaci proteinů. Po hodině je potom vzorek rozmražen a centrifugován. Odebraný supernatant s analyty je následně odpařen při 70 °C proudem dusíku. [5, 40]

Oba tyto extrakční přístupy jsou využívány ať už takto, nebo v různých modifikacích. Po odpaření následuje uskladnění v mrazáku při -20 °C, anebo rehydratace v mobilní fázi či v derivatizačním činidle. [5, 32]

2.5.4 Derivatizace vzorků

Derivatizační postupy jsou různé, závisí na způsobu detekce, který se plánuje využít. Nejčastějším z nich je pomocí ortho-ftaldialdehydu (OPA) a kyseliny 3-merkaptopropionové, viz obrázek 9. Tato kombinace je využívána více oproti dalším možným činidlům, například naftalen-2,3-dikarboxaldehyd (NDA), 6-aminochinoly-1-N-hydroxysukcinimidyl karbamát (AQC), 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD-F) a fenyliothiokyanát (PITC), protože jejich reakce probíhá již při pokojové teplotě, a navíc samotná OPA není fluorescenčně aktivní. Je nezbytné zmínit závislost OPA na thiolové skupině. Ta je zajištěna buď merkaptoethanolem, anebo 3-merkaptopropionovou kyselinou (MPA). MPA je využívána častěji, protože poskytuje stabilní a méně polární produkty než merkaptoethanol. [5, 32]



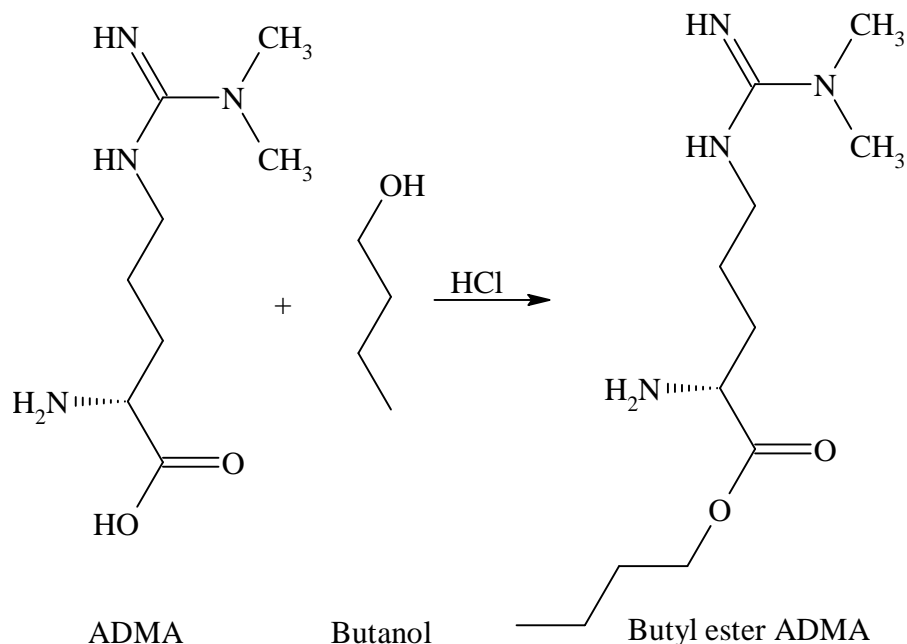
Obrázek 9 Derivatizační reakce s činidlem ortoftalaldehydem, upraveno dle [33]

Ortoftalaldehyd (OPA), 3-merkaptopropionová kyselina (MPA), asymetrický dimethyl-L-arginin (ADMA)

Díky tomu lze provést fluorescenční či vodivostní detekci. Derivatizační činidlo obsahuje ještě navíc methanol a boritanový pufr kvůli stabilnímu pH 8,5. Využití tohoto postupu je však náročné na koordinaci. Neboť stabilita tohoto činidla je až 48 hodin od přidání 3-merkaptopropionové kyseliny, pokud je skladováno při chladničkových teplotách. V případě, že je kyselina přidána těsně před analýzou, vydrží takto připravený roztok až týden. [32]

Další možný derivatizační postup je vhodný pro hmotnostní detekci, jedná se o zavedení butylu na řetězec aminokyseliny, viz obrázek 10. Dochází ke vzniku butylesterů, které mají mnohem vyšší signál pro hmotnostní detekci. Reakce spočívá ve smíchání butanolu s acetylchloridem či kyselinou chlorovodíkovou, a po přidání vzorku je směs nechána reagovat

po dobu 15 minut při 85 °C. Poté následuje odpaření při 45 °C pod proudem dusíku. Odparky jsou před analýzou rozpuštěny v mobilní fázi. [34, 35, 40]



Obrázek 10 Schéma derivatizační reakce s butanolem, upraveno dle [40]

Asymetrický dimethyl-L-arginin (ADMA), kyselina chlorovodíková (HCl)

2.5.5 Vliv stacionární fáze na separaci

Po provedení derivatizace lze využít k separaci obrácené fáze, a to tedy nepolární stacionární fázi. Bez provedení derivatizace je její využití obtížné, neboť tyto izomery mají shodné fyzikální a chemické vlastnosti, čímž je jejich separace značně obtížná. Ve snaze o odstranění derivatizačního kroku je další možností využití hydrofilní interakční chromatografie (HILIC). Kolony pro metody HILIC zvládají omezenou separaci těchto dimethylovaných derivátů L-argininu. Často ale za účasti kyseliny trifluoroctové, což je velmi významný problém, jelikož je to „iont killer“ (zabiják iontů), to má za následek značné snížení signálu, a to i u dalších stanovení, kde již není přítomna. Další nevýhodou, oproti reverzní fázi, je delší doba ekvibrace kolony, její nižší stabilita v čase, a hlavně horší reprodukovatelnost. U některých autorů je snaha o využívání modifikovaných obrácených fází, které dokážou díky své upravené povaze separovat methylované L-argininy bez využití HILIC technik. [35]

2.5.6 Přehled různých přístupů k stanovení asymetrického a symetrického L-argininu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

BLACKELL a kolektiv provedli stanovení ADMA, SDMA, homo-L-argininu a L-argininu pomocí izokratické HPLC metody s fluorescenční detekcí. Systém byl postavený na reverzních fázích, za použití kolony Symmetry s délkou 150 mm a průměrem 4,6 μm . Jednalo se o C18 kolonu s předkolonkou pro její ochranu. Vzhledem ke zvolené detekci byla nutností derivatizace, kterou provedli pomocí OPA a 3-merkaptopropionové kyseliny. V této studii porovnávali využití dvou různých interních standardů. Jedním z nich byl MMA, který se již standardně používá, ale pro svůj možný nepatrný výskyt ve vzorku není zcela ideální. Druhým byl monoethyl-L-arginin, což je látka, která se v těle nevyskytuje. Vzorky plazmy byly smíchány s interním standardem a následně byla provedena extrakce tuhou fází. Vzorky byly poté odpařeny proudem dusíku při 80 °C. Odparek byl následně derivatizován na OPA deriváty. Chromatografická separace probíhala za izokratických podmínek, při mobilní fázi složené z 50 mM acetátového pufru o pH 6,3 a 9 % acetonitrilu. Průtok byl nastaven na 1,5 mL/min. Fluorescenční detektor měl nastavenou excitační vlnovou délku 340 nm a emisní vlnovou délkou 455 nm. Pomocí derivatizace docílili velké citlivosti a dobré rozseparovatelnosti, bohužel však za cenu dlouhé analýzy, která trvala přibližně 35 minut. Dále se podařilo optimalizovat extrakční postup a dosáhnout vysoké reprodukovatelnosti. Ověřili, že využití MEA, jakožto vnitřního standardu, je vhodnější než MMA, protože prokázali jeho přítomnost v plazmě. MMA se v plazmě vyskytoval v rozmezí 0,05 až 0,3 $\mu\text{mol/L}$. Využití dalšího potenciálního interního standardu, a to L-homoargininu, se také jeví jako problematické, neboť jeho plazmatické koncentrace jsou 0,35 – 3,5 $\mu\text{mol/L}$. U obou je také pravděpodobný nárůst při onemocnění. [32]

MAMATHA a kolektiv prokázali, že ADMA není jen biomarkerem CVD, ale že existuje korelace mezi jeho plazmatickou koncentrací a cévními mozkovými příhodami. Ke stanovení ADMA byla využita HPLC s coulochemickou detekcí. Vzorky byly nejprve po přidání interního standardu MMA extrahovány pomocí SPE kolonek s katexovou náplní. Následně byl eluent odpařen v proudu dusíku a derivatizován pomocí OPA a MPA. Takto připravený roztok byl okamžitě analyzován. Separace probíhala na C18 koloně o délce 150 mm a průměru 3,9 μm . Jako mobilní fáze byl zvolen 50mM fosforečnan draselný o pH 6,5 s 8,7 % acetonitrilu. Po izokratické eluci analytů byly silně zadržené látky eluovány 50 % mobilní fází B, která obsahovala 50 % obj. acetonitrilu s vodou. Analýza trvala přibližně 30 minut. [37]

POPE a kolektiv se zabývali utlumováním genů pro DDAH 1 a 2, enzymů zodpovědných za rozklad dimethylovaných L-argininů na L-citrulin. Z toho důvodu byla nezbytná stanovení L-argininu a jeho dimethylovaných derivátů. Ke stanovení byl využit HPLC systém s elektrochemickou detekcí. Vzorke buněčných lysátů byly extrahovány pomocí katexových SPE kolonek s následnou derivatizací OPA a MPA. Derivatizovaný vzorek byl následně separován na Supelco LC-DABS C18 koloně o délce 25 cm a průměru 4,6 mm. Jako mobilní fázi autoři zvolili 50 mM dihydrogen fosforečnan draselný ve vodě o pH 7. Složení mobilní fáze B bylo 70 % acetonitrilu v methanolu. Autoři zvolili gradientovou eluci, kdy prvních 10 minut šlo na kolonu 90 % mobilní fáze A a poté její podíl klesal až ke 30 % na 40 minutě analýzy. Rozseparované analyty byly detekovány elektrochemickou detekcí ESA při 400 mV. Jako vnitřní standard využili L-homoarginin, který byl přidán před extrakcí. Ačkoliv bylo docíleno separace i kvantitativní detekce, použití této 40 minut trvající metody je možné pouze experimentálně, jelikož rychlejší metody jako HPLC MS jsou schopny provést analýzu již do 10 minut. Závěrem této studie je, že DDAH má významný vliv na metabolismus oxidu dusnatého, neboť metabolizují až 80 % ADMA. [15]

FLESZAR a kolektiv využili ke stanovení ADMA a dalších derivátů L-argininu UHPLC metodu s tandemovou hmotnostní detekcí. Analyty byly smíchány s deuterovanými vnitřními standardy a následně derivatizovány pomocí benzoylchloridu. Po 5minutové inkubaci byly roztoky stočeny a byl odebrán supernatant. Chromatografická separace probíhala v režimu obrácených fází na koloně Acquity HSS T3 od firmy Waters. Jednalo se o 5 cm kolonu s průměrem 1 mm. Celkový průtok během separace byl 0,250 mL/min. Separace probíhala při gradientu, kdy složení mobilní fáze A bylo 0,1 % kyseliny mravenčí ve vodě a složení mobilní fáze B bylo 0,1 % kyseliny mravenčí v methanolu. Gradient spočívá v postupném přidávání mobilní fáze B, kdy na počátku bylo 5 %. Na 5 minutě bylo dosaženo 90 % mobilní fáze B. Od páté minuty byl gradient lineárně snižován na počátečních 5 % na 10 minutě. Ke hmotnostní detekci byl využit kvadrupól TOF systém s ESI iontovým zdrojem. Napětí ESI jehly bylo 5 kV. Díky využití derivatizace benzylchloridem autoři podpořili separaci analytů na dané koloně a oproti klasickým butyryl derivátům nebylo zapotřebí tak dlouhé odpařování. Zároveň využili ACN jakožto deproteinační činidlo, čímž umožnili zkrácení doby přípravy vzorku, protože ho využili i jako extrakční činidlo. Díky využití gradientu docílili úplné separace všech analytů v relativně krátkém čase analýzy. [35]

SCHWEDHELM a kolektiv provedli stanovení dimethylovaných L-argininů a L-argininu metodou HPLC s MS/MS. Vzorke plazmy byly nejprve aplikovány do

mikrotitrační destičky, jež byla předem potažena deuterovanými interními standardy. Do takto připravených jamek aplikovali 100 μL methanolu a následně 20 μL vzorku plazmy. Proteiny byly vysráženy během 5minutového třepání, dále byla provedena centrifugace, po které byl odebrán supernatant. Ten byl opařován po dobu 10 minut při 85 $^{\circ}\text{C}$, následovala derivatizace. K odparkům byl přidán butanol spolu s kyselinou chlorovodíkovou a tato směs byla nechána reagovat při 65 $^{\circ}\text{C}$ zakrytá hliníkovou folií po dobu 15 minut. Bylo možné nechat reakci běžet i odkrytou, záhřev ale musel být nastavený na 85 $^{\circ}\text{C}$ a reakce se prodloužila na 30 minut. Po reakci byla směs odpařena za stejných podmínek jako po srážení proteinů. Odparek byl rehydratován ve 100 μL 60% ACN s 0,1 % mravenčanu amonného. Rehydratační roztok měl upravené pH kyselinou mravenčí na pH 4. Následovala chromatografická separace, která probíhala na koloně Astec o délce 2 cm a průměru 1 mm s náplní tvořenou částicemi s navázaným teicoplaninem. Jako mobilní fázi zvolili autoři 60% ACN s 0,1 % mravenčanu amonného. Separace probíhala za izokratické eluce s průtokem 0,2 mL/min a teplotě kolony 28 $^{\circ}\text{C}$. Detekce probíhala pomocí tandemové hmotnostní spektrometrie s ESI ionizací. Napětí jehly bylo 5,6 kV a jako fragmentační plyn byl využit argon. Vzhledem k tomu, že byla provedena derivatizace, docházelo ke vzniku specifických fragmentů analytu. Autoři využili chromatografickou separaci, ne k rozdělení analytů, ale k oddělení matrice. Využití kolony s navázaným antibiotikem teicoplaninem, zvýšilo zadržování aminokyselin při současném zkrácení analýzy na 1,6 minuty. [40]

WINKLER a kolektiv provedli chromatografickou separaci dimethylovaných izomerů s tandemovou hmotnostní detekcí. Vzorek séra byl nejprve deproteinován methanolem v poměru 1:4. V nadbytku methanolu využitého k vysrážení proteinů byly rozpuštěny interní deuterované standardy. Po deproteinaci byl vzorek zfiltrován a opařen v proudu dusíku při 70 $^{\circ}\text{C}$. Následně byla provedena derivatizace butanolem a kyselinou chlorovodíkovou. Poté byly eluáty odpařeny v proudu dusíku při 70 $^{\circ}\text{C}$. Odparek byl před měřením rehydratován směsí 25% methanolu ve vodě s 0,1 % mravenčanu amonného. Vzorek byl separován na koloně Polaris C18 ether, která byla dlouhá 5 cm a průměr činil 2 mm. K eluci byl využit gradient vytvořený smícháváním mobilní fáze A o složení 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě a mobilní fáze B o složení 50 % ACN a 50 % methanolu. Gradient začínal na 95 % MF A po dobu 30 sekund následně až do druhé minuty bylo aplikováno 50 % MF A, poté následovalo opět 95 % MF A až do konce analýzy na 4 minutě. Teplota kolony byla 30 $^{\circ}\text{C}$ a průtok mobilních fází byl 0,3 mL/min. K detekci byl využit hmotnostní spektrometr s tripl kvadrupólem a ESI iontovým zdrojem jehož napětí bylo 5 kV. [41]

SERVILLO a kolektiv navázali stanovením derivátů L-argininu v plazmě na stanovení těchto aminokyselin v zelenině. Ke stanovení byla využita metoda HPLC s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Autoři uvádí, že výhodou této metody je stanovení analytu bez nutnosti předchozí derivatizace. Vzorky byly pouze deproteinovány přidavkem methanolu v poměru 1:3. Takto vzniklá směs byla následně zmrazena na 1 hodinu při -20 °C. Po rozmražení byla směs zcentrifugována a supernatant byl odebrán. Po odebrání byly roztoky odpařeny v proudu dusíku při 70 °C, a před měřením byly rehydratovány roztokem vody s 0,1% kyselinou mravenčí. Separace byla provedena na koloně Supelcosil, jenž je zástupce kolon určených pro normální fáze. Její délka byla 3,3 cm a průměr 4,6 mm. Jako mobilní fázi zvolili autoři směs 0,1% kyseliny mravenčí ve vodě (MF A) a 100 mM mravenčanu amonného ve vodě (MF B). Eluce byla izokratická při průtoku 0,1 mL/min. Autoři zkoušeli dva různé poměry mobilních fází, a to 90 % a 80 % mobilní fáze A. K hmotnostní detekci byla využita kvadrupólová iontová past s ESI iontovým zdrojem. Tímto pokusem dospěli k závěru, že rozlišení jednotlivých píků je lepší při poměru 90 % MF A a 10 % MF B, ale za cenu delší analýzy a širších píků. Tím poukázali na vztah mezi rozlišením jednotlivých píků a koncentrací mravenčanu amonného, kdy při vyšších koncentracích mravenčanu amonného dochází k zisku užších píků za cenu horšího rozlišení. [42]

PRAKTICKÁ ČÁST

3. Materiály a metoda stanovení

3.1 Přístroje, chemikálie a použitý materiál

3.1.1 Přístroje a software

- Hmotnostní spektrometr LCMS-8045 (Shimadzu, Japonsko)
- Kapalinový chromatograf LC-40B x3 (Shimadzu, Japonsko)
- Software Labsolution (Shimadzu, Japonsko)
- Kapalinový chromatograf LC-40D UV/VIS (Shimadzu, Japonsko)
- Čerpadlo LC-10ADvp (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
- Manuální dávkovací ventil Rheodyne® model PEEK – 9725i (IDEX Health&Science, Northbrook, IL, USA)
- Ochranná cela model 5020 (ESA, Chelmsford, MA, USA)
- Termostat pro separační kolonu CTO-10Asvp (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
- Detektor Coulochem® III (50W) (ESA, Chelmsford, MA, USA) s průtokovou analytickou buňkou model 5010A (ESA, Chelmsford, MA, USA)
- Chromatografický software Clarity (DataApex, Praha, Česká republika)
- Systém pro přípravu ultračisté vody model MicroPure UV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Přenosný pH/mV/°C metr model HI 8314 (HANNA instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA)
- Membránová vývěva (KNF, Freiburg, Německo)
- Vortex (Heidolph, Schwabach, Německo)
- Analytické váhy (OHAUS, Nänikon, Švýcarsko)
- Předvážky (KERN, Frankfurt, Německo)
- Ultrazvuková vodní lázeň K12 (Kraintech, Podhajska, Slovensko)
- Termovap, zařízení pro odpaření rozpouštědla (Ecom, České Meziříčí, Česká republika)

3.1.2 Chemikálie a plyny

- N^G, N^G -dimethyl-L-arginin dihydrochlorid (ADMA), $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N^G, N^G -dimethyl-L-arginin dihydrochlorid (di(p-hydroxyazobenzen-p'-sulfonát) (SDMA), $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

- Acetonitril pro LC-MS, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina mravenčí pro LC-MS, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Mravenčan amonný LC-MS, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina chlorovodíková 37%, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- 3-merkaptopropionová kyselina, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Ortho-ftalaldehyd, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hydrogenfosforečnan sodný, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Hydroxid sodný, $\geq 98\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA;)
- Boritan draselný tetrahydrát, $\geq 99,5\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina boritá, $\geq 99,5\%$ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Methanol LiChrosolv®, $\geq 99,8\%$ (Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Stlačený plynný dusík (Linde, Dublin, Irsko)
- Stlačený plynný argon 5.0 (Linde, Dublin, Irsko)
- Stlačený plynný vzduch

3.1.3 Pomůcky

- Chromatografická kolona ARION® Polar C18, 3,0 μm 150 mm \times 4,6 mm (Chromservis, Praha, Česká republika)
- SPE kolonky Strata™-X-C 33 μm Polymeric Strong Cation, 30 mg/1mL (Phenomenex, Torrance, CA, USA)
- Vakuový SPE manifold Visiprep™ (Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Polytetrafluorethylenové stříkačkové filtry CHROMAFIL® (Macherey-Nagel, Düren, Německo)
- Automatické pipety: 10 μL , 100 μL , 1000 μL (BioHit, Finsko)
- Mikrozkušavky Eppendorf: 1 500 μL
- Plastové extrakční zkumavky 15 mL
- Plastová stříčka (Fisher Scientific, Česká republika)
- Skleněná dávkovací stříkačka 100 μL
- Skleněné vialky
- Podtlaková filtrační aparatura pro filtraci mobilní fáze
- Laboratorní sklo

3.2 Příprava roztoků

Roztoky, mobilní fáze a příprava vzorku pro elektrochemickou detekci byla připravena přesně dle postupů uvedených v diplomové práci Anny Runčíkové. Vzorek EDTA plazmy pro elektrochemické stanovení byl získán odběrem vlastní krve. Následující příprava standardů a mobilních fází byla již pro HPLC UV/VIS a MS.[48]

3.2.1 Standardy

Zásobní roztok ADMA byl připraven o koncentraci 1,817 $\mu\text{mol/L}$ a byl rozdělen do 50 mikrozkušavek po 1 mL. Zásobní roztok SDMA byl vytvořen o koncentraci 331 $\mu\text{mol/L}$ a byl rozdělen do 20 mikrozkušavek po 1 mL. Takto připravené mikrozkušavky byly následně zmrazeny a uchovávány při $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Roztoky jednotlivých standardů byly vytvořeny o koncentraci 10 $\mu\text{mol/L}$ naředěním zásobních roztoků redestilovanou vodou. Směsný standard byl vytvořen smícháním obou roztoků v poměru 1:1, výsledný roztok měl následně 5 $\mu\text{mol/L}$ koncentraci obou standardů.

3.2.2 Mobilní fáze

Mobilní fáze A se skládala z 0,1% kyseliny mravenčí ve 2% acetonitrilu. Byla připravena přidáním 300 μL kyseliny mravenčí do 300 mL roztoku vzniklého smícháním 6 mL acetonitrilu s 294 mL redestilované vody. Připravená mobilní fáze byla odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut.

Mobilní fáze B byla složena z 0,1% kyseliny mravenčí ve 100% acetonitrilu. Byla připravena přidáním 300 μL kyseliny mravenčí do 300 mL roztoku acetonitrilu. Přichystaná mobilní fáze byla odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut.

Mobilní fáze C byla vytvořena rozpuštěním 1,26 g mravenčanu amonného, jehož výsledná koncentrace byla 40 mmol/L , v roztoku 4% acetonitrilu. Ten byl vytvořen smícháním 12 mL acetonitrilu s 500 mL redestilované vody. Připravená mobilní fáze byla přefiltrována a odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut.

Mobilní fáze D vznikla rozpuštěním 0,22 g mravenčanu amonného v roztoku 13% acetonitrilu. Výsledná koncentrace mravenčanu amonného činila 7 mmol/L . Roztok acetonitrilu vznikl smícháním 65 mL acetonitrilu s 500 mL redestilované vody. Připravená mobilní fáze byla přefiltrována a odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut.

Mobilní fáze E byla vytvořena smícháním 500 μL kyseliny mravenčí s 500 mL redestilované vody. Koncentrace kyseliny mravenčí byla 0,1 %. Připravená mobilní fáze byla odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut.

Mobilní fáze F se skládala z 40 mmol/L mravenčanu amonného (1,26 g) a 0,1% kyseliny mravenčí (500 μL). Objem mobilní fáze byl 500 mL. Připravená mobilní fáze byla přefiltrována a odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut.

Mobilní fáze G vznikla rozpuštěním 0,378 g mravenčanu amonného ve 300 mL redestilované vody, čímž byl vytvořen roztok o koncentraci 20 mmol/L. Připravená mobilní fáze byla přefiltrována a odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut.

Mobilní fáze H byla vytvořena smícháním 300 μL kyseliny mravenčí v roztoku o složení mobilní fáze G. Připravená mobilní fáze byla přefiltrována a odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut.

Mobilní fáze I se skládala z 20 mmol/L mravenčanu amonného (0,378 g) rozpuštěného ve 300 mL roztoku připraveného smícháním 30 mL ACN s 270 mL redestilované vody. Připravená mobilní fáze byla přefiltrována a odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut.

3.3 Stanovení dimethylovaných derivátů L-argininu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí.

Asymetrické a symetrické dimethyl L-argininy byly stanovovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

3.3.1 Chromatografická separace

Chromatografické dělení probíhalo na kapalinovém chromatografu Shimadzu LC-40B a byla využita ARION® Polar C18. Délka kolony činila 15 cm a její průměr byl 4,6 mm a velikost částic 3,0 μm . Jedná se o kolonu s oktadecylsilikagelem s polárním endcappingem.

Eluce byla izokratická a spočívala v různých poměrech jednotlivých mobilních fází. Po každé změně složení mobilní fáze následoval 15minutový equilibrační interval. Byly testovány i různé průtoky mobilních fází a teplot kolony pro zajištění co nejoptimálnějších podmínek pro separaci.

Eluce gradientová byla vytvořena z mobilních fází H (vodná mobilní fáze s 0,1 % kyseliny mravenčí a 20 mmol/L mravenčanu amonného) a I (10 % acetonitrilu s 0,1 % kyseliny mravenčí a 20 mmol/L mravenčanu amonného). Počáteční složení mobilní fáze bylo 0 %

mobilní fáze I a konečné 10 % mobilní fáze I, tak bylo dosaženo konečné koncentrace ACN 1 %. Dále byl testován gradient 0 až 50 % mobilní fáze I, kdy bylo dosaženo 5% koncentrace ACN. Poslední byl testován gradient s konečnou koncentrací ACN 10 %, čili 100 MF I. Tyto gradienty byly použity při průtoku 0,5 mL za minutu a teplotě kolony 25 °C. V obou případech analýza trvala 12 minut a 1 minutu následovala rovnováha kolony.

Přístroj byl vybaven autosamplrem, ve kterém byly umístěny 3 vialky, v prvních dvou po jednom ze standardu a ve třetí byla jejich směs. Teplota v autosamplru byla 20 °C. Nástřik vzorku byl 0,2 µL.

3.3.2 Hmotnostní detekce

K hmotnostní detekci byl využit hmotnostní spektrometr LC-MS 8045 značky Shimadzu. Tento přístroj byl vybaven tripl kvadrupólem, ionizaci zajišťoval elektrosprej.

Analyty byly ionizovány za vzniku $[M+H]^+$ iontů. Jako nebulizační a desolvatační plyn byl využíván dusík. Průtok nebulizačního plynu byl 3 L/min, průtok sušícího plynu 10 L/min v našem případě to byl vzduch a jeho teplota byla 400 °C. Teplota interfaceru byla 300 °C. Ionty byly sledovány v pozitivním módu, při napětí na vstupu kapiláry 4 kV.

Tripl kvadrupól byl nastavený pro monitorování více reakcí (MRM), takže byly detekovány fragmentační produkty obou izomerů z jednoho nebo více prekurzorových iontů. Prekurzorové ionty vybrané prvním kvadrupólem byly fragmentovány pomocí argonu, jakožto kolizního plynu. Tím došlo ke kolizi vyvolané disociaci (CID) ve druhém kvadrupólu. Následné kolizní produkty byly separovány třetím kvadrupólem.

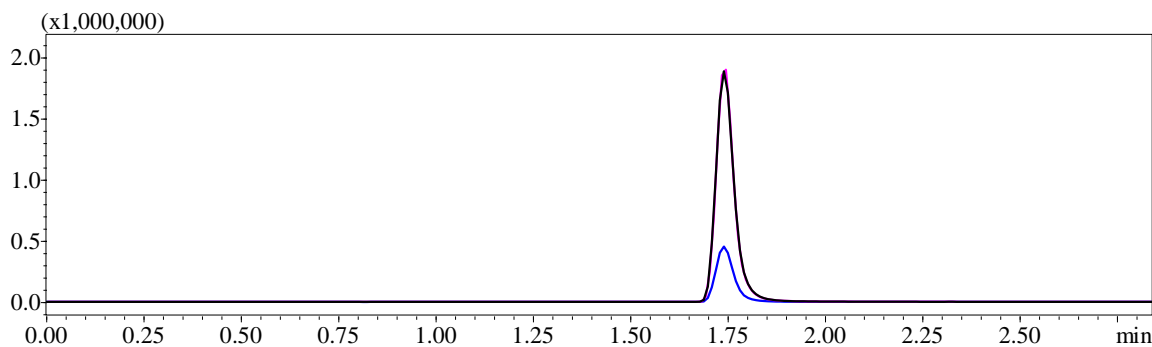
Sledovanými přechody pro ADMA byly $202,75 \rightarrow 70,20$ m/z, $202,75 \rightarrow 116,15$ m/z a $202,75 \rightarrow 46,05$ m/z. Pro SDMA jimi byly $202,75 \rightarrow 70,05$ m/z, $202,75 \rightarrow 116,20$ m/z a $202,75 \rightarrow 71,20$ m/z.

4. Výsledky

ADMA a SDMA byly separovány na koloně ARION® Polar C18 za různých izokratických a gradientových podmínek. Byly testovány i různé teploty kolony, tak aby byly vybrány nejvhodnější podmínky pro separaci. Pro detekci byl použit tripl kvadrupól s iontovým zdrojem ESI. Analyty byly ionizovány za vzniku $[M+H]^+$ iontů, které byly následně fragmentovány. Pro sledování všech analytů byla použita metoda MRM. Hmotnostní spektra obou izomerů jsou zobrazena níže na obrázcích 11 až 34.

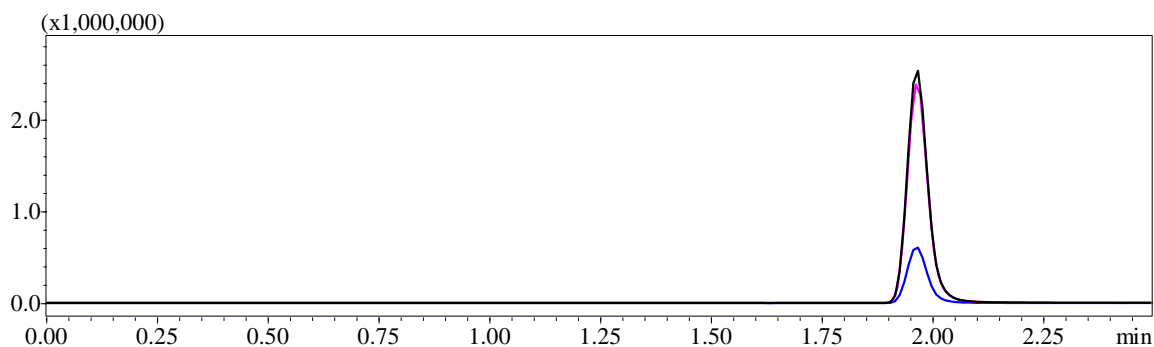
Nejprve byly změřeny specifické hmoty a následně byly měřeny retenční časy samostatných standardů obou látek. Prekurzorový iont měl hmotu 202,75 m/z a byl pro obě látky stejný. Proto došlo ke vzniku takřka totožných fragmentových iontů, ty se lišily pouze v jednom fragmentu, a to specifickým fragmentem 46 m/z pro ADMA. Z tohoto důvodu byl na většině obrázků zobrazen pouze totální iontový proud (TIC) pro ADMA, SDMA a fragment 46 m/z.

Výchozí složení mobilní fáze bylo 20 % MF (mobilní fáze) B a 80 % MF A, chromatogram lze vidět na obrázku 11. Tento poměr byl následně upraven na 5 % MF B a 95 % MF A, z důvodu prodloužení času retence, viz obrázek 12.



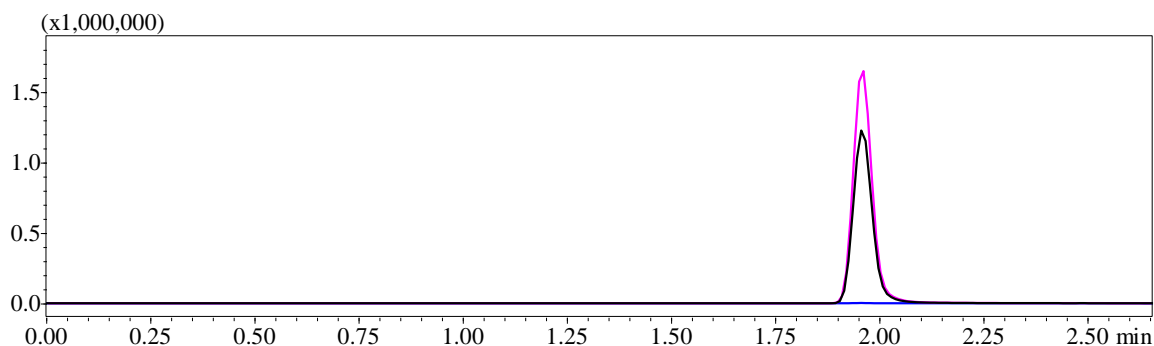
Obrázek 11 Retenční čas asymetrického dimethyl-L-argininu při 20 % acetonitrilu a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,8 mL/min, teplota kolony: 37 °C

80 % MF A a 20 % MF B, černý chromatogram je TIC (total ion current) ADMA, růžový chromatogram je TIC pro SDMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z.



Obrázek 12 Retenční čas asymetrického dimethyl-L-argininu při 5 % acetonitrilu a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,8 mL/min, teplota kolony: 37 °C

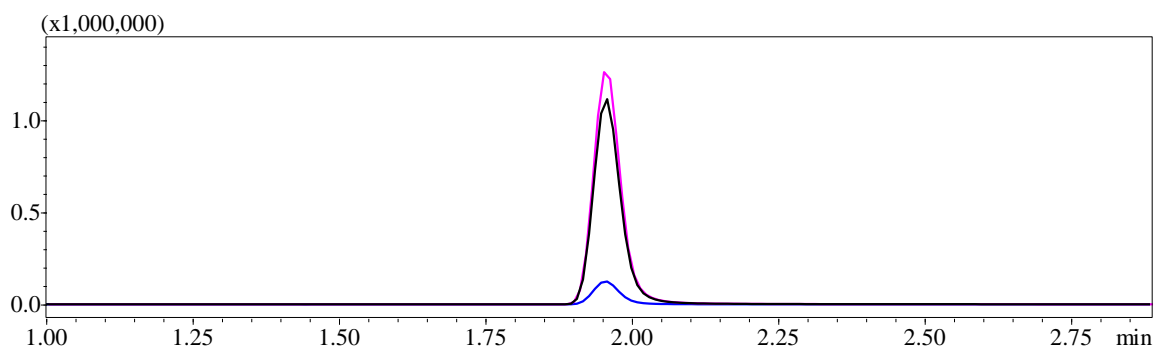
95 % MF A a 5 % MF B, černý chromatogram je TIC (total ion current) ADMA, růžový chromatogram je TIC pro SDMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z.



Obrázek 13 Retenční čas symetrického dimethyl-L-argininu při 5 % acetonitrilu a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,8 mL/min, teplota kolony: 37 °C

95 % MF A a 5 % MF B, černý chromatogram je TIC (total ion current) ADMA, růžový chromatogram je TIC pro SDMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z.

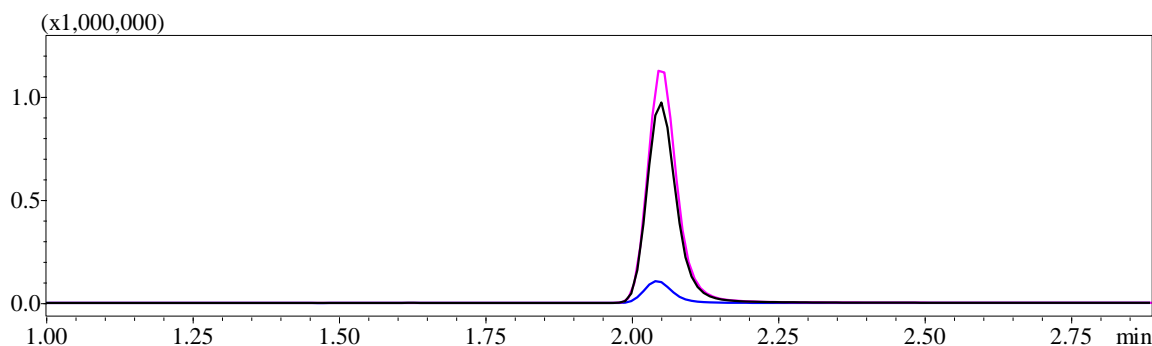
Z obrázků 12 a 13 je patrné, že retenční časy obou látek jsou takřka shodné. Následně bylo provedeno měření směšného standardu při 5 % ACN a 0,1 % kyseliny mravenčí.



Obrázek 14 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 5 % acetonitrilu a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,8 mL/min, teplota kolony: 37 °C

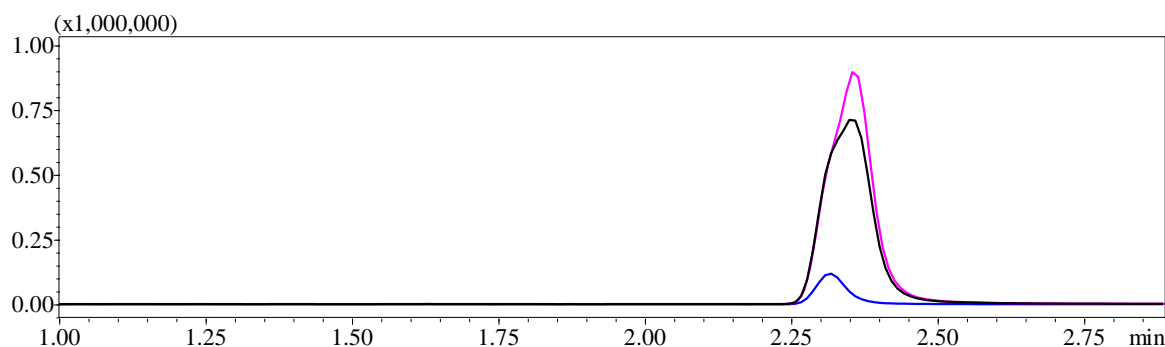
95 % MF A a 5 % MF B, černý chromatogram je TIC (total ion current) ADMA, růžový chromatogram je TIC pro SDMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z.

Z obrázku 14 je zřejmé, že za stávajících podmínek nedošlo k separaci. Z tohoto důvodu byly následně provedeny změny složení mobilní fáze s cílem, co nejlepší separace. Postupně byl snižován obsah organické složky mobilní fáze, viz obrázky 15 a 16.



Obrázek 15 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 3 % acetonitrilu a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,8 mL/min, teplota kolony: 37 °C

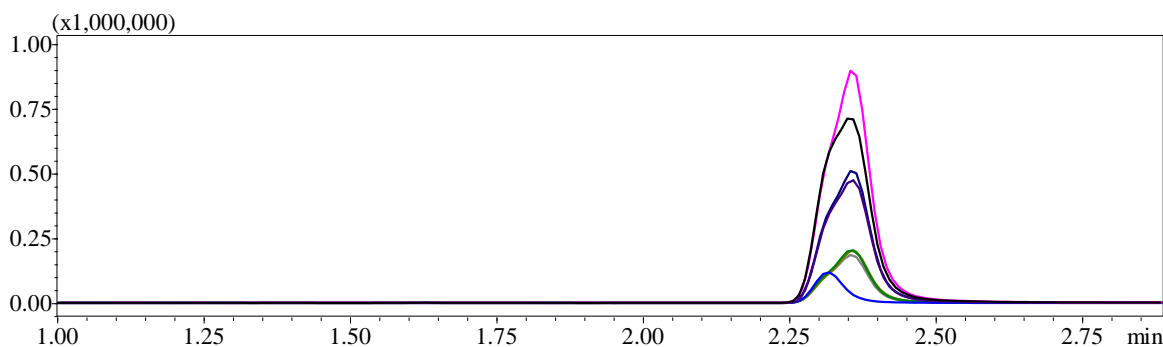
80 % MF A a 20 % MF B, černý chromatogram je TIC (total ion current) ADMA, růžový chromatogram je TIC pro SDMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z.



Obrázek 16 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 2 % acetonitrilu a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,8 mL/min, teplota kolony: 37 °C

100 % MF A, černý chromatogram je TIC (total ion current) ADMA, růžový chromatogram je TIC pro SDMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z.

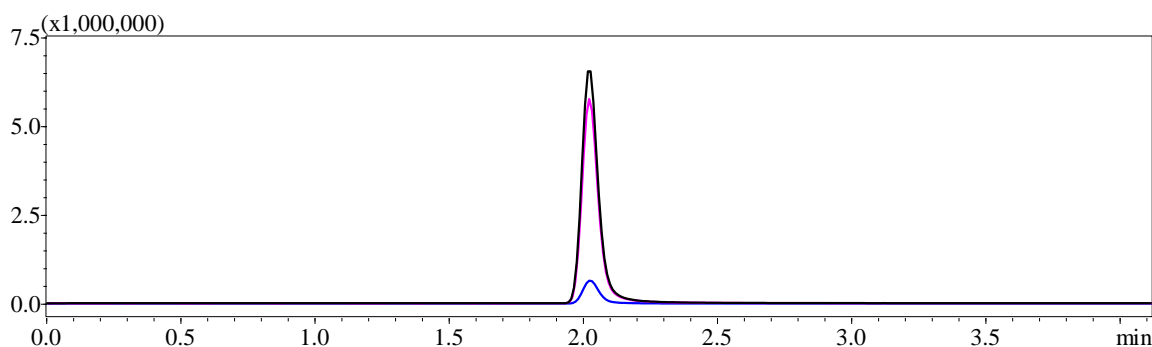
Z obrázku 16 je zjevný náznak separace při 2 % ACN v mobilní fázi společně s 0,1% kyselinou mravenčí. Z toho důvodu byl doplněn stejný záznam při zobrazení všech analyzovaných fragmentových iontů, viz obrázek 17.



Obrázek 17 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 2 % acetonitrilu a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,8 mL/min, včetně všech fragmentů, teplota kolony: 37 °C

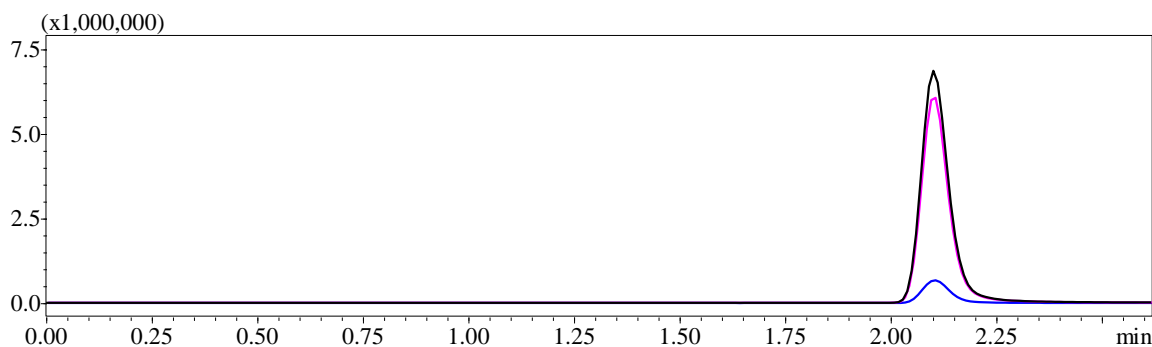
100 % MF A, černý chromatogram je TIC (total ion current) ADMA, růžový chromatogram je TIC pro SDMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z, fialový chromatogram je fragmentový iont ADMA 70,02 m/z, zelený chromatogram je fragmentový iont ADMA 116,15 m/z, hnědý chromatogram je fragmentový iont SDMA 70,05 m/z, žlutý chromatogram je fragmentový iont SDMA 116,20 m/z, šedý chromatogram je fragmentový iont SDMA 71,20 m/z.

Další fází bylo nahrazení kyseliny mravenčí mravenčanem amonným o různých koncentracích, z grafu níže je očividné, že tato změna měla vliv pouze na čas retence, který se mírně prodloužil s rostoucí koncentrací soli. Výsledných koncentrací bylo docíleno smícháním MF C a D v různých poměrech, viz obrázky 18, 19 a 20.



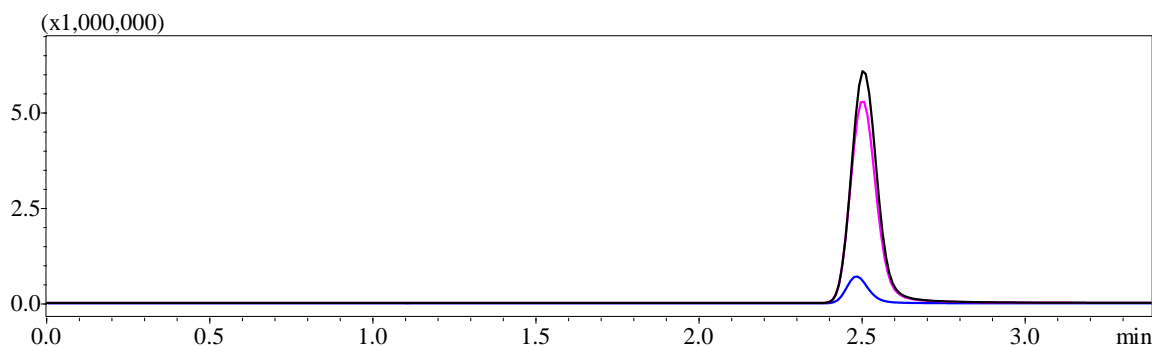
Obrázek 18 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 11 % acetonitrilu a 10,3 mmol/L mravenčanu amonného a průtoku 0,8 mL/min, teplota kolony: 37 °C

10 % MF C a 90 % MF D; černý chromatogram je TIC (total ion current) SDMA, růžový chromatogram je TIC pro ADMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z.



Obrázek 19 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 10 % acetonitrilu a 18,5 mmol/L mravenčanu amonného a průtoku 0,8 mL/min, teplota kolony: 37 °C

35 % MF C a 65 % MF D; černý chromatogram je TIC (total ion current) SDMA, růžový chromatogram je TIC pro ADMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z.

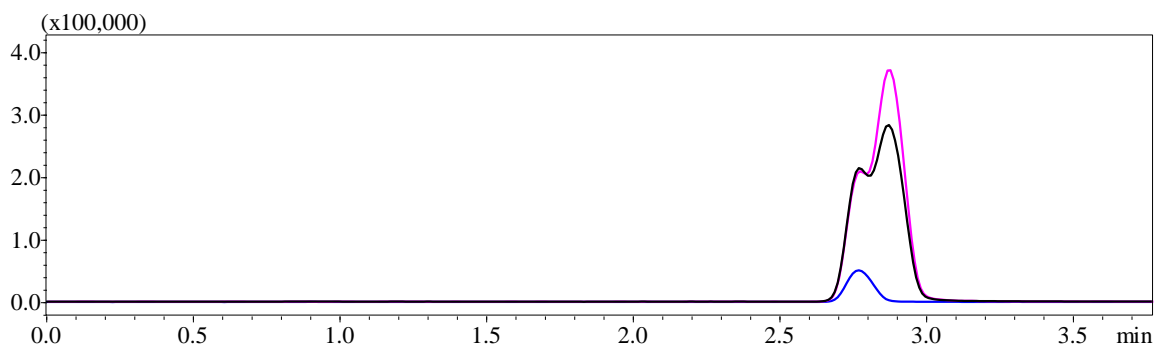


Obrázek 20 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 4 % acetonitrilu a 40 mmol/L mravenčanu amonného a průtoku 0,8 mL/min, teplota kolony: 37 °C

100 % MF C a 0 % MF D; černý chromatogram je TIC (total ion current) SDMA, růžový chromatogram je TIC pro ADMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z.

Bylo prokázáno, že samotná přítomnost mravenčanu amonného nemá vliv na separaci těchto izomerů, má vliv pouze na retenci, jenž se s rostoucí koncentrací prodlužuje.

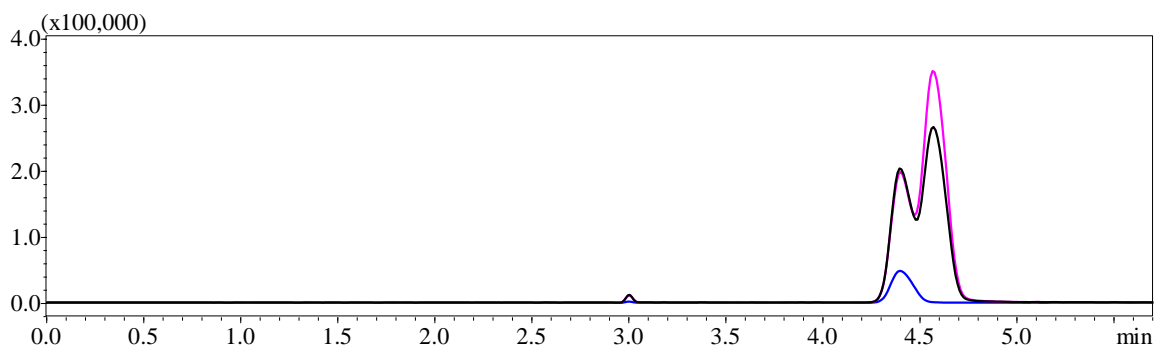
Vzhledem k předchozím zjištěním bylo dalším krokem přidání mravenčanu k MF A, čímž byla vytvořena mobilní fáze I. Ta se skládala z 2 % ACN, 0,1 % kyseliny mravenčí a mravenčanu amonného o koncentraci 20 mmol/L.



Obrázek 21 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 2 % acetonitrilu, 0,1 % kyseliny mravenčí a 20 mmol/L mravenčanu amonného a průtoku 0,8 mL/min, teplota kolony: 37 °C

100 % MF I; černý chromatogram je TIC (total ion current) ADMA, růžový chromatogram je TIC pro SDMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z.

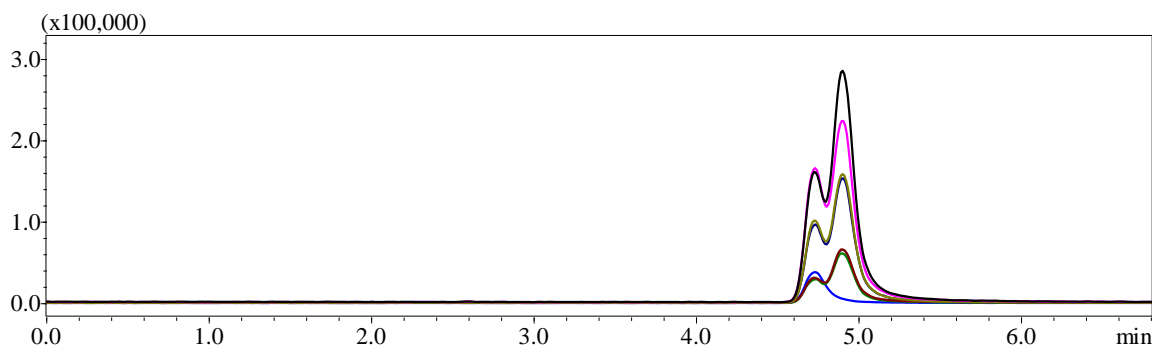
Při této kombinaci mobilní fáze došlo ke zlepšení separačních podmínek, jak je patrné z obrázku 21, ale také k desetinásobnému poklesu citlivosti. Z toho důvodu byl v dalším kroku upraven průtok MF z 0,8 mL/min na 0,5 mL/min. Jak je zřejmé z obrázku 22, tato změna měla opět pozitivní vliv na separaci izomerů. Z tohoto důvodu byl dále používán již tento průtok.



Obrázek 22 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 2 % acetonitrilu, 0,1 % kyseliny mravenčí a 20 mmol/L mravenčanu amonného a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 37 °C

100 % MF I; černý chromatogram je TIC (total ion current) ADMA, růžový chromatogram je TIC pro SDMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z.

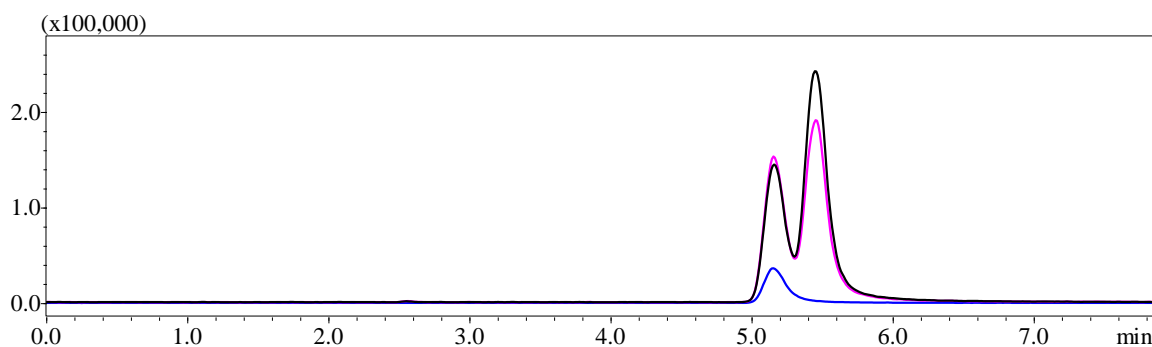
Dalším krokem bylo odebrání organické složky z mobilní fáze za současného ponechání pouze 0,1 % kyseliny mravenčí, viz obrázky 23 a 24 (všechny fragmenty). Současně s tím byl sledován i vliv různých průtoků, konkrétně 0,4 a 0,6 mL/min. Kdy změna průtoku měla vliv pouze na retenční čas, který začínal při průtoku 0,4 mL/min na 7,4 minutách a při průtoku 0,6 mL/min na 5,6 minutách. Tyto drobné změny průtoku měly zanedbatelný vliv na separaci.



Obrázek 23 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 37 °C, včetně všech fragmentů

100 % MF E; černý chromatogram je TIC (total ion current) ADMA, růžový chromatogram je TIC pro SDMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z, fialový chromatogram je fragmentový iont ADMA 70,02 m/z, zelený chromatogram je fragmentový iont ADMA 116,15 m/z, hnědý chromatogram je fragmentový iont SDMA 70,05 m/z, žlutý chromatogram je fragmentový iont SDMA 116,20 m/z, šedý chromatogram je fragmentový iont SDMA 71,20 m/z.

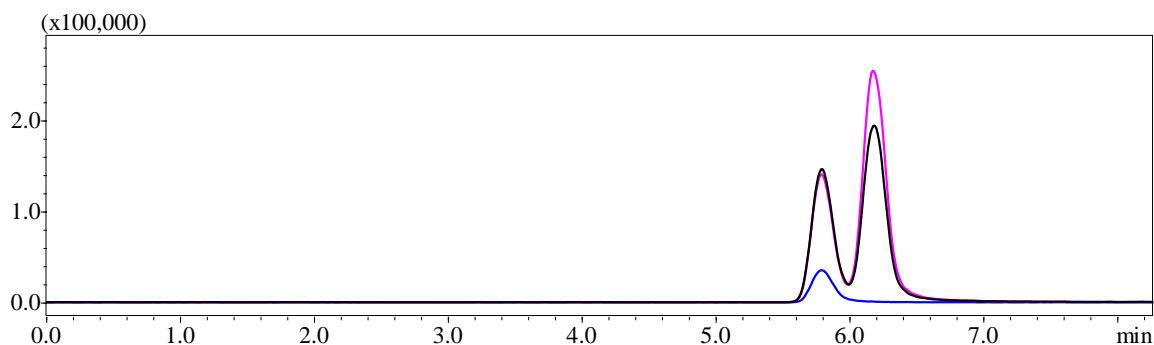
Jelikož odebrání organické složky z MF mělo spíše pozitivní vliv na separaci, ale ne dostatečný, byla proto postupně upravena teplota termostatu kolony z aktuálních 37 °C na 25 °C. Kdy při 30 °C byl pozorován významný vliv na separaci a při finálních 25 °C došlo ještě k významnější separaci.



Obrázek 24 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 25 °C

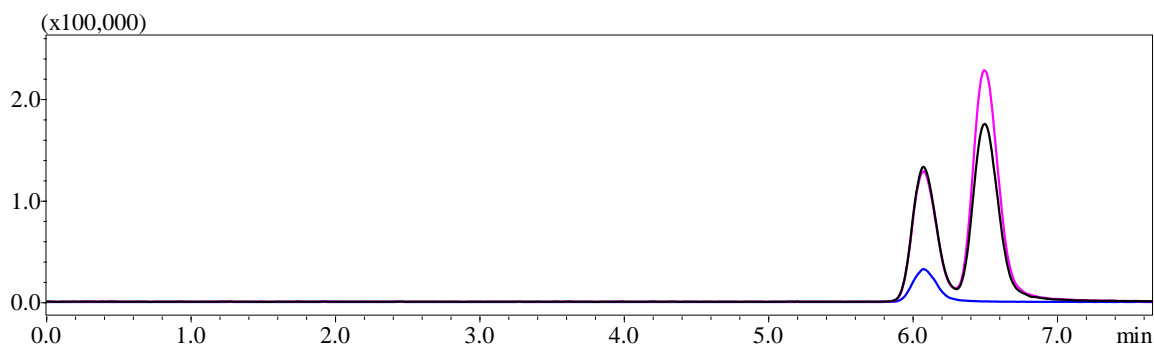
100 % MF E; černý chromatogram je TIC (total ion current) ADMA, růžový chromatogram je TIC pro SDMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z.

Z obrázku 24 je zřejmý významný vliv teploty kolony na separaci. Avšak stále nedošlo k dostatečné separaci, a z tohoto důvodu byl přidán mravenčan amonný, u něhož byl pozorován pozitivní vliv na separaci, viz výše. Ten byl přidáván v různých koncentracích smícháváním MF E a G, viz obrázky 25 až 28. Zbylé podmínky separace byly ponechány stejné, a to teplota kolony 25 °C a průtok 0,5 mL/min.



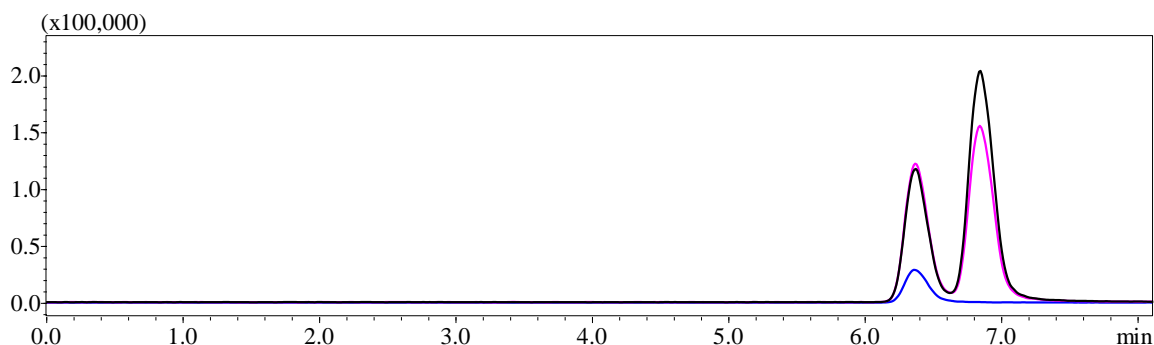
Obrázek 25 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 5 mmol/L mravenčanu amonného a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 25 °C

13 % MF F a 87 % MF E; černý chromatogram je TIC (total ion current) ADMA, růžový chromatogram je TIC pro SDMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z.



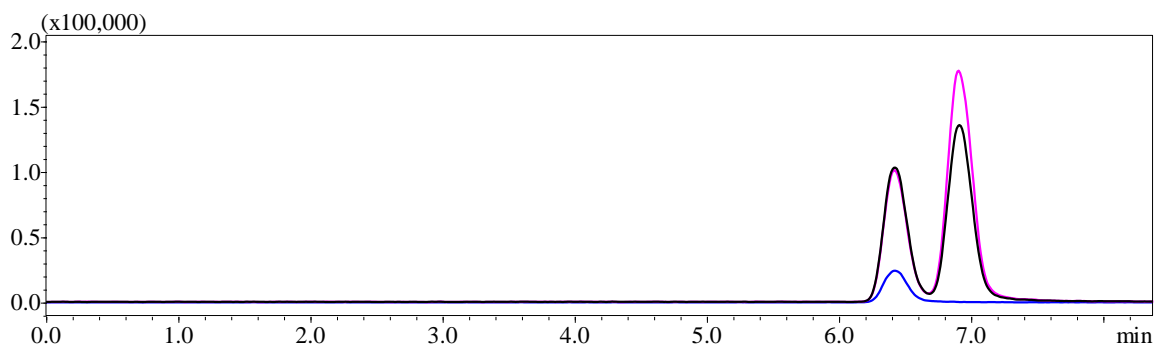
Obrázek 26 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 10 mmol/L mravenčanu amonného a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 25 °C

25 % MF F a 75 % MF E; černý chromatogram je TIC (total ion current) ADMA, růžový chromatogram je TIC pro SDMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z.



Obrázek 27 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 20 mmol/L mravenčanu amonného a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 25 °C

50 % MF F a 50 % MF E; černý chromatogram je TIC (total ion current) ADMA, růžový chromatogram je TIC pro SDMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z.

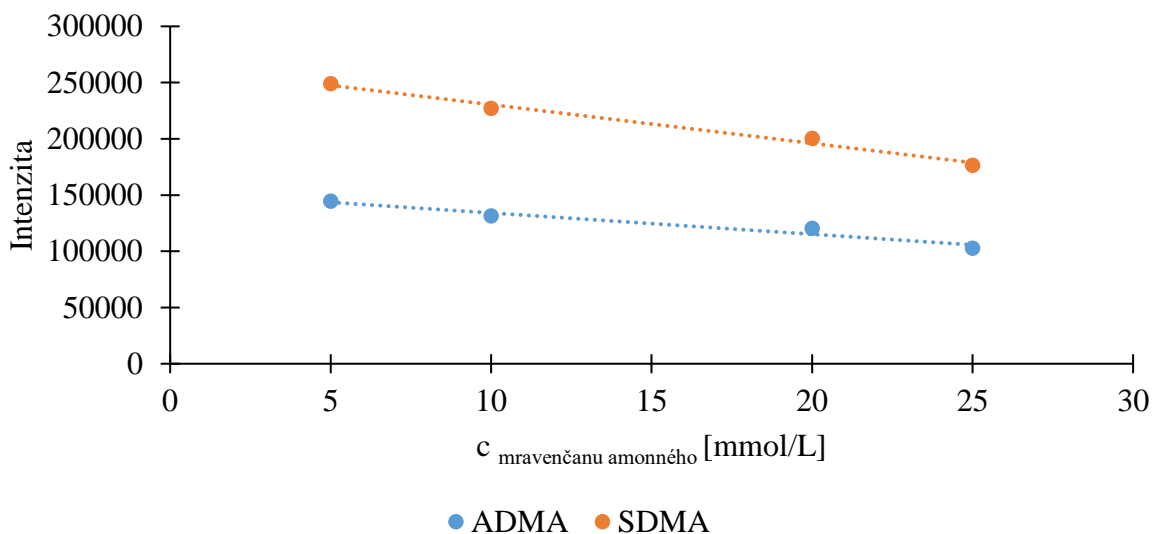


Obrázek 28 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 25 mmol/L mravenčanu amonného a 0,1 % kyseliny mravenčí a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 25 °C

63 % MF F a 37 % MF E; černý chromatogram je TIC (total ion current) ADMA, růžový chromatogram je TIC pro SDMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z.

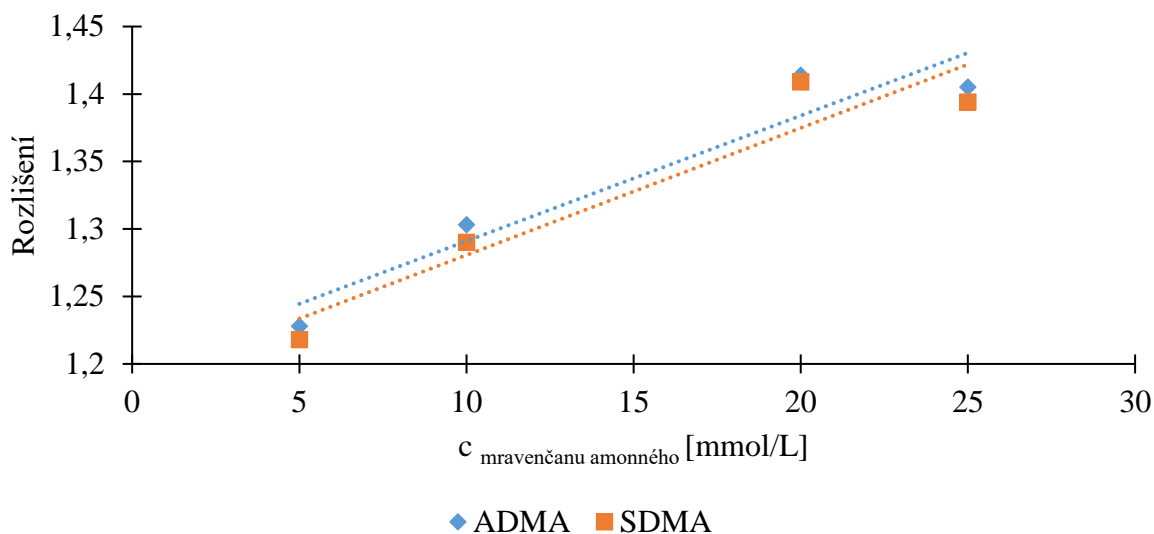
Kombinace kyseliny mravenčí a mravenčanu amonného měly pozitivní vliv na separaci, avšak za cenu snížení intenzity píků. Závislosti koncentrací mravenčanu amonného na rozlišení a na intenzitě jsou znázorněny na grafech níže, obrázek 29. Vliv na retenční časy byl zanedbatelný.

Závislost intenzity na koncentraci mravenčanu amonného



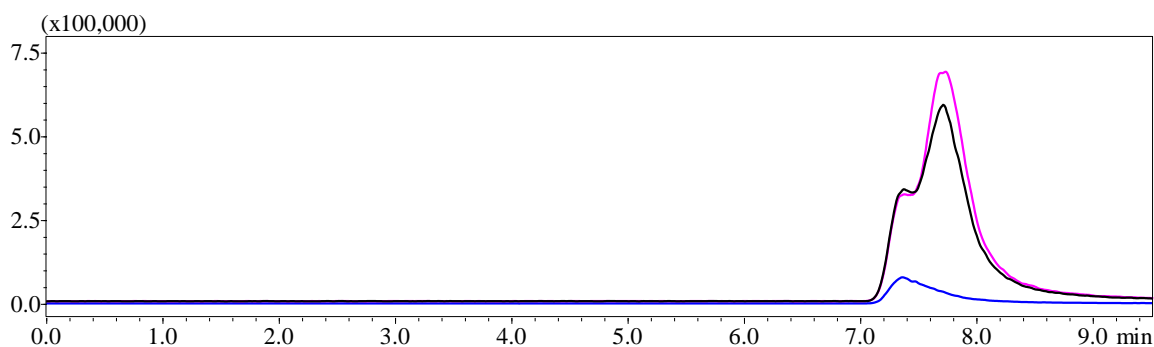
Obrázek 29 Závislost intenzity na koncentraci mravenčanu amonného

Závislost rozlišení na koncentraci mravenčanu amonného



Obrázek 30 Závislost rozlišení na koncentraci mravenčanu amonného

Z grafu na obrázku 30 je zjevné, že nejvyššího rozlišení bylo dosaženo při 20mmol/L koncentraci mravenčanu amonného. Současně je však očividné, že jeho přítomnost snižuje intenzitu píků. Pro ověření společného vlivu na separaci byla provedena analýza s MF G, kdy nebyla přítomna kyselina mravenčí, ale jen 20mmol/L mravenčan amonný. Výsledkem bylo, že jeho samostatný vliv na úspěšnost separace je nedostatečný, viz obrázek 31.

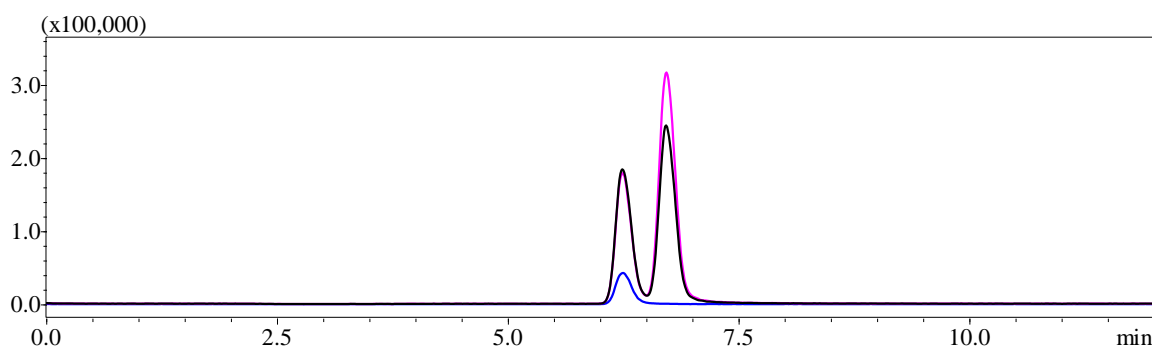


Obrázek 31 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při 20 mmol/L mravenčanu amonného a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 25 °C

100 % MF G; černý chromatogram je TIC (total ion current) ADMA, růžový chromatogram je TIC pro SDMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z.

Po stanovení optimálních izokratických podmínek byla provedena série měření při různých gradientech mobilních fází. Cílem bylo zjistit, zda nepatrně rostoucí množství organické složky bude mít vliv na chromatografickou separaci. Nejprve byl nastaven gradient,

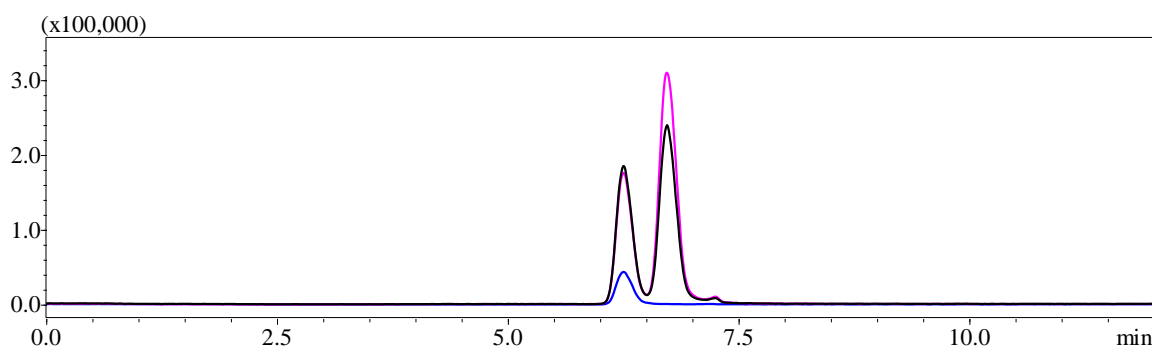
na jehož konci, tedy na 10 minutě, bylo dosaženo 1% koncentrace acetonitrilu. Z obrázku 32 je vidět, že to nemělo žádný vliv na výsledek separace.



Obrázek 32 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při gradientové eluci s konečnou koncentrací acetonitrilu 1 %, 20 mmol/L mravenčanu amonného a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 25 °C

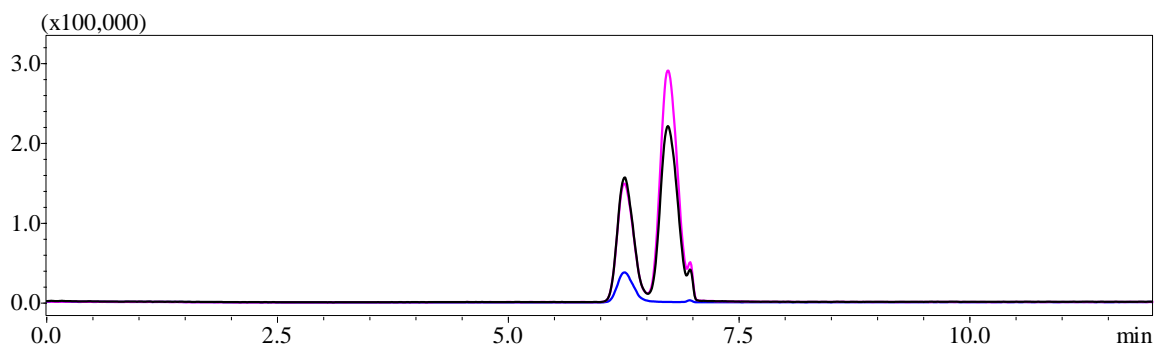
0–10 % MF I a 100–90 % MF H, černý chromatogram je TIC (total ion current) ADMA, růžový chromatogram je TIC pro SDMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z.

Další gradient dosahoval na svém konci již 5 % ACN. Záznam lze vidět na obrázku 33. Ani v tomto případě to nemělo na výsledek separace žádný zásadní vliv. Jako poslední gradient byl zvolen takový, při kterém bylo dosaženo na konci analýzy 10 % ACN. Stejně jako v předchozích případech, tak ani z obrázku 34 není vidět, že by tento lineární gradient měl nějaký vliv na separaci.



Obrázek 33 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při gradientové eluci s konečnou koncentrací acetonitrilu 5 %, 20 mmol/L mravenčanu amonného a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 25 °C

0–50 % MF I a 100–50 % MF H, černý chromatogram je TIC (total ion current) ADMA, růžový chromatogram je TIC pro SDMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z.



Obrázek 34 Separace asymetrického a symetrického dimethyl-L-argininu při gradientové eluci s konečnou koncentrací acetonitrilu 10 %, 20 mmol/L mravenčanu amonného a průtoku 0,5 mL/min, teplota kolony: 25 °C

0–100 % MF I a 100–0 % MF H, černý chromatogram je TIC (total ion current) ADMA, růžový chromatogram je TIC pro SDMA, modrý chromatogram je specifický fragment pro ADMA, konkrétně 46 m/z.

DISKUSE

Methylované L-argininy jsou neesenciální, neproteinogenní aminokyseliny, které hrají v organismu důležitou roli v oblasti genové exprese. Patří mezi ně monomethyl-L-arginin (MMA), symetrický dimethyl-L-arginin (SDMA) a asymetrický dimethyl-L-arginin (ADMA). Všechny tyto deriváty L-argininu vznikají za katalýzy enzymem protein-arginin methyltransferasou. ADMA a SDMA jsou následně z proteinu uvolněny při hydrolýze, kdy se dostávají do cytoplazmy a potažmo do celého organismu. Plazmatické koncentrace obou jsou mnoho násobně nižší než jejich intracelulární koncentrace, proto i nepatrná změna těchto koncentrací může znamenat zásadní problém. ADMA se vyskytuje v plazmě v rozmezí od 0,4 do 0,5 $\mu\text{mol/L}$ a SDMA od 0,5 do 0,7 $\mu\text{mol/L}$. ADMA je takřka úplně degradován enzymaticky za účasti enzymu dimethylarginin dimethylaminohydrolasy, který je specificky orientován na ADMA a MMA. Při této reakci vzniká L-citrulin. Oproti tomu je SDMA z těla vylučován v nezměněné formě ledvinami. Mají zásadní význam pro rozvoj kardiovaskulárních onemocnění v čele s aterosklerózou a také pro rozvoj chronických onemocnění ledvin. SDMA je také pro svoji 100% vyloučitelnost ledvinami považován za vhodnější biomarker funkce ledvin než kreatinin. [5, 17, 18, 19, 20, 29, 38, 39]

Tato práce navazuje na diplomovou práci Anny Runčíkové „Stanovení asymetrického dimethyl-L-argininu v lidské plazmě“. Z toho důvodu byly úvodní kroky směřovány k pochopení úskalí při stanovení dimethylovaných L-argininů pomocí coulochemické detekce. Aby bylo možné provést tento typ detekce, je nezbytné provést derivatizaci pomocí OPA a MPA. Tento krok značně prodlužuje analýzy a zvyšuje riziko kontaminace vzorku. Další nevýhodou je nízká stabilita derivatizačního činidla a samotné směsi. Proto je nutné připravovat vždy čerstvý derivatizační roztok. Dalším úskalím je extrakce, která byla prováděna pomocí SPE kolonek, po které následovala dlouhá doba vysoušení proudem dusíku. Při samotné detekci, která byla prováděna po separaci na koloně Arion Polar C18, bylo v záznamu přítomno stále velké množství interferencí, které zhoršovaly identifikaci analytů. Zároveň se nepovedlo zcela separovat interní standard MMA od interferujících píků. Často se také objevovali interference u píku ADMA. Doba analýzy byla poměrně dlouhá trvala bezmála 40 minut. Z těchto důvodů se tato práce zaměřila na stanovení ADMA a SDMA pomocí HPLC s tandemovou hmotnostní detekcí. [48]

Nejprve byla provedena série pokusů s využitím HPLC s UV detekcí, aby byla otestována separace nederivatizovaných dimethyl-L-argininů při použití s hmotnostním spektrometrem kompatibilních mobilních fází, před tím, než proběhnou měření na hmotnostním

spektrometru. Bohužel tato práce došla ke stejnému závěru jako studie před námi. Dimethylované L-argininy není možné stanovit, a to ani při udávané ideální vlnové délce 200 nm. Při této detekci nebylo dosaženo takřka žádného signálu, a to ani přes aplikování vysokých koncentrací standardů obou analytů. Kvůli tomu byly všechny separační parametry metody testovány až na hmotnostním spektrometru. [32, 45]

Vzhledem k tomu, že derivatizace značně prodlužuje analýzu, byla zvolena cesta analyzování nederivatizovaných dimethyl L-argininů. Po provedení základních přípravných kroků pro uvedení hmotnostního spektrometru do chodu byly nejprve zjištěny fragmenty tvořené jednotlivými standardy. K tomu byla využita základní mobilní fáze pro hmotnostní spektrometry ACN s vodou a 0,1 % kyseliny mravenčí. Bohužel jsme oproti ostatním studiím nedetekovali signifikantní fragmenty pro oba methylované deriváty, ale pouze pro ADMA. Jedná se o fragment 46 m/z, který je na chromatografických záznamech znázorněn modrým chromatogramem. Signifikantní pík pro SDMA, fragment 172 m/z, nedosahoval potřebné intenzity.

Po určení poměrů m/z bylo provedeno určení retenčních časů obou methylovaných derivátů. Počáteční koncentrace organické složky v mobilní fázi byla 20 % ACN. Jelikož byly analyty velmi rychle eluovány, byl obsah acetonitrilu snížen na 5 %. I poté byly analyty vymyty z kolony příliš rychle. Vzhledem k tomu, že se strukturální vzorce izomerů ADMA a SDMA liší pouze nepatrně, jejich retence byla takřka totožná, viz obrázky 12 a 13. A vzhledem k absenci signifikantních píků bylo nutné docílit jejich rozseparování. Z toho důvodu byl dále snižován obsah organické složky v mobilní fázi. Při snížení obsahu ACN na 2 % byl pozorován náznak separace, viz obrázek 16.

Řada studií využívala pro zlepšení vzájemné separace mravenčan amonný, proto byl testován jeho vliv při využití 2 % ACN. Byly zkoušeny různé koncentrace této soli, avšak jak je patrné z obrázků 18 až 20, jeho samotná přítomnost separaci neumožní. Pouze na obrázku 20 bylo pozorováno, že signifikantní pík fragmentu 46 m/z se přibližoval spíše k jedné straně celkových iontových proudů. Dále bylo pozorováno, že jeho přítomnost v mobilní fázi prodlužuje retenční časy v závislosti na jeho koncentraci. [40, 41, 42]

Poté byl mravenčan amonný přidán do mobilní fáze s 2 % ACN a 0,1 % kyseliny mravenčí. Zde již byl vidět posun k lepší separaci, avšak stále nedostatečný, viz obrázek 21. Jelikož byl viděn náznak separace, byl změněn průtok ve snaze o nepatrné rozšíření píků, a tím

i zlepšení separace. Nakonec byl vybrán průtok mobilní fáze 0,5 mL/min, viz obrázek 22, protože šlo o kompromis mezi délkou analýzy a kladným vlivem na separaci.

Vzhledem k tomu, že separace byla stále nedostatečná, byla provedena další změna mobilní fáze, při které byla odstraněna organická složka a byla ponechána pouze 0,1% kyselina mravenčí. Tento krok byl konzultován s výrobcem kolony, který nám potvrdil, že tato kolona by s tím neměla mít vážnější problém ani při dlouhodobém používání u velkého množství vzorků. Tímto krokem došlo opět k prodloužení retenčních časů, ale zároveň i ke zlepšení vzájemné separace, viz obrázek 23. Dále byla provedena změna teploty kolony, která byla doposud vyhřívána na 37 °C. Postupně byla teplota snížena na 25 °C, což byla limitující teplota termostatu. Tato změna však měla další pozitivní vliv na separaci, jak je patrné z obrázku 24.

Jak již bylo dříve ověřeno, mravenčan amonný v kombinaci s kyselinou mravenčí má kladný vliv na separaci. Kvůli tomu byl následně přidán i do této vodné mobilní fáze. Vzhledem k tomu, že různé studie uváděly různé koncentrace této soli, bylo provedeno srovnání různých koncentrací. Chromatografické záznamy lze vidět na obrázcích 25 až 28. Z grafu na obrázku 29 je vidět, že rostoucí koncentrace mravenčanu amonného má nepatrný negativní vliv na intenzitu signálu. Z grafu na obrázku 30 je patrné, že nejlepšího rozlišení bylo dosaženo při koncentraci 20 mmol/L mravenčanu amonného. Dále bylo znovu ověřeno, že samotná přítomnost mravenčanu amonného nezajistí separaci ani při námi zjištěných neoptimálnějších podmínkách, viz obrázek 31.

Po stanovení neoptimálnější izokratických podmínek bylo ale rozlišení píků stále pod hodnotou 1,5, z toho důvodu bylo testováno využití jemné gradientové eluce s postupným přidáváním organické složky. Lineární gradienty trvaly vždy 10 minut a na jejich konci bylo dosaženo maximálních koncentrací ACN. Nejprve byl zkoušen gradient s konečnou koncentrací 1 %, pak 5 %, a na konec 10 % ACN. Jak je patrné z obrázků 32 až 34, gradienty mají neutrální vliv na separaci. Jemné gradienty významněji nezhoršili rozlišení, ale zkrátily dobu analýzy tak, aby bylo možné ještě snížit průtok mobilní fáze, ale na separaci už to nemělo významný vliv.

Vzhledem k tomu, že neoptimálnější separace bylo dosaženo při izokratických podmínkách, bychom do budoucna tuto cestu upřednostňovali, oproti využití gradientu. Jelikož matrice vzorku obsahuje mnoho potenciálně problematických látek, je nutné důkladně připravit preanalytickou fázi. Při využití coulochemu byl vzorek extrahován na SPE kolonkách, přičemž se v extraktu stále vyskytovaly interferující látky, současně byl následný krok odpaření

extraktu velmi zdlouhavý a zároveň nezbytný. Z tohoto důvodu bychom se přikláněli spíše k využití extrakce metanolem, který provede deproteinaci. Supernatant pak bude moci být přímo aplikován, nebo bude odpařen a rozpuštěn v mobilní fázi. Samozřejmostí je aplikace deuterovaných vnitřních standardů pro další potlačení matricového efektu.

ZÁVĚR

Asymetrické a symetrické dimethyl-L-argininy jsou neproteinogenní aminokyseliny vznikající posttranslační modifikací L-argininu. Jejich využití v klinické biochemii spočívá v predikci řady onemocnění, v čele s kardiovaskulárními chorobami a chronickými chorobami ledvin. Současně jsou zvažovány jako potenciální protinádorová léčiva. Jelikož se jedná o velmi podobné látky lišící se v pozici methylu na sousedících uhlících, je jejich vzájemné stanovení značně problematické. Byla vytvořena cesta pro zavedení metody, díky které bude možné stanovit oba dimethylované strukturní izomery L-argininu současně a bez derivatizace. K separaci byla využita kolona Arion Polar C18, která je určena pro reverzní fáze. Dalším úspěchem bylo dělení obou analytů za izokratických podmínek.

Do budoucna bude však nutné využití deuterovaných vnitřních standardů pro potlačení matricových efektů. Zároveň bude nutné změřit analytické parametry, jakožto přesnost, správnost a reprodukovatelnost. Nejdůležitějším krokem však bude příprava vzorku k analýze, neboť extrakční krok hraje nejzásadnější roli pro kvalitativní a kvantitativní stanovení.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] MORRIS, Sidney M. Arginine Metabolism: Boundaries of Our Knowledge. Online. *The Journal of Nutrition*. 2007, roč. 137, č. 6, s. 1602S-1609S. ISSN 00223166. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jn/137.6.1602S>. [cit. 2024-03-26].
- [2] CHEN, Wen-Hua; CHEN, Chia-Hui; HSU, Man-Chen; CHANG, Ru-Wen; WANG, Chih-Hsien et al. Advances in the molecular mechanisms of statins in regulating endothelial nitric oxide bioavailability: Interlocking biology between eNOS activity and L-arginine metabolism. Online. 2024, roč. 171. ISSN 07533322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116192>. [cit. 2024-05-05].
- [3] LEE, Tien F.; BERSTEN, Andrew D.; HEILBRONN, Leonie K.; ZINELLU, Angelo; CARRU, Ciriaco et al. ADMA and homoarginine independently predict mortality in critically ill patients. Online. *Nitric Oxide*. 2022, roč. 122-123, s. 47-53. ISSN 10898603. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2022.03.002>. [cit. 2024-03-26].
- [4] SAWANO, Toshinori; TSUCHIHASHI, Ryo; WATANABE, Fumiya; NIIMI, Kenta; YAMAGUCHI, Wataru et al. Changes in L-arginine metabolism by Sema4D deficiency induce promotion of microglial proliferation in ischemic cortex. Online. *Neuroscience*. 2019, roč. 406, s. 420-431. ISSN 03064522. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2019.03.037>. [cit. 2024-05-05].
- [5] TEERLINK, Tom. HPLC analysis of ADMA and other methylated l-arginine analogs in biological fluids. Online. *Journal of Chromatography B*. 2007, roč. 851, č. 1-2, s. 21-29. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.024>. [cit. 2024-05-01].
- [6] CSISZAR, Beata; MARTON, Zsolt; RIBA, Janos; CSECSEI, Peter; NAGY, Lajos et al. L-arginine, asymmetric and symmetric dimethylarginine for early outcome prediction in unselected cardiac arrest victims: a prospective cohort study. Online. *Internal and Emergency Medicine*. 2022, roč. 17, č. 2, s. 525-534. ISSN 1828-0447. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s11739-021-02767-z>. [cit. 2024-03-26].
- [7] JANISIAK, Joanna; KOPYTKO, Patrycja; TKACZ, Marta; ROGIŃSKA, Dorota; PERUŻYŃSKA, Magdalena et al. Protein Arginine Methyltransferase (PRMT) Inhibitors—AMI-1 and SAH Are Effective in Attenuating Rhabdomyosarcoma Growth and Proliferation in Cell Cultures. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021, roč. 22, č. 15. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms22158023>. [cit. 2024-04-02].
- [8] BEDFORD, Mark T. a CLARKE, Steven G. Protein Arginine Methylation in Mammals: Who, What, and Why. Online. *Molecular Cell*. 2009, roč. 33, č. 1, s. 1-13. ISSN 10972765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.12.013>. [cit. 2024-04-02].
- [9] EL-KHOUEIRY, Anthony B.; CLARKE, James; NEFF, Tobias; CROSSMAN, Tim; RATIA, Nirav et al. Phase 1 study of GSK3368715, a type I PRMT inhibitor, in patients with advanced solid tumors. Online. *British Journal of Cancer*. 2023, roč. 129, č. 2. ISSN 0007-0920. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41416-023-02276-0>. [cit. 2024-04-02].
- [10] TEWARY, Sunil Kumar; ZHENG, Y. George a HO, Meng-Chiao. Protein arginine methyltransferases: insights into the enzyme structure and mechanism at the atomic level. Online. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2019, roč. 76, č. 15, s. 2917-2932. ISSN 1420-682X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03145-x>. [cit. 2024-04-02].
- [11] MOTOLANI, Aishat; MARTIN, Matthew; SUN, Mengyao a LU, Tao. The Structure and Functions of PRMT5 in Human Diseases. Online. *Life*. 2021, roč. 11, č. 10. ISSN 2075-1729. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/life11101074>. [cit. 2024-05-05].

- [12] MORRIS, Sidney M. Arginine Metabolism Revisited. Online. *The Journal of Nutrition*. 2016, roč. 146, č. 12, s. 2579S-2586S. ISSN 00223166. Dostupné z: <https://doi.org/10.3945/jn.115.226621>. [cit. 2024-04-04].
- [13] MARTENS-LOBENHOFFER, Jens a BODE-BÖGER, Stefanie M. Amino acid N-acetylation: Metabolic elimination of symmetric dimethylarginine as symmetric N α -acetyldimethylarginine, determined in human plasma and urine by LC-MS/MS. Online. *Journal of Chromatography B*. 2015, roč. 975, s. 59-64. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.11.009>. [cit. 2024-04-04].
- [14] RODIONOV, Roman N.; JARZEBSKA, Natalia; WEISS, Norbert a LENTZ, Steven R. AGXT2: a promiscuous aminotransferase. Online. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2014, roč. 35, č. 11, s. 575-582. ISSN 01656147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2014.09.005>. [cit. 2024-04-04].
- [15] POPE, Arthur J.; KARRUPIAH, Kanchana; KEARNS, Patrick N.; XIA, Yong a CARDOUNEL, Arturo J. Role of Dimethylarginine Dimethylaminohydrolases in the Regulation of Endothelial Nitric Oxide Production. Online. *Journal of Biological Chemistry*. 2009, roč. 284, č. 51, s. 35338-35347. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.037036>. [cit. 2024-04-04].
- [16] EMRICH, Insa E.; ZAWADA, Adam M.; MARTENS-LOBENHOFFER, Jens; FLISER, Danilo; WAGENPFEIL, Stefan et al. Symmetric dimethylarginine (SDMA) outperforms asymmetric dimethylarginine (ADMA) and other methylarginines as predictor of renal and cardiovascular outcome in non-dialysis chronic kidney disease. Online. *Clinical Research in Cardiology*. 2018, roč. 107, č. 3, s. 201-213. ISSN 1861-0684. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00392-017-1172-4>. [cit. 2024-04-06].
- [17] ALDÁMIZ-ECHEVARRÍA, Luis a ANDRADE, Fernando. Asymmetric Dimethylarginine, Endothelial Dysfunction and Renal Disease. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2012, roč. 13, č. 9, s. 11288-11311. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms130911288>. [cit. 2024-04-08].
- [18] OLIVA-DAMASO, Elena; OLIVA-DAMASO, Nestor; RODRIGUEZ-ESPARRAGON, Francisco; PAYAN, Juan a BAAMONDE-LABORDA, Eduardo. Asymmetric (ADMA) and Symmetric (SDMA) Dimethylarginines in Chronic Kidney Disease: A Clinical Approach. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, roč. 20, č. 15. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms20153668>. [cit. 2024-04-08].
- [19] TAIN, You-Lin a HSU, Chien-Ning. Toxic Dimethylarginines: Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Symmetric Dimethylarginine (SDMA). Online. *Toxins*. 2017, roč. 9, č. 3. ISSN 2072-6651. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/toxins9030092>. [cit. 2024-04-08].
- [20] BAHL, Martin; FRIEDRICH, Nele; ATZLER, Dorothee; FELIX, Stephan B.; NAUCK, Matthias A. et al. L-Arginine and SDMA Serum Concentrations Are Associated with Subclinical Atherosclerosis in the Study of Health in Pomerania (SHIP). Online. *PLOS ONE*. 2015, roč. 10, č. 6. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131293>. [cit. 2024-04-08].
- [21] KNOTT, A. B. a BOSSY-WETZEL, E. Impact of nitric oxide on metabolism in health and age-related disease. Online. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2010, roč. 12, č. s2, s. 126 -133. ISSN 1462-8902. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01267.x>. [cit. 2024-04-15].
- [22] KRZYSZEK-KORPACKA, Małgorzata; WIŚNIEWSKI, Jerzy; FLESZAR, Mariusz G.; BEDNARZ-MISA, Iwona; BRONOWICKA-SZYDEŁKO, Agnieszka et al. Online. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019, roč. 2019. ISSN 1942-0900. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2019/5965721>. [cit. 2024-04-15].
- [23] KELM, Malte. Nitric oxide metabolism and breakdown. Online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 1999, roč. 1411, č. 2-3, s. 273-289. ISSN 00052728. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00020-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00020-1). [cit. 2024-04-15].
- [24] PAPAGEORGIOU, Nikolaos; ANDROULAKIS, Emmanuel; PAPAIOANNOU, Spyridon; ANTONIADES, Charalambos a TOUSOULIS, Dimitris. Homoarginine in the shadow of asymmetric dimethylarginine: from nitric

- oxide to cardiovascular disease. Online. *Amino Acids*. 2015, roč. 47, č. 9, s. 1741–1750. ISSN 0939-4451. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2017-y>. [cit. 2024-04-16].
- [25] PILZ, Stefan; MEINITZER, Andreas; GAKSCH, Martin; GRÜBLER, Martin; VERHEYEN, Nicolas et al. Homoarginine in the renal and cardiovascular systems. Online. *Amino Acids*. 2015, roč. 47, č. 9, s. 1703–1713. ISSN 0939-4451. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1993-2>. [cit. 2024-04-16].
- [26] SINGH, Jaipal; LEE, Young a KELLUM, John A. A new perspective on NO pathway in sepsis and ADMA lowering as a potential therapeutic approach. Online. *Critical Care*. 2022, roč. 26, č. 1. ISSN 1364-8535. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13054-022-04075-0>. [cit. 2024-04-26].
- [27] HOLTZ, Ashley G.; LOWE, Troy L.; AOKI, Yusuke; KUBOTA, Yutaro; HOFFMAN, Robert M. et al. Asymmetric and symmetric protein arginine methylation in methionine-addicted human cancer cells. Online. *PLOS ONE*. 2023, roč. 18, č. 12. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0296291>. [cit. 2024-04-26].
- [28] XU, Jian a RICHARD, Stéphane. Cellular pathways influenced by protein arginine methylation: Implications for cancer. Online. *Molecular Cell*. 2021, roč. 81, č. 21, s. 4357-4368. ISSN 10972765. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.09.011>. [cit. 2024-05-06].
- [29] BOLLENBACH, Alexander; HANFF, Erik a TSIKAS, Dimitrios. Utility of homoarginine in the GC-MS quantification of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human serum proteins. Online. *Analytical Biochemistry*. 2018, roč. 563, s. 67-70. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.10.012>. [cit. 2024-04-26].
- [30] TSIKAS, Dimitrios. De novo synthesis of trideuteromethyl esters of amino acids for use in GC–MS and GC-tandem MS exemplified for ADMA in human plasma and urine: Standardization, validation, comparison and proof of evidence for their aptitude as internal standards. Online. *Journal of Chromatography B*. 2009, roč. 877, č. 23, s. 2308-2320. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.01.005>. [cit. 2024-04-27].
- [31] VALTONEN, Pirjo; KARPPI, Jouni; NYSSONEN, Kristiina; VALKONEN, Veli-Pekka; HALONEN, Toivo et al. Comparison of HPLC method and commercial ELISA assay for asymmetric dimethylarginine (ADMA) determination in human serum. Online. *Journal of Chromatography B*. 2005, roč. 828, č. 1-2, s. 97-102. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.09.023>. [cit. 2024-04-30].
- [32] BLACKWELL, Scott; O'REILLY, Denis St. J. a TALWAR, Dinesh K. HPLC analysis of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and related arginine metabolites in human plasma using a novel non-endogenous internal standard. Online. *Clinica Chimica Acta*. 2009, roč. 401, č. 1-2, s. 14-19. ISSN 00098981. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2008.10.032>. [cit. 2024-04-30].
- [33] WU, Guoyao a MEININGER, Cynthia J. Analysis of Citrulline, Arginine, and Methylarginines Using High-Performance Liquid Chromatography. Online. *Nitric Oxide, Part F. Methods in Enzymology*. 2008, roč. 440, s. 177-189. ISBN 9780123739674. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(07\)00810-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(07)00810-5). [cit. 2024-04-30].
- [34] ESMATI, Parsa; NAJJAR, Niloufar; EMAMGHOLIPOUR, Solaleh; HOSSEINKHANI, Shaghayegh; ARJMAND, Babak et al. Mass spectrometry with derivatization method for concurrent measurement of amino acids and acylcarnitines in plasma of diabetic type 2 patients with diabetic nephropathy. Online. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*. 2021, roč. 20, č. 1, s. 591-599. ISSN 2251-6581. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s40200-021-00786-3>. [cit. 2024-04-30].
- [35] FLESZAR, Mariusz G.; WIŚNIEWSKI, Jerzy; KRZYSTEK-KORPACKA, Małgorzata; MISIAK, Błażej; FRYDECKA, Dorota et al. Quantitative Analysis of L-Arginine, Dimethylated Arginine Derivatives, L-Citrulline, and Dimethylamine in Human Serum Using Liquid Chromatography–Mass Spectrometric Method. Online.

- Chromatographia. 2018, roč. 81, č. 6, s. 911-921. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s10337-018-3520-6>. [cit. 2024-05-01].
- [36] SHAFRAN, Inbal; PROBST, Victoria; PANZENBÖCK, Adelheid; SADUSHI-KOLICI, Roela; GERGES, Christian et al. Asymmetric Dimethylarginine and NT-proBNP Levels Provide Synergistic Information in Pulmonary Arterial Hypertension. Online. JACC: Heart Failure. 2024. ISSN 22131779. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchf.2024.02.013>. [cit. 2024-05-01].
- [37] MAMATHA, Sopanahalli N.; NAGARAJA, Dindagur; PHILIP, Mariamma a CHRISTOPHER, Rita. Asymmetric dimethylarginine as a risk marker for early-onset ischemic stroke in Indian population. Online. Clinica Chimica Acta. 2011, roč. 412, č. 1-2, s. 139-142. ISSN 00098981. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.09.026>. [cit. 2024-05-01].
- [38] CHEN, Shu-Ping; HU, Tian-Hong; ZHOU, Qing; CHEN, Tian-Peng; YIN, Dong et al. Luteoloside protects the vascular endothelium against iron overload injury via the ROS/ADMA/DDAH II/eNOS/NO pathway. Online. Chinese Journal of Natural Medicines. 2022, roč. 20, č. 1, s. 22-32. ISSN 18755364. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1875-5364\(21\)60110-3](https://doi.org/10.1016/S1875-5364(21)60110-3). [cit. 2024-05-01].
- [39] HANNEMANN, Juliane; FREYTAG, Julius; SCHIEFER, Lisa Maria; MACHOLZ, Franziska; SAREBAN, Mahdi et al. Asymmetric and symmetric dimethylarginine in high altitude pulmonary hypertension (HAPH) and high altitude pulmonary edema (HAPE). Online. Frontiers in Physiology. 2023, roč. 14. ISSN 1664-042X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphys.2023.1297636>. [cit. 2024-05-01].
- [40] SCHWEDHELM, Edzard; MAAS, Renke; TAN-ANDRESEN, Jing; SCHULZE, Friedrich; RIEDERER, Ulrich et al. High-throughput liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of arginine and dimethylated arginine derivatives in human and mouse plasma. Online. Journal of Chromatography B. 2007, roč. 851, č. 1-2, s. 211-219. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.11.052>. [cit. 2024-05-01].
- [41] WINKLER, Martin Sebastian; BAHLS, Martin; BÖGER, Rainer H.; ITTERMANN, Till; DÖRR, Marcus et al. Association of Asymmetric and Symmetric Dimethylarginine with Inflammation in the Population-Based Study of Health in Pomerania. Online. Biomolecules. 2023, roč. 13, č. 11. ISSN 2218-273X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/biom13111612>. [cit. 2024-05-01].
- [42] SERVILLO, Luigi; GIOVANE, Alfonso; D'ONOFRIO, Nunzia; CASALE, Rosario; CAUTELA, Domenico et al. Determination of Homoarginine, Arginine, NMMA, ADMA, and SDMA in Biological Samples by HPLC-ESI-Mass Spectrometry. Online. International Journal of Molecular Sciences. 2013, roč. 14, č. 10, s. 20131-20138. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms141020131>. [cit. 2024-05-01].
- [43] ERYAVUZ ONMAZ, Duygu; ABUSOGLU, Sedat; YAGLIOGLU, Havva; ABUSOGLU, Gulsum a UNLU, Ali. Developing a robust, fast and reliable measurement method for the analysis of methylarginine derivatives and related metabolites. Online. Journal of Mass Spectrometry and Advances in the Clinical Lab. 2021, roč. 19, s. 34-45. ISSN 2667145X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jmsacl.2021.02.002>. [cit. 2024-05-09].
- [44] ZHANG, Xing a CHENG, Xiaodong. Structure of the Predominant Protein Arginine Methyltransferase PRMT1 and Analysis of Its Binding to Substrate Peptides. Online. Structure. 2003, roč. 11, č. 5, s. 509-520. ISSN 09692126. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(03\)00071-6](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(03)00071-6). [cit. 2024-05-05].
- [45] HSU, Chien-Ning a TAIN, You-Lin. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Pediatric Renal Diseases: From Pathophysiological Phenomenon to Clinical Biomarker and Beyond. Online. Children. 2021, roč. 8, č. 10. ISSN 2227-9067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/children8100837>. [cit. 2024-05-09].
- [46] Cryo-EM structure of the apo form of human PRMT5:MEP50 complex at a resolution of 3.4 angstrom. Online. In: RCSB PDB. 2020. Dostupné z: <https://doi.org/10.2210/pdb6ugh/pdb>. [cit. 2024-05-05].

- [47] KLAPKOVÁ, Eva; URINOVSKÁ, R a PRŮŠA, Richard. Vliv matricových efektů při vývoji a validaci metod pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. *Klinická biochemie a metabolismus*. 2011, roč. 19, č. 1, s. 5-8. ISSN 1210-7921.
- [48] RUNČÍKOVÁ, Anna. Stanovení asymetrického dimethylargininu v lidské plazmě. Online, Diplomová, vedoucí Žáková Pavla. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2021. Dostupné z: <https://dk.upce.cz/handle/10195/78619>. [cit. 2024-05-08].