Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Stanovení symetrického dimethylargininu v lidské plazmě

Diplomová práce

2024 Michaela Hejdová

University of Pardubice

Faculty of Chemical Technology

The determination of symmetric dimethylarginine in human plasma

Master Thesis

2024 Michaela Hejdová

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení:	**Bc. Michaela Hejdová**
Osobní číslo:	**C23448**
Studijní program:	**N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce:	**Stanovení symetrického dimethylargininu v lidské plazmě**
Téma práce anglicky:	**The Determination of Symmetric 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 symetrického dimethylargininu.

Experimentální část:

Vypracujte metodu pro stanovení symetrického dimethylargininu a pokuste se ji optimalizovat tak, aby byla použitelná pro stanovení tohoto parametru 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 Kanďár, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce: **22. prosince 2023**
Termín odevzdání diplomové práce: **10. května 2024**

L.S.

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

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

V Pardubicích dne 29. února 2024

Prohlašuji:

Práci s názvem Stanovení symetrického dimethylargininu v lidské plazmě jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena 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 směrnicí 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 10.5.2024 Michaela Hejdová v.r.

Na tomto místě bych velmi ráda poděkovala vedoucí své diplomové práce Mgr. Pavle Žákové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a vstřícný přístup při zpracovávání této práce. Děkuji také své rodině, přátelům a příteli za velkou podporu v průběhu mého studia.

ANOTACE

Symetrický dimethylarginin je metabolit aminokyseliny L-argininu, který se přirozeně vyskytuje v lidském organismu. Klinicky významný může být při predikci renálních či kardiovaskulárních onemocnění. Symetrický dimethylarginin je nejčastěji stanovován separačními chromatografickými metodami, a to především vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s různými způsoby detekce.

KLÍČOVÁ SLOVA

symetrický dimethylarginin, renální funkce, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, elektrochemická detekce

TITLE

The determination of symmetric dimethylarginine in human plasma

ANNOTATION

Symmetric dimethylarginine is a metabolite of amino acid L-arginine, which is naturally occured in human organism. It is clinically significant in prediction of renal or cardiovascular diseases. Symmetric dimethylarginine is most often determinated by chromatographic methods, especially high performance liquid chromatography with various ways of detection.

KEYWORDS

symmetric dimethylarginine, renal function, high performance liquid chromatography, electrochemical detection

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK **11**

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK **12**

ÚVOD **11**

1 TEORETICKÁ ČÁST **12**

1.1 Symetrický dimethylarginin 12

1.2 Metabolismus symetrického dimethylargininu 12

1.2.1 Biosyntéza symetrického dimethylargininu 13

1.3 Degradace a eliminace symetrického dimethylargininu 13

1.3.1 L-alanin:glyoxylát-aminotransferasa 2 13

1.3.2 N-acetylace 14

1.3.3 Transportéry kationtových aminokyselin 15

1.3.4 Biologické účinky symetrického dimethylargininu 15

1.3.5 L-arginin paradox 16

1.4 Klinický význam symetrického dimethylargininu 17

1.4.1 Funkce ledvin a jejich poškození 17

1.4.2 Chronické onemocnění ledvin 18

1.4.3 Akutní poškození ledvin 19

1.4.4 Aktuálně používané ledvinové markery 19

1.4.5 Nové ledvinové markery 20

1.4.6 Symetrický dimethylarginin u renálních onemocnění 22

1.4.7 Symetrický dimethylarginin u kardiovaskulárních onemocnění 23

1.4.8 Symetrický dimethylarginin ve veterinární diagnostice 26

1.5 Možnosti stanovení symetrického dimethylargininu 27

1.5.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí 27

1.5.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV a fluorescenční detekcí 29

1.5.3 Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí 30

1.5.4 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí 30
1.5.5 Enzymová imunoanalýza na imunosorbentech 31
1.5.6 Kapilární elektroforéza 32
1.5.7 Micelární elektrokinetická chromatografie 33
1.6 Elektrochemická detekce v kapalinové chromatografii 33
1.6.1 Kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí – amperometrie 34
1.6.2 Kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí – coulometrie 35
2 CÍL PRÁCE 37
3 PRAKTICKÁ ČÁST 38
3.1 Chemikálie, použitý materiál a přístroje 38
3.1.1 Chemikálie 38
3.1.2 Materiál a soupravy 38
3.1.3 Přístroje 39
3.1.4 Software 39
3.1.5 Ostatní materiál a pomůcky 39
3.2 Příprava roztoků 40
3.2.1 Mobilní fáze 40
3.2.2 Roztoky pro extrakci na pevné fázi 40
3.2.3 Roztoky pro derivatizaci 41
3.2.4 Roztoky standardních látek 42
3.3 Biologické vzorky 42
3.4 Metodika 43
3.4.1 Příprava standardního nebo plazmatického vzorku 43
3.4.2 Extrakce na pevné fázi 43
3.4.3 Derivatizace a dávkování na kolonu 44
3.4.4 Kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí 44
3.4.5 Vyhodnocení a výpočty 44

4 VÝSLEDKY A DISKUSE 45

4.1 První měření na koloně ARION® Polar C18 45

4.2 Měření standardních roztoků 46

4.3 Měření vzorků lidské plazmy 48

4.4 Zhodnocení metody 53

ZÁVĚR 56

POUŽITÁ LITERATURA 57

PŘÍLOHY 69

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1: Chemická struktura L-argininu a jeho methylovaných derivátů 12
Obrázek 2: Schéma metabolismu methylargininů, převzato [5] 14
Obrázek 3: Hlavní biologické účinky SDMA, převzato [5] 16
Obrázek 4: Nefron, převzato [17] 18
Obrázek 5: Cela amperometrického detektoru 34
Obrázek 6: Porézní grafitová elektroda fritového typu, převzato 35
Obrázek 7 Záznam měření vzorku poolové plazmy, převzato z [39]; podmínky měření: T = 30 °C, průtok 1 ml/min, MF A = 9,5 % acetonitrilu, citlivost 500 nA 45
Obrázek 8 Záznam měření plazmatického vzorku kardiaka; podmínky měření: T = 30 °C, průtok 1 ml/min, MF A = 9,5 % acetonitrilu, citlivost 500 nA 46
Obrázek 9 Záznam dvou chromatogramů směsi derivatizačního činidla se směsí standardů v poměru 1:1 (černá barva) a v poměru 2:1 (zelená barva) 47
Obrázek 10 Záznam chromatogramů vnitřního standardu rozpuštěného v PBS (černá barva) a v HCl (zelená barva) 48
Obrázek 11 Záznam chromatogramů standardu SDMA s vnitřním standardem (černá barva), vzorku s IS z EDTA zkumavky (zelená barva) a vzorku s IS z heparinové zkumavky (červená barva) 49
Obrázek 12 Záznam chromatogramů standardu SDMA s IS (zelená barva), vzorku z EDTA zkumavky s IS a přídavkem 1 µmol/l SDMA (červená barva) a vzorku kardiaka s IS (černá barva) 50
Obrázek 13 Záznam chromatogramů standardu SDMA s IS (zelená barva) a standardu SDMA bez IS (černá barva) 51
Obrázek 14 Záznam chromatogramů standardu SDMA s IS (černá barva), vzorku z EDTA zkumavky s IS (zelená barva) a vzorku z EDTA zkumavky s IS a přídavkem 1 µmol/l (červená barva) 52
Obrázek 15 Přiblížený záznam chromatogramů standardu SDMA s IS (růžová barva), vzorek z EDTA zkumavky s IS (černá barva), vzorek z EDTA zkumavky bez IS (červená barva) a vzorek z EDTA zkumavky bez IS (zelená barva) 53

Tabulka 1: Kategorie CKD podle glomerulární filtrace; převzato [20] 19
Tabulka 2: Kategorie CKD podle albuminurie a porovnání s proteinurií, převzato [20] ... 19

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ACS	akutní koronární syndrom
ADMA	N^G,N^G-dimethyl-L-arginin (asymetrický dimethylarginin)
AF	atriální fibrilace
AGXT2	L-alanin:glyoxylát-aminotransferasa 2
AKI	akutní poškození ledvin
ArgMI	index methylace argininu
CAT	transportéry kationtových aminokyselin
CAD	onemocnění koronárních tepen
CE	kapilární elektroforéza
CE-LIF	kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescencí
CKD	chronické onemocnění ledvin
CV	variační koeficient
CVD	chronická cévní choroba
DAPT	duální antiagregační léčba
DDAH	dimethylarginin dimethylaminohydrolasa
DMGV	α-keto-δ-(N,N-dimethylguanidino)valerová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ELISA	enzymová imunoanalýza na imunosorbentech
eNOS	endoteliální synthasa oxidu dusnatého
GABR	poměr biologické dostupnosti argininu
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní detekcí
GF	glomerulární filtrace
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie

HPLC-ECD	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí
ICHS	ischemická choroba srdeční
IL-18	interleukin 18
KIM-1	molekula poškození ledvin 1
L-NMMA	N^G-monomethyl-L-arginin
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
LOD	mez detekce
MEKC	micelární elektrokinetická chromatografie
MEKC-LIF	micelární elektrokinetická chromatografie s laserem indukovanou fluorescencí
MPS	perfusní scintigrafie myokardu
NGAL	neutrofilní s gelatinasou asociovaný lipokalin
NO·	oxid dusnatý
NOS	synthasa oxidu dusnatého
OPA	*ortho*-ftaldialdehyd
PFPA	anhydrid kyseliny pentafluoropropionové
PRMT	protein-arginin methyltransferasy
RA	revmatoidní artritida
SDMA	$N^G,N^{G'}$-dimethyl-L-arginin (symetrický dimethylarginin)
SPE	extrakce na pevné fázi
UPLC	ultra účinná kapalinová chromatografie
UPLC-MS/MS	ultra účinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

ÚVOD

Symetrický dimethylarginin byl poprvé izolován v moči v 70. letech 20. století japonskými vědci. Zvýšená pozornost je mu však věnována až posledních 25 let. Tento metabolit vzniká intracelulárně společně se svým konstitučním isomerem asymetrickým dimethylargininem posttranslační modifikací aminokyseliny L-argininu. Mechanismus účinku symetrického dimethylargininu spočívá v kompetitivní inhibici transportu L-argininu do buňky. Dále svým působením na monocyty indikuje tvorbu prozánětlivých cytokinů.

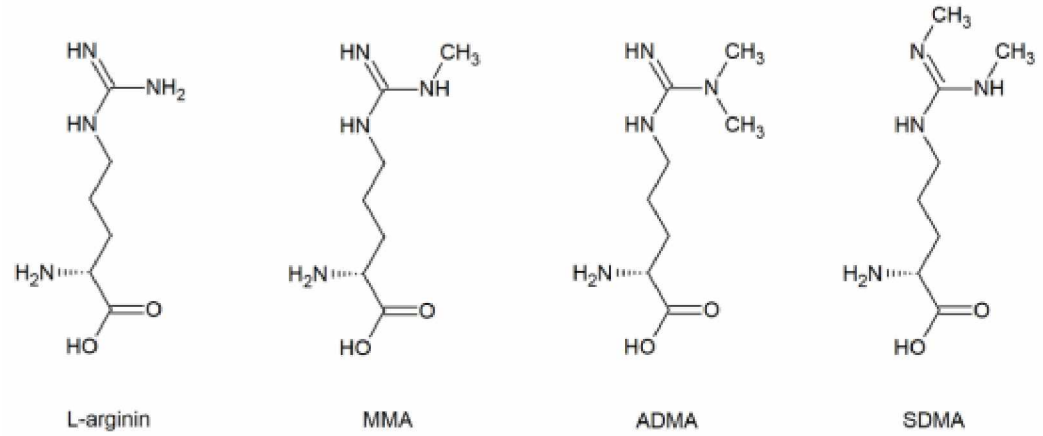
Klinicky významný může být především při predikci renálních onemocnění, méně signifikantně pak také v oblasti kardiovaskulárních onemocnění, kde je přínosnějším parametrem asymetrický dimethylarginin. Ledviny jsou pro symetrický dimethylarginin klíčovým prostředkem eliminace z organismu. Při nedostatečné funkci ledvin tak dochází ke zvýšení hladiny symetrického dimethylargininu v plazmě.

Symetrický dimethylarginin je nejčastěji stanovován separačními chromatografickými metodami, a to především vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s různými způsoby detekce. Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie umožňuje separaci více sloučenin z jednoho biologického materiálu najednou. Další možnosti stanovení jsou imunochemické metody nebo elektromigrační metody.

1 TEORETICKÁ ČÁST

1.1 Symetrický dimethylarginin

$N^G,N^{G'}$-dimethyl-L-arginin (symetrický dimethylarginin, SDMA) je jeden z metabolitů aminokyseliny L-argininu, který se přirozeně vyskytuje v lidském organismu. Kakimoto a Akazawa v 70. letech 20. století poprvé izolovali a popsali sloučeniny v moči, které jsou dnes známy jako methylované deriváty argininu. SDMA byl identifikován jako produkt posttranslační modifikace aminokyseliny L-argininu a je konstituční isomer N^G,N^G-dimethyl-L-arginin (asymetrického dimethylargininu, ADMA). Posledních 20 let je SDMA věnována pozornost a je považován za potenciálně významný biomarker renální funkce ledvin a kardiovaskulárního rizika. [1]



Obrázek 1: Chemická struktura L-argininu a jeho methylovaných derivátů

1.2 Metabolismus symetrického dimethylargininu

Methylargininy obecně jsou deriváty odvozené od L-argininu. L-arginin je bazická semiesenciální aminokyselina, která má polární guanidinovou skupinu. Fyziologicky se jeho koncentrace v plazmě pohybuje mezi 21 až 138 μmol/l. [2], [3]

L-arginin je primárně syntetizován v proximálních tubulech ledvin a odtud je uvolňován do systémové cirkulace, kde dále vzniká jako intermediát močovinového cyklu, který probíhá v játrech. Odtud však není uvolňován do krve. V močovinovém cyklu je pak L-arginin v cytoplazmě hydrolyticky štěpen enzymem arginasou na močovinu a L-ornithin. [3]

1.2.1 Biosyntéza symetrického dimethylargininu

Methylargininy vznikají posttranslační modifikací polypeptidového řetězce. Tyto reakce jsou katalyzovány methyltransferasami, které se dělí do dvou skupin, tedy protein-arginin methyltransferasy (PRMT) typu I a II. Tyto transferasy se liší podle substrátu a produktu reakce. Enzymy I. typu katalyzují reverzibilní modifikaci karboxylové skupiny za vzniku methylesterů. Touto cestou vzniká ADMA. Naopak enzymy II. typu katalyzují ireverzibilní reakci přenosu methylu na atomy dusíku nebo síry. Tímto způsobem vzniká SDMA. Oba typy PRMT však katalyzují syntézu N^G-monomethyl-L-arginin (L-NMMA), který vznikne navázáním jedné methylové skupiny. [3], [4]

Protein-arginin methyltransferasa typu II katalyzuje dvoustupňovou methylaci. V prvním kroku methylací jednoho z terminálních atomů dusíku guanidinové skupiny v argininových zbytcích vzniká N^G-monomethyl-L-arginin. V druhém kroku přenáší methylovou skupinu na druhý terminální atom dusíku a vzniká $N^G,N^{G'}$-dimethyl-L-arginin. [4]

Methylové zbytky ke vzniku dimethylargininů přenáší oba typy enzymů PRMT z S-adenosylmethioninu, který je meziproduktem v metabolickém cyklu homocysteinu. Rodina enzymů PRMT využívá S-adenosylmethionin jako donor methylu a generuje S-adenosylhomocystein a homocystein jako vedlejší produkty. [4]

K aktivaci PRMT může částečně docházet při oxidačním stresu lipoproteiny o nízké hustotě (LDL). Zvýšením aktivity PRMT se tak zvyšuje produkce methylargininů. [5]

1.3 Degradace a eliminace symetrického dimethylargininu

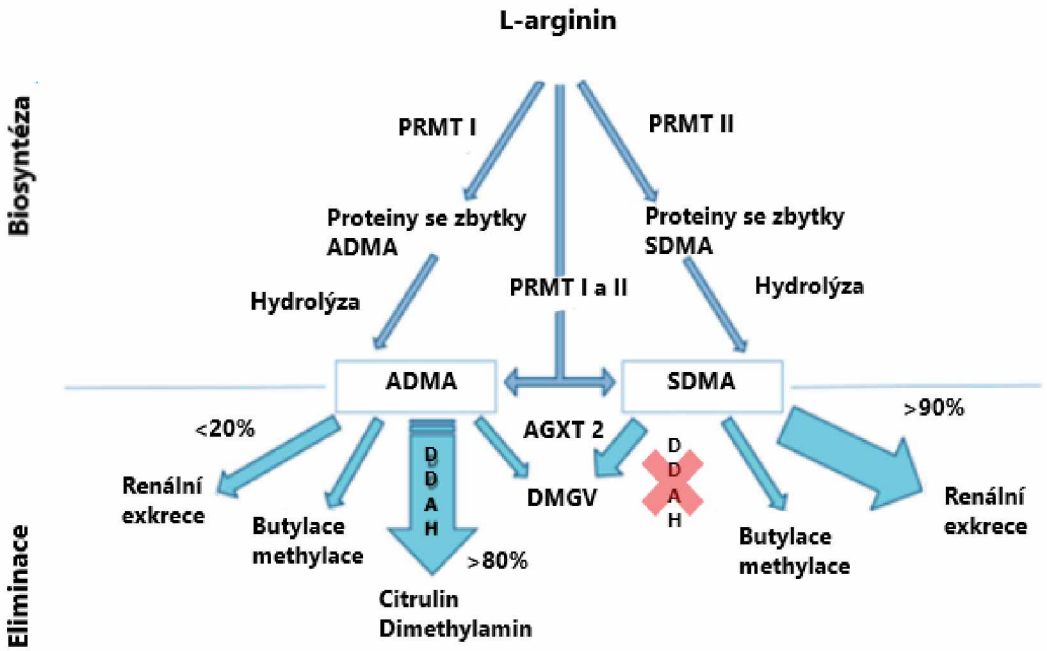
1.3.1 L-alanin:glyoxylát-aminotransferasa 2

Symetrický dimethylarginin je především eliminován z organismu v nemetabolizované formě renální exkrecí. Může však také podléhat, stejně jako ADMA, metabolické přeměně za katalýzy enzymem L-alanin:glyoxylát-aminotransferasou 2 (AGXT2). Tato mitochondriální aminotransferasa je exprimována primárně v ledvinách. Při degradaci pomocí AGXT2 dochází k transaminaci SDMA za vzniku N^G,N^G-dimethylguanidinovalerové kyseliny. [1], [5]

1.3.2 N-acetylace

Další nepříliš probádanou variantou degradace SDMA je N-acetylace α-aminoskupiny. K acetylaci dochází především v játrech a ledvinách. Reakcí vzniká symetrický Nα-acetyldimethylarginin. Ten je poté eliminován ledvinami. [5]

ADMA má možnosti eliminace rozmanitější. Hlavní eliminační cestou je hydrolýza, při které vzniká L-citrulin. Tato reakce probíhá za katalýzy dimethylarginin:dimethyl-aminohydrolasou (DDAH). Je zajímavé, že tento enzym nevykazuje žádnou aktivitu vůči SDMA. Dále je možné ADMA odstranit renální exkrecí, ta však představuje pouze 15 % celkové eliminace této sloučeniny. Společně pak mohou ADMA a SDMA podléhat eliminaci skrz butylaci nebo methylaci. [5] Přehledné schéma metabolismu methylargininů znázorňuje **Obrázek 2**.



Obrázek 2: Schéma metabolismu methylargininů, převzato *[5]*

ADMA a SDMA vznikají methylací působením enzymů PRMT. SDMA je převážně vylučován ledvinami a částečně je metabolizován AGXT2. Může být také eliminován z organismu

pomocí butylace nebo methylace. ADMA je z 80 % eliminován enzymatickou reakcí za katalýzy DDAH.

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin, PRMT – protein-arginin methyltransferasa, DDAH – dimethylarginin:dimethyl-aminohydrolasa, AGXT2 – L-alanin:glyoxylát-aminotransferasa 2, DMGV – α-keto-δ-(N,N-dimethylguanidino)valerová kyselina

1.3.3 Transportéry kationtových aminokyselin

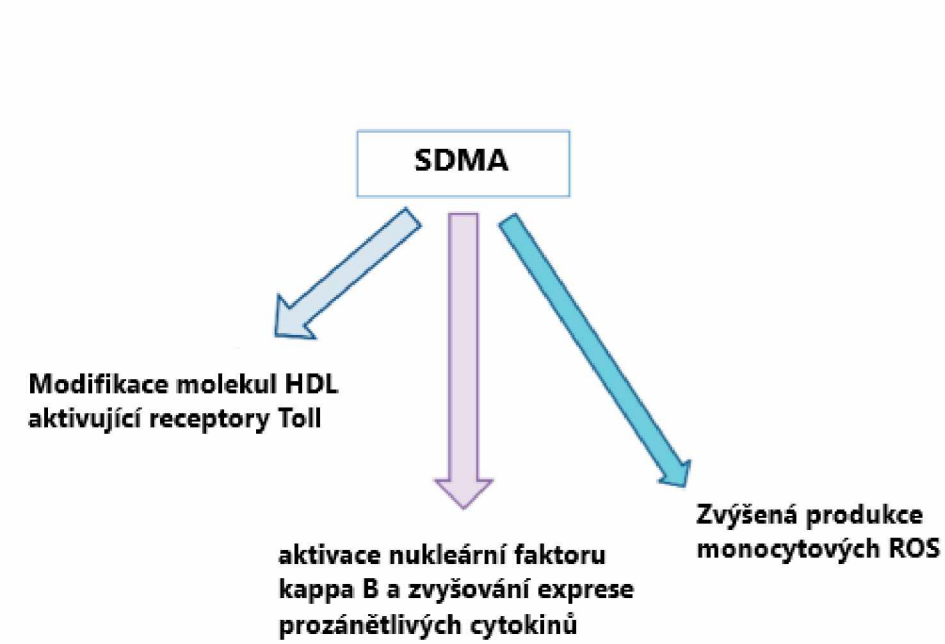
Významnou roli určující koncentraci SDMA mezi cytosolem a extracelulární tekutinou je přestup přes membránu skrze transportní systém specifický pro kationtové aminokyseliny. Ten je zajišťován pomocí rodiny transportérů kationtových aminokyselin (CAT). Tyto transportéry v plazmatické membráně umožňují transport cytosolického ADMA a SDMA do oběhu. Odtud jsou přijaty jinými buňkami nebo tkáněmi anebo jsou vylučovány ledvinami. [5], [6]

Pro transmembránový přenos L-argininu a jeho methylderivátů jsou nejdůležitější transportéry CAT-1, CAT-2A a CAT 2-B. SDMA a ADMA jsou dobře přenášeny transportérem CAT-2B, zatímco přenos L-argininu zajišťují transportéry CAT-1 a CAT-2B. Přenos SDMA a ADMA je zprostředkován pomocí CAT výměnou za L-arginin a jiné kationtové aminokyseliny. Tento přenos funguje skrze plazmu na dlouhou vzdálenost. [6]

1.3.4 Biologické účinky symetrického dimethylargininu

Symetrický dimethylarginin nepůsobí jako přímý inhibitor syntasy oxidu dusnatého. Přesto je však důležitý pro pozorování v souvislosti s metabolismem oxidu dusnatého. Jedním z mechanismů biologického účinku SDMA je kompetitivní inhibice transportu L-argininu do buňky. Soutěží o pozici na CAT 2-B transportéru a pokud zvítězí, tak znemožní transport L-argininu do buňky a připraví tak syntasu oxidu dusnatého o substrát k tvorbě oxidu dusnatého. [5], [7]

SDMA aktivuje nukleární faktor kappa B v monocytech, což souvisí se zvýšenou expresí zánětlivých cytokinů, jako jsou např. interleukin-6 a tumor nekrotizující faktor alfa. Navíc také zvyšuje produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) v endoteliálních buňkách a monocytech skrze vápníkové kanály a zvyšuje NADPH-oxidasu přes endoteliální toll-like receptory. [5], [8]



Obrázek 3: Hlavní biologické účinky SDMA, převzato *[5]*

1.3.5 L-arginin paradox

U savců byl pozorován jev, který se nazývá L-arginin paradox. Fyziologická plazmatická koncentrace L-argininu mnohonásobně převyšuje Michaelisovu konstantu pro endoteliální synthasu oxidu dusnatého (eNOS). Při fyziologických koncentracích L-argininu by tedy synthasa oxidu dusnatého (NOS) měla být dobře nasycena substrátem a přidání exogenního L-argininu by nemělo ovlivňovat aktivitu tohoto enzymu. Nicméně i malé změny v koncentraci L-argininu přesto mohou způsobit viditelnou změnu aktivity NOS. [9]

Tento paradox může být vysvětlen tím, že izoformy NOS jsou silně inhibovány endogenně produkovanými sloučeninami. V roce 2000 uvedl tým vědců vysvětlení L-arginin paradoxu přítomností endogenních inhibitorů NOS, asymetrického dimethylargininu a monomethylargininu. Autoři uvádí, že koncentrace ADMA rovna 1 μmol/l sníží aktivitu NOS zhruba na polovinu, koncentrace 2 μmol/l na jednu pětinu ve srovnání s aktivitou při stejné koncentraci substrátu L-argininu bez inhibitoru. Za fyziologických podmínek je aktivita izoforem NOS snížena na zlomek jejich maximálních aktivit. Za patologických podmínek pak způsobuje zvýšení intracelulární koncentrace inhibitorů, zejména pak koncentrace ADMA, i při normální koncentraci L-argininu. Další pokles aktivity NOS způsobuje pokles produkce oxidu dusnatého ($NO^{\bullet}$) pod fyziologickou normu. [10], [11]

L-arginin lze podávat intravenózně nebo perorálně a zvýšit tak jeho plazmatickou koncentraci. To vede k výměně intracelulárních inhibitorů s extracelulárním L-argininem, ke zvýšení koncentrace intracelulárního L-argininu a obnovení fyziologického poměru argininu a jeho inhibitorů. Antagonismus L-argininu s kompetitivními inhibitory i nekompetitivními inhibitory extracelulárním způsobuje zvýšení aktivity synthasy oxidu dusnatého a díky tomu zvýšení produkce oxidu dusnatého. [11], [12]

L-arginin paradox tedy naznačuje, že aktivita endoteliální NOS je spojena s transportem L-argininu a extracelulární hladiny L-argininu a ADMA jsou zodpovědné za modulaci aktivity endoteliální NOS. [12]

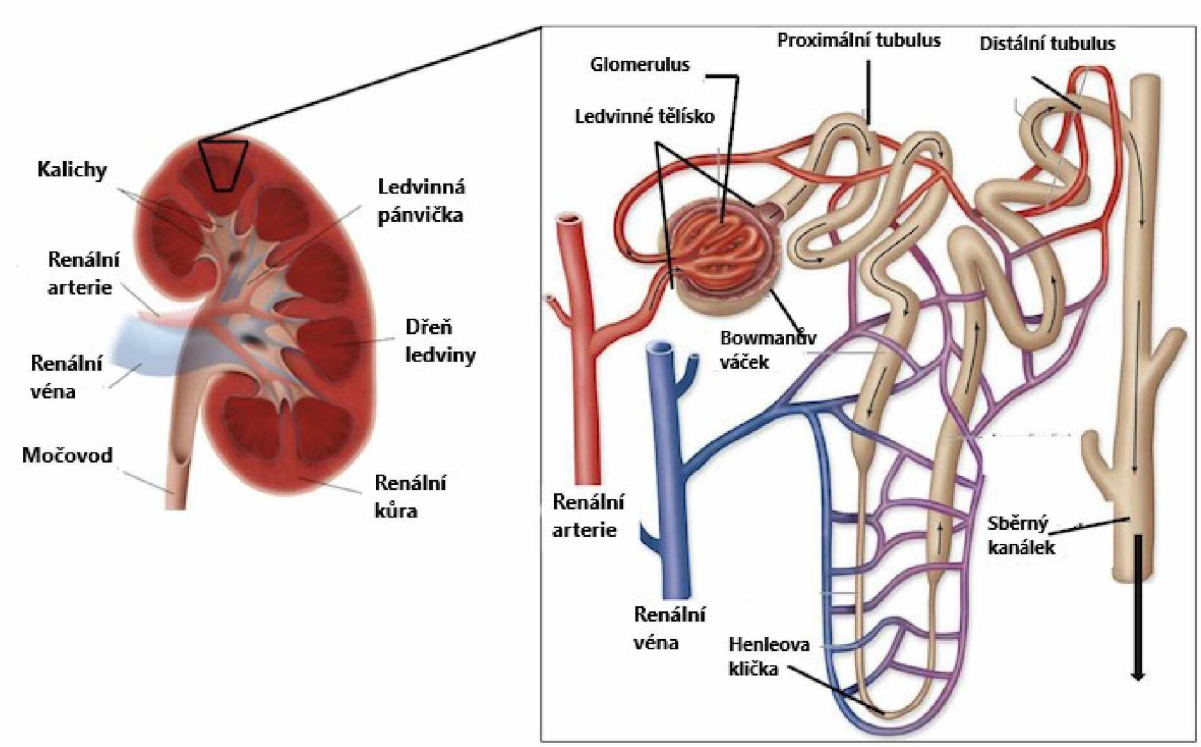
1.4 Klinický význam symetrického dimethylargininu

Symetrický dimethylarginin je důležitý metabolit z hlediska pozorování renální funkce jak u lidí, tak zvířat. Fyziologická koncentrace v lidské plazmě se pohybuje v rozmezí 0,38-0,73 μmol/l. Koncentrace dimethylargininů se však v různých studiích liší, a to i při použití podobných metod stanovení. [13]

Díky svým prozánětlivým účinkům se SDMA zřejmě podílí přímo či nepřímo na příčině vzniku chronické cévní choroby (CVD). Vyšší hladiny SDMA jsou též pozorovány u chronického onemocnění ledvin (CKD) v terminální fázi. [14]

1.4.1 Funkce ledvin a jejich poškození

Ledviny jsou párový vylučovací orgán, který nejen odstraňuje škodlivé látky, ale i přebytky látek, které jsou tělu potřebné. Ledviny jsou bohatě zásobené krví a průtok krve ledvinami činí 1000-1300 ml krve/min. Základní funkční jednotkou ledviny je nefron (Obr.4). Ten se skládá mimo jiné z glomerulu, kde probíhá základní stupeň vylučovací funkce ledvin, tzv. glomerulární filtrace (GF). Ta závisí na filtračním tlaku, filtrační ploše a propustnosti glomerulárního filtru. Objem glomerulární filtrace je 120 až 130ml/min, tedy 170 až 180 l/24 h. Glomerulární filtraci lze měřit pomocí inulinu. Inulin je polymer fruktosy, který se po průtoku glomerulem vyloučí a už se nevstřebává. Tato vlastnost látky se nazývá clearance. [15], [16]



Obrázek 4: Nefron, převzato *[17]*

Snížení glomerulární filtrace do cca 50 % fyziologické hodnoty nezpůsobuje změny ve složení vnitřního prostředí. Koncentrace sérového kreatininu se zvyšuje při poklesu funkce glomerulární filtrace zhruba pod 50 % fyziologické hodnoty. Stadium poklesu glomerulární filtrace bez nárůstu koncentrace kreatininu v séru se nazývá snížení funkce ledvin nebo mírná renální insuficience. [15], [18]

Při selhání funkce ledvin orgán není schopen vylučovat vodu, elektrolyty a dusíkaté katabolity ani za bazálních podmínek. Následně dochází k poruše homeostázy v lidském organismu a snižuje se množství vytvořené moči, což vede k zadržování vody a vzniku otoků. Odpadní látky hromadící se v organismu mohou toxicky působit na ostatní orgány a způsobovat další komplikace. Narušena bývá také acidobazická rovnováha, syntéza a degradace hormonů aj. [18], [19]

Pojem konečné selhání funkce ledvin popisuje stav, při kterém je udržení homeostázy celého organismu nemožné a jediným řešením pak bývá hemodialýza či transplantace ledvin. [19]

1.4.2 Chronické onemocnění ledvin

Chronické onemocnění ledvin (CKD) je poškození struktury či funkce ledvin, které trvá déle než 3 měsíce a má vážný dopad na lidský organismus. Chronická onemocnění v raném stádiu

mnohdy nemívají žádné příznaky a nezpůsobují žádné obtíže. K projevům v pokročilém stádiu patří například pokles funkce ledvin, albuminerie, abnormální nález v močovém sedimentu, histologický nález při biopsii aj. Pacient s CKD je klasifikován dle příčiny (diabetické CKD, CKD způsobené amyloidózou), funkce glomerulární filtrace (G1, G2,…) a albuminurie (A1, A2, A3). [14], [20], [21]

Kategorie	**Glomerulární filtrace [ml/s/1,73 m^2]**
G1	≥ 1,50
G2	1,0 až 1,49
G3a	0,75 až 0,99
G3b	0,5 až 0,74
G4	0,25 až 0,49
G5	< 0,25 = selhání ledvin

Tabulka 1: Kategorie CKD podle glomerulární filtrace; převzato *[20]*

Kategorie	**Albuminurie [mg/24 h]**	**ACR [mg/mmol]**	**Proteinurie [mg/24 h]**	**PCR [mg/mmol]**
A1	< 30	< 3	< 150	< 15
A2	30 až 300	3 až 30	150 až 500	15 až 50
A3	> 300	> 30	> 500	> 50

Tabulka 2: Kategorie CKD podle albuminurie a porovnání s proteinurií, převzato *[20]*

ACR: poměr močový albumin/ močový kreatinin; PCR: poměr močový protein/ močový kreatinin

1.4.3 Akutní poškození ledvin

Akutní poškození ledvin (AKI) je náhle vzniklé a v časném stádiu reverzibilní pokles funkce ledvin. V těžší formě je toto onemocnění spojeno s výrazným poklesem diurézy. Jedná se o rychle progredující onemocnění. Asi 20 až 60 % pacientů s AKI vyžadují hemodialýzu. Dle statistiky se úmrtnost při multiorgánovém postižení pohybuje kolem 80 %. AKI je však častou komplikací především u ambulantních a hospitalizovaných pacientů a jeho incidence se za poslední léta zvyšuje, a to i u dětských pacientů. [20], [22], [23]

1.4.4 Aktuálně používané ledvinové markery

Tradiční ledvinové biomarkery jsou užitečné při diagnostice a monitoringu renálních onemocnění. Nicméně všechny tyto markery mají své limity, ať už se jedná o využití těchto

markerů při biochemické diagnostice ve zdravotnictví či jejich využití ve veterinární diagnostice. Tyto biomarkery se obecně mohou rozdělit na markery glomerulární filtrace nebo markery glomerulárního a tubulárního poškození či dysfunkce. Mezi nejčastěji vyšetřované parametry glomerulární filtrace patří kreatinin a urea. Kreatinin je označován jako primární ledvinový marker, protože jeho hladina není tolik ovlivňována nerenálními faktory jako je tomu u urey. Sérový kreatinin je dosud považovaný za zlatý standard pro stanovení AKI. Nicméně schopnost včasně detekovat sníženou funkci glomerulární filtrace je i tak značně omezená a četné studie ukazují, že kreatinin je opožděným markerem zjištěným v době výrazného poškození renálního parenchymu. Tomuto opoždění přispívá fakt, že kreatinin se tvoří ve svalech, tudíž podíl svalové hmoty determinuje jeho bazální koncentraci v organismu. [24]

Poměrně nově používaným ledvinovým biomarkerem je cystatin C. Jedná se o nízkomolekulární protein z rodiny inhibitorů cysteinových proteas. Je produkován konstantně většinou jaderných buněk v organismu a přítomný ve všech vyšetřovaných biologických tekutých materiálech. V ledvinách je filtrován skrze glomerulární membránu a v tubulech podléhá degradaci. Za fyziologických podmínek tedy není vylučován močí. Výhodou je, že koncentrace cystatinu C v séru je téměř výhradně závislá na funkci ledvin. Jeho koncentrace v krvi je spolehlivým endogenním ukazatelem glomerulární filtrace. [25]

1.4.5 Nové ledvinové markery

Neutrofilní s gelatinasou asociovaný lipokalin (NGAL) nebo zjednodušeně lipokalin-2 je sekreční protein, který se účastní transmembránového přenosu lipofilních částic. Původně byl izolován ze specifických granul neutrofilů a později byl nalezen v kostní dřeni a v epiteliích některých orgánů. Exprese NGAL ve výstelkové tkáni a tělních tekutinách značně stoupá při zánětlivých a nádorových onemocněních. Diagnosticky významná jsou vyšetření hladiny lipokalinu-2 v krvi, který je schopen rozlišit bakteriální a virovou infekci. Je také jednou z prvních molekul, jejíž tvorba je stimulována rozvojem renálního onemocnění. Tvoří se v tubulárních epiteliálních buňkách jako odpověď na poškození tubulointersticiální tkáně, které se objevuje u řady progresivních ledvinových onemocnění. Hladina exprese NGAL je ovlivněna mírou poškození ledvin a může u pacientů indikovat vyšší riziko rychlejšího poklesu funkce ledvin. Ukázalo se, že NGAL je využitelný jako marker míry glomerulární filtrace. Malá studie zahrnující dětské pacienty s různými stádii CKD demonstrovala, že hladiny plazmové NGAL korelovaly s glomerulární filtrací. U pacientů s renální funkcí pod 30 ml/min se NGAL ukázal jako přesnější marker a překonal v citlivosti i cystatin C. [26], [27]

Uromodulin je glykoprotein, který je produkován tubulárními buňkami ledvin a dle dostupných studií se zapojuje do obrany tubulárních buněk proti infekci močových cest objevujících se u pyelonefritidy a urolitiázy. Původně byl objeven v moči těhotných žen jako protein s imunosupresivními účinky. Hojně se vyskytující glykoprotein v moči tvoří v aglutinované formě základ válců. Mutace uromodulinu jsou spojeny s některými typy intersticiálních postižení ledvin, např. familiární juvenilní hyperurikemická nefropatie. Při rozvoji renálního onemocnění se uromodulin hromadí v tubulárních buňkách, zatímco jeho exkrece a obsah v moči jsou snížené. U pacientů s CKD ve stádiu 2 se hladina koncentrace uromodulinu pohybuje kolem 300 ng/ml. U pacientů s CKD ve stádiu 5 tato hladina klesne až na 10 ng/ml. U dialyzovaných pacientů je hladina uromodulinu nedetekovatelná. [26], [28]

Molekula poškození ledvin 1 (KIM-1) je transmembránový protein, který se za fyziologických podmínek nevyskytuje v ledvinách, avšak je exprimován v dediferencovaných buňkách proximálního tubulu po ischemickém nebo nefrotoxickém inzultu. Jeho exprese se zvyšuje při AKI a v moči lze detekovat jeho proteolyticky zkrácený segment. V nedávné studii při biopsiích ledvin bylo zjištěno, že v proximálních tubulech ledvin u pacientů trpící AKI se výrazně zvýšila tvorba KIM-1 a na základě přítomnosti této molekuly v moči bylo možné rozlišit ischemické AKI od prerenální formy a chronického onemocnění ledvin. Protein KIM-1 je slibný marker pro zařazení do močového „AKI-panelu“. Jeho specifita pro ischemické poškození ledvin je jeho hlavní výhodou a může být proto důležitým biomarkerem pro rozlišení jednotlivých podtypů AKI. [29]

Interleukin 18 (IL-18) je prozánětlivý cytokin, který se po akutním poškození ledvin uvolňuje v proximálním tubulu a jeho produkt se vylučuje do moči. Ve velké průřezové studii byla prokázána výrazně zvýšená koncentrace u pacientů trpící na AKI. Hladina interleukinu však nebyla ovlivněna u pacientů s prokázanou infekcí močových cest, chronickým onemocněním ledvin či s nefrotickým syndromem. Ve studii zabývající se pacienty podstupující transplantaci ledvin, koncentrace IL-18 ve vzorcích moči odebraných v den transplantace umožnila rozpoznat příjemce kadaverózních ledvin, u kterých byl následně opožděn rozvoj funkce štěpu. Tito pacienti následně potřebovali dialyzační léčbu. Koncentrace IL-18 v kombinaci s NGAL v moči představují potenciálně významné markery u dětských pacientů podstupující kardiochirurgické operace. Pacienti, u kterých došlo k rozvoji AKI do 3 dní po operaci se NGAL začal vylučovat do moči do několika hodin po výkonu operace a nejvyšší hodnoty byly naměřeny po 6 hodinách. Koncentrace IL-18 v moči byla 2x pomalejší

a maxima hodnoty dosáhla po 12 hodinách. Hodnoty obou markerů nezávisle korelovaly s trváním AKI. [30], [31]

1.4.6 Symetrický dimethylarginin u renálních onemocnění

Ledviny jsou pro symetrický dimethylarginin klíčovým prostředkem eliminace z organismu. Jednak zde dochází k přímé eliminaci SDMA vlivem renální exkrece, ale také k produkci AGTX2, který se z určité části podílí na jeho eliminaci. [5]

U renálního selhání je exkrece methylargininů snížená a SDMA společně s ADMA se hromadí v cirkulaci. To je také důvod, proč je daleko významnější analýza tohoto parametru z lidské plazmy/séra než z moči. Hladina SDMA se zvyšuje více než ADMA, který je degradován enzymem DDAH. Jelikož je SDMA metabolicky inaktivní a není substrátem pro DDAH, koreluje se sníženou renální funkcí mnohem více. Nárůst SDMA je oproti ADMA nápadnější a několik studií tak ukazuje, že je přesnějším biomarkerem renálních onemocnění. [5], [32], [33]

V porovnání se známými biomarkery pro chronické onemocnění ledvin jako je např. kreatinin, urea nebo cystatin C by měl SDMA odhalit onemocnění dříve, než dojde k trvalému poškození tkáně. Hladiny SDMA v lidské plazmě ukázaly korelaci s glomerulární filtrací (GF) u pacientů postižených CKD. SDMA má oproti kreatininu a cystatinu C výhodu v tom, že není ovlivňován faktory ovlivňující renální funkci, např. váha, dieta, zánět, diabetes mellitus aj. U CKD na hladiny SDMA také nemá vliv ani věk či pohlaví. [14], [18], [34]

El-Khoury a kolektiv provedli v roce 2016 v Klinické renální laboratoři v Clevelandu srovnání SDMA s kreatininem a cystatinem C a jejich korelaci s GF u pacientů s podezřením na CKD. Bylo vybráno 40 pacientů ve věku od 21 do 76 let. Koncentrace SDMA v plazmě byla signifikantně nižší u pacientů s GF > 90 ml/min/1,73 m^2 než u pacientů s GF < 60 ml/min/1,73 m^2. Za použití dříve stanovené horní hranice referenčního intervalu 0,65 μM pro SDMA jako mezní hodnotu pro CKD poskytly následující klinické výsledky: senzitivita = 81,3 %, specificita = 100 %, pozitivní prediktivní hodnota = 100 %, negativní prediktivní hodnota = 88,9 %. [35]

Feliers a kolektiv v roce 2014 zveřejnili studii, kde se snažili zjistit, zda SDMA ovlivňuje aktivitu endoteliální syntázy oxidu dusnatého (eNOS) u glomerulárních endoteliálních buněk. Studie simulovala pacienty s chronickým onemocněním ledvin pomocí myšího modelu. Analýza byla prováděna metodou SDS-PAGE s infračerveným senzorem. Výsledky studie však

ukázaly, že přítomnost volného L-argininu naznačuje, že SDMA přímo eNOS neovlivňuje, ale kompetitivní inhibicí částečně zamezuje transportu argininu a tím snižuje aktivitu eNOS. [19]

Hyla-Klekot a kolektiv se v roce 2015 zabývali klinickou studií dimethylargininů coby rizikovými markery aterosklerózy a chronického onemocnění ledvin u dětí s idiopatickým nefrotickým syndromem. Klinické příznaky onemocnění byly charakterizovány zvýšenou propustností glomerulární filtrační bariéry s následným rozvojem proteinurie, hypoproteinemie a otoků. Studie se zúčastnilo 32 dětí s nefrotickým syndromem a bylo testováno několik parametrů v remisní a relapsní fázi nefrotického syndromu., včetně ADMA, SDMA, klasického tukového screeningu a GF. Ve fázi relapsu byla negativní korelace mezi ADMA a lipidy. V obou fázích SDMA negativně korelovala s GF. Tato studie v závěru shledala úlohu ADMA při monitorování endoteliální dysfunkce jako bezvýznamnou. Naopak SDMA se ukázala být potenciálně významným markerem monitoringu glomerulární filtrace u dětí s idiopatickým nefrotickým syndromem. [36]

V roce 2019 byla zveřejněna studie z nemocnice v Canterbury, která se pro změnu zaměřila na starší pacienty ve věku od 74 do 97 let, trpící na renální onemocnění. Studie probíhala 33 měsíců a zúčastnilo se jí 394 pacientů, muži i ženy. U pacientů se pozorovala glomerulární filtrace pomocí clearance metody a souběžně byly měřeny hodnoty plazmatického ADMA a SDMA pomocí izotopové diluční tandemové hmotnostní spektrometrie. Plazmatické koncentrace asymetrického dimethylargininu byly zvýšeny u pacientů s GF <60 ml/min/1,73 m ve srovnání s těmi s rychlostí GF >60 ml/min/1,73 m se hodnoty nelišily. Plazmatické koncentrace symetrického dimethylargininu se konstantně zvyšovaly s ohledem na klesající hodnoty glomerulární filtrace. V průběhu studie zemřelo 65 pacientů. Oba methylargininy tak byly nezávisle spojeny se snížením přežitím. SDMA byl touto studií shledán jako spolehlivý marker rychlosti GF a lepším prediktorem výsledku, než je ADMA. [13]

1.4.7 Symetrický dimethylarginin u kardiovaskulárních onemocnění

Kardiovaskulární onemocnění patří zejména ve vyspělých zemích k nejčastější příčině úmrtí. Významným podkladem pro kardiovaskulární onemocnění je ateroskleróza neboli kornatění cév, zásobující srdeční sval krví. Ateroskleróza dále vede k ischemické chorobě srdeční (ICHS), která se projeví jako infarkt myokardu. Dále se na vzniku onemocnění podílí procesy stárnutí tkání charakterizované jizvením, ukládáním proteinů v srdci a ukládáním solí vápníku do srdečních chlopní a cév. Tyto procesy pak vedou k srdeční arytmii, arteriální

hypertenzi a chlopenním vadám srdce. V posledním kroku pak dojde k chronickému srdečnímu selhání a smrti. [37], [38]

Ukázalo se, že SDMA je u kardiovaskulárních onemocnění potenciálně významným biomarkerem a jeho plazmatická koncentrace má značnou prevalenci u onemocnění spojených s endoteliální dysfunkcí zahrnující hypertenzi, hyperlipidemii, hypercholesterolemii nebo například diabetes mellitus 1. i 2. typu. [39]

Zobel a kolektiv v roce 2017 zveřejnili výsledky výzkumu, který trval 6 let. Prováděli evaluaci SDMA a ADMA jako markerů kardiovaskulárního rizika a celkové úmrtnosti a zhoršení renální funkce u pacientů s diabetes mellitus 2. typu a mikroalbuminerie avšak bez symptomů onemocnění koronárních tepen (CAD). Výzkumu se účastnilo 200 pacientů z kliniky *Steno Diabetes Center Copenhagen*, kde po metabolomické analýze provedli statistické vyhodnocení v neupravených i upravených Coxových analýzách o tradiční rizikové faktory jako pohlaví, věk, krevní tlak, LDL - cholesterol aj. Výzkum ukazuje, že u pacientů léčených na diabetes mellitus 2. typu a mikroalbuminerii jsou vysoké hodnoty SDMA spojeny s incidencí kardiovaskulárního onemocnění, celkovou úmrtnostní a zhoršením renální funkce. Vyšší hodnoty ADMA jsou asociovány s celkovou úmrtností. SDMA významně zlepšuje predikci zhoršení renální funkce, dokonce snad významněji než tradičně používané renální markery. [40]

Eyileten a kolektiv prováděli studii, zda je vysoká koncentrace SDMA spojena s nízkou aktivitou krevních destiček a zvýšeným rizikem krvácení u pacientů s akutním koronárním syndromem (ACS). Duální antiagregační léčba (DAPT) předchází vzniku ischemickým příhodám u pacientů s akutním koronárním syndromem, ale jejím vedlejším účinkem je zvýšené riziko krvácivých příhod. Studie hodnotila roli SDMA v predikci krvácivých příhod u pacientů po ACS léčených DAPT. Porovnány byly plazmatické koncentrace metabolitů vzniklé metabolickou dráhou oxidu dusnatého u celkově 291 pacientů s ACS. Během 1 roku byla zkoumána prognostická hodnota SDMA jako prediktoru krvácení. Koncentrace metabolitů byla měřena pomocí ultra účinné kapalinové chromatografie (UPLC) a reaktivita krevních destiček se měřila pomocí impedanční agregometrie. Pacienti s nejvyšším kvartilem (4.) koncentrace SDMA měli významně nižší funkci agregace ve srovnání s pacienty 1. a 3. kvartilu SDMA. Pacienti s majoritními i minoritními krvácivými příhodami měli významně vyšší koncentrace SDMA ve srovnání s těmi, kteří krváceli minimálně či vůbec. Dá se konstatovat, že studie poukázala na to, že vyšší koncentrace SDMA může být spojena s nižší reaktivitou krevních

destiček a je spojena s krvácivými stavy různé intenzity u pacientů trpící akutním koronárním syndromem. [41]

Horowitz a kolektiv testovali hypotézu, zda plazmatické hladiny SDMA a ADMA, které inhibují tvorbu oxidu dusnatého, mohou predikovat následky onemocnění u pacientů s atriální fibrilací (AF). Pro studii bylo použito celkově 5004 vzorků plazmy od pacientů s AF při randomizaci na warfarin nebo apixaban. Studie pod anglickým názvem *ARISTOTLE trial* znamená zkratku pro *Apixaban for reduction in stroke and other thromboembolic events in atrial fibrillation*, česky Apixaban pro snížení mrtvice a jiných tromboembolických příhod při arteriální fibrilaci. Koncentrace methylargininů byly měřeny pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Vztahy ke klinickým charakteristikám byly hodnoceny multivariabilními analýzami. Asociace s hlavními výsledky byly během sledování s mediánem 1,9 roku hodnoceny upravenými Coxovými modely proporcionálních rizik. Výsledky studie ukázaly, že hladiny obou dimethylargininů stoupaly u pacientů vyššího věku, ženského pohlaví, u pacientů s poškozenými ledvinami a městnavým srdečním selháním. Dále se koncentrace SDMA zvyšovala současně s vysokým CHA_2DS_2-VASc a HAS-BLED skórem, ale naopak se snížila u pacientů s diabetem. ADMA ani SDMA neměly rozdílné odezvy na warfarin nebo apixaban. Horowitz a kolektiv dospěli k závěru, že u antikoagulovaných pacientů s AF jsou zvýšené hladiny SDMA spojeny s krvácivými stavy a společně s ADMA jsou silně spojeny se zvýšenou mortalitou. Tato zjištění naznačují, že poruchy funkce oxidu dusnatého modulují jak trombotické, tak hemoragické riziko u antikoagulovaných pacientů s AF. [42]

Szabo a kolektiv zkoumali, zda jsou změny sérové hladiny SDMA spojeny s přechodnou ischemií myokardu u pacientů s CAD, kteří se podrobili vyšetření perfusní scintigrafie myokardu, jinak také zátěžový MPS, a zda je SDMA účinný prediktivním marker ve spojitosti s tímto zdravotním stavem. Dále se testu podrobilo i několik zdravých dobrovolníků. Všichni pacienti a všechny další subjekty podstoupili 2denní dipyridamolový stres/klidový protokol. Pacienti s přechodnou abnormalitou myokardiální perfuse byli sledováni a jejich koronární průtok krve byl kvantitativně hodnocen. Před a po dipyridamolovým stresem byla odebrána žilní krev k změření hladiny markerů. Výchozí koncentrace ADMA a SDMA byly významně vyšší u pacientů s CAD ve srovnání se zdravými subjekty. Koncentrace SDMA před a po stresu byly významně vyšší u pacientů s přechodnou abnormalitou myokardiální perfuse ve srovnání s těmi, co měli negativní výsledky MPS. U pacientů s angiograficky prokázaným nízkým koronárním průtokem a pacientů s normálním průtokem se žádný z markerů výrazně nelišil. Koncentrace SDMA před vyvolaným stresem byla nezávislým prediktorem kardiovaskulární

mortality během 8letého sledování. Zvýšené sérové koncentrace SDMA mohou být užitečné pro selekci vysoce rizikových pacientů s CAD, pokud jsou nějaké nejasnosti při interpretaci výsledků MPS. [43]

Chandrasekharan a kolektiv se zabývali pacienty s revmatoidní artritidou (RA), kteří mají sklony k vyvinutí kardiovaskulárního onemocnění. Snažili se zjistit, zda zvýšená plazmatická hladina SDMA může sloužit jako potenciální indikátor kardiovaskulární mortality u pacientů s revmatioidní artritidou. Celkově měli k dispozici 119 vzorků plazmy od pacientů s RA a dalších 238 vzorků plazmy od kontrolní skupiny stejného věku a pohlaví. K analýze byla použita metoda kapalinové chromatografie s tandemovým hmotnostním spektrometrem (LC-MS/MS) a společně se SDMA se zaměřili také na volný L-arginin, L-ornitin, L-citrulin, MMA a ADMA. Při měření porovnávali poměr biologické dostupnosti argininu (GABR), tj. poměr L-argininu k L-ornitinu + L-citrulinu, s indexem methylace argininu (ArgMI), tj. ADMA + SDMA/MMA), a to u pacientů s RA a kontrolní skupiny. Hodnota GABR byla snížená, zatímco aktivita plazmatické arginázy, koncentrace SDMA a ADMA byly u pacientů s RA oproti kontrolní skupině zvýšeny. Plazmová SDMA byla spojena s hypertenzí a hyperlipidemií u pacientů s RA. Tento metabolický rozvrat L-argininu by tedy mohl fungovat jako potenciální indikátor rizika kardiovaskulárního onemocnění u pacientů s RA. [44]

1.4.8 Symetrický dimethylarginin ve veterinární diagnostice

Jak již bylo zmíněno na začátku této kapitoly, symetrický dimethylarginin nalezl uplatnění i ve veterinární sféře. Onemocnění ledvin je běžné u domácích zvířat a tradičně se diagnostikuje koncentrace sérového kreatininu, dusík v močovině a abnormální nálezy při analýze moče a močového sedimentu. Symetrický dimethylarginin je nový biomarker ledvin, který odráží míru glomerulární filtrace. Jeho hladina se zvyšuje dříve než hladina sérového kreatininu u akutního poškození ledvin a chronické onemocnění ledvin. [45]

V roce 2018 Ernst a kolektiv provedli srovnávací měření dvou imunochemických metod, komerčně nazývaných jako IDEXX SDMA Test a DLD SDMA ELISA. Jako srovnávací metoda sloužila kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS). Pro srovnání bylo použito 30 psích vzorků a 30 kočičích vzorků séra. Tyto vzorky byly v rámci jednoho druhu smíchány dohromady jako tzv. poolová séra, kdy polovina vzorků byla naspikována standardem SDMA o nízké koncentraci a druhá polovina byla naspikována standardem SDMA o vyšší koncentraci. Po provedeném měření bylo proveden výpočet variačního koeficientu (CV) pro test IDEXX SDMA Test, kdy hodnoty CV při nižších koncentracích SDMA dosahovaly

7,7 % a hodnoty CV při vyšších koncentracích SDMA dosahovaly 2,3 %. Hodnota rozlišení píků u testu IDEXX SDMA Test byla 0,99. U testu DLD SDMA ELISA se hodnoty CV u obou koncentracích přiblížily 30 % a rozlišení píků bylo rovno 0,27. Celkově se došlo k závěru, že IDEXX SDMA Test je vhodnější variantou pro klinické využití v diagnostice a monitoringu renálního onemocnění u psů a koček. [46]

Dnes jsou již imunochemické testy na SDMA ve veterinární praxi dostupné a běžně používané i v České republice. Je to právě IDEXX SDMA Test, pomocí něhož se stanovuje symetrický dimethylarginin. Pro práci s testem je zaveden určitý algoritmus, jak postupovat dle naměřené koncentraci SDMA. Referenční hodnoty SDMA v séru pro štěňata se pohybují v rozmezí 0-16 µg/dl. Hodnoty v rozmezí 15-19 µg/dl indikují kompletní vyšetření moči, tj. sérový kreatinin, protein, fosfor, kultivace moči, analýza močového sedimentu. Hodnoty nad 20 µg/dl vyžadují okamžitě jednat. Tyto hodnoty mohou reflektují problém s GF a mohou znamenat chronické onemocnění ledvin, těžkou dehydrataci, otravy či hypertyreózu u koček. [47]

1.5 Možnosti stanovení symetrického dimethylargininu

Symetrický dimethylarginin je společně s asymetrickým dimethylargininem nejčastěji simultánně stanovován separačními chromatografickými metodami, a to především vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií v různých modifikacích způsobu detekce a přípravou vzorku. Další možnosti stanovení jsou imunochemické metody nebo elektromigrační metody. Plazmatické koncentrace methylargininů se u zdravých jedinců pohybují v submikromolárním rozmezí a nanejvýš v několika jednotkách mikromol u nemocných pacientů. Kvantifikace je tak díky nízkým koncentrací velmi obtížná. [48], [49]

1.5.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí

Kleparnik a kolektiv pracovali s metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí (HPLC-ECD) pro simultánní stanovení L-argininu a methylargininů v plazmě. Pro analýzu vybrali 40 pacientů s akutním infarktem myokardu. Vzorky plné krve byly odebírány do zkumavek s ethylendiamintetraoctovou kyselinou a zcentrifugovány. Následně byly vzorky separované plazmy vyčištěny a zakoncentrovány pomocí extrakce na SPE kolonkách. Extrakce na SPE kolonkách s polymerní náplní probíhala v alkalickém prostředí za přítomnosti 25% amoniaku, vody, methanolu a hydroxidu sodného. Po eluci vzorku následovalo sušení pod proudem dusíku při 70 °C. Odparky vzorků byly

rozpuštěny v derivatizačním činidle, které obsahovalo o-ftaldialdehyd (OPA) A 3-merkaptopropionovou kyselinu. Po 10minutové inkubaci při laboratorní teplotě byly vzorky zneutralizovány dihydrogenfosforečnanem draselným. Následoval nástřik vzorku na kolonu a chromatografická separace za izokratických podmínek na koloně s obrácenou fází SynergiHydro RP při 25 °C. Mobilní fáze složená z 10% acetonitrilu protékala kolonou rychlostí 1ml/min. Detekce byla provedena pomocí coulometrického detektoru při potenciálu +320 mV. Délka analýzy byla 32 minut. ADMA se separoval před SDMA a rozlišení jejich píků vykazovalo hodnotu R = 1,35. Limit detekce pro SDMA byl 0,012 μM a pro L-arginin 0,013 μM. Autoři také provedli porovnání této metody s ELISA a HPLC s fluorescenční detekcí, kdy korelace mezi HPLC metodami byla pozitivní (R^2=0,967). Nicméně korelace mezi HPLC-ECD a metodou ELISA byla zanedbatelná (R^2=0,185). To samé platilo pro korelaci s HPLC s fluorescenčním detektorem (R^2=0,242). [50]

Rovněž Suzuki a kolektiv se zabývali stanovením dimethylargininů a dalších methylargininů metodou kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí. V roce 2012 přišli s variantou, která spočívala v použití elektrochemicky aktivnějšího činidla 6-ferrocenyl-1-hexanthiolu. Toto thiolové činidlo poskytovalo s OPA a dimethylargininy stabilnější adukt než varianta s 2-merkaptoethanolem. Stabilita při použití 6- ferrocenyl-1-hexanthiolu se pohybovala v řádu hodin. Analýza byla provedena se vzorky lidské plazmy od urologických pacientů. Vzorky plné krve byly odebírány do heparinových zkumavek a separovaná plazma byla poté zpracována obecným extrakčním postupem na SPE kolonkách dle Teerlinga. Kolonky s polymerní náplní byly kondiciovány 1 ml methanolu a 2 ml superčisté vody. Na kolonku se nanesl vzorek smíchaný z 200 μl plazmy, 10 μl vnitřního standardu N^{ω}-propyl-L-argininu a 1 ml PBS. Poté následovala promývací fáze, nejprve 1ml HCl a poté 1 ml methanolu. Methylargininy byly eluovány 1 ml elučního činidla, které obsahovalo amoniak, vodu, methanol a 2-propanol. Poté byl eluát sušen pod proudem dusíků při 60 °C. Po vysušení byl odparek rozpuštěn ve fosfátovém pufru a následovala derivatizace činidlem složeného z OPA a 6- ferrocenyl-1-hexanthiolu. Reakce probíhala za laboratorní teploty po dobu 10 minut. Samotná instrumentální analýza proběhla s duální elektrochemickou a fluorescenční detekcí pro zlepšení identifikace píků a selektivity. Analýza byla provedena na koloně Wako Combi ODS. Mobilní fáze složené z acetonitrilu a fosfátového pufru protékala kolonou rychlostí 0,8 ml/min. Elektrochemická detekce proběhla při potenciálu +1000 mV. Pro fluorescenční detekci byla zvolena vlnová délka pro excitaci 340 nm a pro emisi 455 nm. Linearita metody byla změřena do 150 μmol/l. Detekční limit pro dimethylargininy byl 0,5 pmol/l u

elektrochemické detekce a 2 pmol/l u fluorescenční detekce. Selektivita se s duální detekcí zlepšila. Výtěžnost naměřená u všech analytů se pro elektrochemickou detekci pohybovala přibližně od 89,1±7,2 do 91,0±8,2 %m, pro fluorescenční detekci od 86,6±8 do 91±8,2 %. Naměřená hodnota koncentrace SDMA ve vzorcích plazmy se pohybovala v rozmezí 0,42-0,80 μM. Naměřená hodnota koncentrace v moči se pohybovala v rozmezí 10,4-20,1 μM. [51], [52]

1.5.2 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV a fluorescenční detekcí

Původně se k analýze aminokyselin využívala iontově výměnná chromatografie s derivatizací za kolonou. Takto bylo možné stanovit methylargininy včetně dalších posttranslačně modifikovaných aminokyselin. Metoda však kvůli dosažení dobrého rozlišení měla dlouho dobu analýzy a početnější sekvence vzorků by tak nebylo výhodné měřit. [53]

V současné době metody HPLC s fluorescenčním detektorem nejvíce využívají systém obrácených fází a prekolonovou derivatizaci, která způsobuje zvýšení citlivosti metody. Samotná příprava vzorku zahrnuje čištění biologického materiálu pomocí extrakce na pevné fázi (SPE). Nejčastěji se používají kolonky s iontově výměnnou fází na bázi polymeru, protože mezi jednotlivými kroky extrakce mohou kolonky vyschnout. Extrakce pak probíhá dle standardního postupu s elučním činidlem o složení amoniak/methanol, aby se vyplavily bazické aminokyseliny. [52]

UV detekce hladin methylargininů vychází z absorpce světla karboxylové skupiny při vlnové délce 200 nm. Nejedná se o příliš specifickou metodu, jelikož mnoho organických molekul absorbuje UV záření při vlnových délkách nižších než 210 nm. Stanovení aminokyselin bez derivatizace s dostatečnou citlivostí a selektivitou v UV detektoru je prakticky nemožná a používá se spíš fluorescenční detekce s možností použití derivatizačních činidel. [52]

Alkaitis a kolektiv v roce 2015 také použili systém HPLC s obrácenými fázemi a prekolonovou derivatizací a fluorescenční detekcí. Je zajímavé, že jako interní standard byl použit syntetický monoethyl-L-arginin. Pro úpravu a zakoncentrování vzorku byla použita extrakce na SPE kolonkách. Po eluci byly vzorky sušeny pod vakuem při 45 °C po dobu 3-4 hodin. Odparky byl poté rozpuštěny v ultračisté vodě a přeneseny do vialek a připraveny k analýze. Některé vzorky byly pro studijní účely deproteinovány $HClO_4$. Následovala prekolonová derivatizace s OPA a 3-merkaptopropionovou kyselinou a dávkování na kolonu. Analýza probíhala izokraticky po dobu 42 minut. Fluorescence byla měřena při vlnových

délkách pro excitaci 340 a emisi 455 nm. SDMA eluoval v retenčním čase 34 minut a vnitřní standard monoethyl-L-arginin v čase 39 minut. Autoři uvedli, že hlavní výhodou této metody je použití pouze 12 µl vzorku séra. [53]

1.5.3 Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

Velmi populární je v poslední době spojení kapalinové chromatografie s hmotnostním detektorem různého typu (LC-MS). Tento detektor je specifičtější a citlivější než například fluorimetrická detekce derivatizovaného vzorku. Často se lze setkat s tandemovým uspořádáním hmotnostní detekce, tedy metoda MS/MS. Při tandemovém uspořádání totiž není potřeba derivatizační krok. Metodami LC-MS lze spolehlivě provést simultánní stanovení L-argininu i jeho derivátů v séru a v moči. [54]

Při LC-MS se značně ulehčuje úprava vzorku před vlastní analýzou. Čištění a zakoncentrování vzorku extrakcí na SPE kolonkách a následná derivatizace není nutná. Obvykle stačí pouze precipitace proteinů pomocí organického rozpouštědla a jeho odpaření. Běžně se k precipitaci používá acetonitril, případně směs acetonitril-methanol nebo roztok síranu zinečnatého rozpuštěný ve vodě a metanolu v poměru 1:1. Úprava vzorku je tak časově a manuálně méně náročná. Některé metody však také pracují s derivatizací vzorku, kdy se pracuje např. s 1-butanolem, který esterifikuje karboxylové skupiny za vzniku butylesterů stanovovaných analytů. [54], [55]

Při kvantitativní analýze hmotnostní spektrometrií nastává problém u komplexních biologických vzorků. Přesnost a správnost analýzy mohou ohrozit tzv. matricové efekty. Vliv těchto efektů je zapotřebí minimalizovat a existuje zaručený způsob, jak se těchto jevů zbavit. Používá se vnitřní standard značený stabilním izotopem a ke standardizaci lze použít komerčně dostupné izotopy. [56]

1.5.4 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

SDMA a ADMA lze simultánně stanovit také plynovou chromatografií nejčastěji v kombinaci s hmotnostní detekcí (GC-MS). Symetrický dimethylarginin je však větší výzvou pro stanovení metodou GC-MS narozdíl od ADMA. Vzorek je nutné před vlastní analýzou derivatizovat derivatizačním činidlem, aby se potlačil jeho polární charakter a převedl se na těkavou látku. [57]

Bollenbach a kolektiv popsali v roce 2018 metodu GC-MS, kdy jako derivatizační činidlo rovněž použili PFPA s ethylacetátem. Jako vnitřní standard byl použit izotopem značený D_6-

SDMA. Derivatizace probíhala 30 minut při 65 °C. Po derivatizaci následovalo odpaření pod proudem dusíku a následné rozpuštění odparků v borátovém pufru, pH=8,5 a toluenu. Po promíchání a následné centrifugaci byla odebrána horní organická vrstva do příslušných vialek s insertem a ty byly posunuty k následné analýza vzorku. Analýza probíhala na plynovém chromatografu s kvadrupólem a autosamplerem. Na kapilární kolonu Optima 17 byl nanášen vzorek o objemu 1 µl ve split módu. Teplota na dávkovači byla nastavena na 280 °C. Jako nosný plyn bylo použito helium s průtokem 1 ml/min. Termostat byl na počátku analýzy nastaven na 90 °C, poté se teplota zvyšovala po 35 °C až na 320 °C. Pro chemickou ionizaci byl použit methanol. Analýza trvala přibližně 10 minut. SDMA eluoval z kolony v retenčním čase 7,28 min s m/z = 456 a D_6-SDMA eluoval v retenčním čase 7,22 min s m/z = 462. Tato metoda byla zároveň aplikována na vzorky moče od 80 zdravých chlapců ve věku 6-8 let. Přesnost metody v nenaspikovaných vzorcích byla 2,1 % a přesnost v naspikovaných vzorcích 25µM SDMA byla 2,5 %. Přesnost analyzátoru byla vyhodnocena na 0,96 ± 0,38 %. Retenční čas pro D_6-SDMA byl 6,97 min a pro SDMA 7,02 min. V závěru bylo zhodnoceno, že tato metoda je vhodná pro analýzu sérových i močových vzorků po jednokrokové derivatizaci. [57]

Tsikas a kolektiv v roce 2003 popsali metodu GC-MS, kde k úpravě vzorku použili ultracentrifugaci a jako derivatizační činidlo pro změnu použili methanol s anhydridem kyseliny pentaflluoropropionové (PFPA) za vzniku těkavých amidů pentafluoropropionové kyseliny. [58]

1.5.5 Enzymová imunoanalýza na imunosorbentech

Schulze a kolektiv v roce 2004 vyvíjeli metodu enzymové imunoanalýzy na imunosorbentech (ELISA) ke stanovení L-argininu a jeho methylderivátů. Princip stanovení symetrického dimethylargininu byla kompetitivní technika. Použili pro ni mikrotitrační destičku s jamkami potaženou SDMA, který byl vázaný na albumin. Dále pak acylační činidlo N-hydroxysukcinimido-karbonovou kyselinu v dimethylformamidu, konjugát křenové peroxidasy s anti-králičími IgG a králičí antisérum s anti-N-acyl-SDMA. [59]

Reakce probíhá ve dvou krocích. Po acylační reakci SDMA soutěží s N-acyl-SDMA vázaným na pevnou fázi mikrotitrační destičky o anti-N-acyl-SDMA. Po ustálení rovnováhy se odstraní volný antigen a volný komplex antigenu s protilátkou. Protilátka ve vázaném imunokomplexu reaguje s konjugátem. Přidáním substrátu s barvivem vzniká barevná reakce. Ta se okyselením zastaví a intenzita zabarvení se měří fotometricky. Intenzita zabarvení je nepřímo úměrná koncentraci methylargininům. [59]

V roce 2016 Boelaert a kolektiv prováděli stanovení SDMA a ADMA metodou ELISA u 87 dobrovolníků, z toho někteří z nich byli pacienti s chronickým onemocněním ledvin v terminální fázi. U zdravých jedinců naměřili hodnoty SDMA v rozmezí 0,62 ± 0,09 μM. Koncentrace u pacientů s CKD v terminální fázi se pohybovaly v rozmezí 2,09 ± 0,59 μM. Oproti ADMA, kde se hodnoty u zdravých dobrovolníků pohybovaly v hodnotách 0,49 ± 0,59 μM a u pacientů s CKD v rozmezí 0,97 ± 0,23 μM, lze u SDMA pozorovat signifikantnější zvýšení hodnot. [23]

Boelaert a kolektiv také vedle ELISA metody prováděli srovnání stanovení SDMA a ADMA pomocí ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovým hmotnostním analyzátorem (UPLC-MS/MS). Zajímali se o korelaci těchto dvou metod při stanovení methylargininů. Hodnoty korelace pro ADMA R=0,78 a pro SDMA R=0,72 se však neukázaly nijak signifikantně významné. [60]

1.5.6 Kapilární elektroforéza

Kapilární elektroforéza (CE) patří mezi elektromigrační metody s ostrým dělením jednotlivých píků. Principem separace je rozdílná rychlost migrace nabitých iontů v elektrickém poli. Při separaci se uplatňují dva jevy, a sice elektroforéza a elektroosmóza. Výsledný pohyb iontů je dán vektorovým součtem migrace a elektroosmózy. Pro měření nízkých koncentrací methylargininů je nutné použít kapilární elektroforézu s laserem indukovanou fluorescencí (CE-LIF). [61]

Caussé a kolektiv popsali metodu poměrně rychlého stanovení L-argininu a methylargininů pomocí CE-LIF. Sérum bylo získáno od hemodialyzovaných pacientů s projevem ischemické choroby srdeční, ale i bez. K derivatizaci vzorku byl použit fluorescein-5-isothiokyanát, a ta probíhala celou noc. Druhý den se prováděla analýza v alkalickém prostředí a jako vnitřní standard se používal L-homoarginin. Analýza trvala 10 minut. [62]

Také Trapp a kolektiv použili kapilární elektroforézu, avšak k derivatizaci vzorku použili 4-fluoro-7-nitrobenzofurazan. [63]

Pro úpravu vzorků u obou metod postačila deproteinace. Rozlišení píků ADMA a SDMA nebylo vždy dostačující. Především záleželo na složení, pH a iontové síle dělícího pufru.

Desiderio a kolektiv použili pro stanovení L-argininu, MMA, ADMA a SDMA v lidské plazmě od zdravých dobrovolníků metodu kapilární elektroforézy v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Zpracování vzorku spočívalo v precipitaci kyselinou mravenčí a

acetonitrilem. K supernatantu se následně přidal izotopem značený vnitřní standard D_7-ADMA. Pro zakoncentrování vzorku se použila technika elektrokinetického dávkování. Separace probíhala v kapiláře naplněné základním elektrolytem s kyselinou mravenčí při napětí +23 kV. Za těchto podmínek byly analyzované sloučeniny pozitivně nabité a migrovaly ke katodě. Pomocí tandemové spektrometrie s iontovou pastí byla doba analýzy kolem 15 minut. Průměrná koncentrace SDMA u zdravých subjektů byla 0,42±0,05 μmol/l. [64]

1.5.7 Micelární elektrokinetická chromatografie

Micelární elektrokinetická chromatografie (MEKC) je metoda, která kombinuje chromatografii a kapilární elektroforézu. Mechanismem separace jsou hydrofilní a iontové interakce s micelami. K dělení dochází v tzv. pseudostacionární fázi, což je elektrolyt s přidaným tenzidem, který vytváří micely. Trapp et al. použili v roce 2004 metodu micelární elektrokinetické chromatografie s laserem indukovanou fluorescencí (MEKC-LIF) pro stanovení L-argininu a methylargininů. Jako surfaktant použili deoxycholát, který umožnil separaci methylargininů s vysokým rozlišením, ale výrazně delším časem separace, než je například u CE. [63]

1.6 Elektrochemická detekce v kapalinové chromatografii

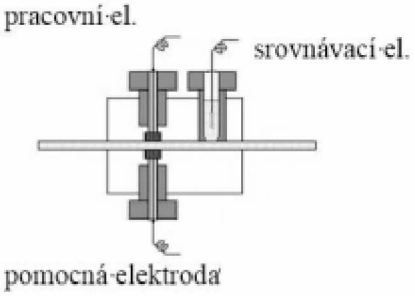
Elektrochemická detekce se jako detekční technika v kapalinové chromatografii začala používat v 70. letech 20. století. Postupně se vyvinula ve spolehlivou a všestranně použitelnou techniku, která díky své vysoké citlivosti a selektivitě nalezla uplatnění v celé řadě oblastí, ať už při analýze potravin nebo při farmakologické, a dokonce klinické analýze. [56]

Elektrochemická detekce látek je založena na měření proudu, který je vyvolaný průchodem elektroaktivní látky celou s elektrodami, na něž je vloženo napětí nezbytné pro průběh elektrochemické reakce. V separačních metodách se elektrochemická detekce využívá k měření odezvy analytů v průtoku po předchozí separaci metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Odezvu v elektrochemickém detektoru poskytují látky za předpokladu, že při kontaktu s povrchem pracovní elektrody podléhají elektrochemické konverzi, to znamená oxidaci nebo redukci. Při elektrochemické reakci dochází k výměně elektronů, které jsou detekovány jako proud v daném čase. Elektrochemická aktivita je dána chemickou strukturou daných látek. Odezva elektrochemického detektoru nezávisí na elučních podmínkách. Selektivitu a citlivost určuje potenciál, který je vložen mezi pracovní a referenční elektrodu. [65]

Mezi jednoduše oxidovatelné látky patří ty, které v molekule obsahují hydroxylovou nebo primární aminoskupinu vázanou na aromatické jádro. Dále podléhají oxidaci sloučeniny s thiolovou skupinou nebo látky s heterocyklickým dusíkem či sírou. Alifatické sloučeniny s aminoskupinou nebo hydroxylovou skupinou vyžadují k elektrochemické reakce větší energii, tedy se na elektrodu musí aplikovat vyšší potenciál. [66]

1.6.1 Kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí – amperometrie

Amperometrické detektory zaznamenávají difusní proud vyvolaný průchodem redukované nebo oxidované látky průtokovou celou detektoru při konstantním elektrodovém potenciálu jako funkci celkové koncentrace analytu. Jako měrné elektrody se u amperometrických detektorů používají tuhé měrné elektrody zhotovené ze skelného uhlíku, grafitových vláken, případně platiny či jiného kovu. [67]



Obrázek 5: Cela amperometrického detektoru

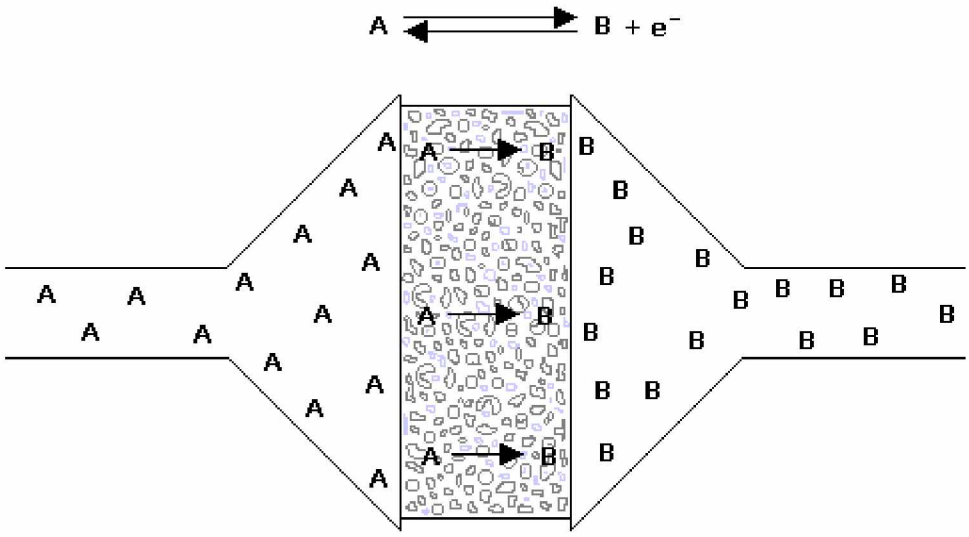
Povrch materiálů těchto elektrod se však zanáší produkty elektrochemické reakce a je potřeba provádět čištění. To se může provádět mechanickým očištěním měrné elektrody po demontáži cely detektoru. U novějších typů se čištění může provádět otočením polarity elektrodového systému nebo takzvanou pulsní technikou, kdy se na elektrodu vkládá střídavé napětí. [67]

Mobilní fáze omývá povrch pracovní elektrody. V případě amperometrického detektoru elektrochemická reakce probíhá ve velmi tenké vrstvě a oxidačně-redukční reakci na povrchu elektrody podléhá méně než 10 % analyzované látky. Konstrukce měrných cel má několik technických řešení. U válcové měrné cely prochází analyt kapilárou ve středu matky, ve které je umístěn držák s měrnou elektrodou, při tryskové konstrukci (wall-jet) vytéká efluent z trysky a omývá přímo měrnou elektrodu. Průtokové měrné cely lze miniaturizovat pro práci s mikrokolonami nebo kapilárními kolonami. Amperometrický detektor je značně selektivní a citlivý, mez detekce (LOD) může dosahovat hodnot 0,01-1 ng. Jako srovnávací elektroda se

dříve používala kalomelová nebo chloridostříbrná elektroda, dnes se častěji používá vodíková elektroda. Účinnost elektrochemické reakce závisí na dvou faktorech. Prvním je difuse elektroaktivních látek k povrchu pracovní elektrody, kde probíhá samotná reakce a druhým faktorem je rychlost průtoku mobilní fáze. Amperometrický detektor je tak závislý na průtoku mobilní fáze. Znečištění elektrodepozicemi a jejich adsorpcí na povrchu elektrody se značně snižuje její účinnost a klesá tak hodnota analytického signálu. [67], [68]

1.6.2 Kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí – coulometrie

Coulometrické detektory jsou založeny na kvantitativní přeměně elektroaktivní látky na pracovní elektrodě neboli měří náboj potřebný k oxidaci či redukci celkového množství látky při jejím průchodu měrnou celou. Předpokladem je stoprocentní proudová účinnost. Ke coulometrické účinnosti konverze je zapotřebí použít průtočnou elektrodu neboli elektrodu fritového typu, která je na bázi porézního grafitového uhlíku. Výhodou této elektrody je mimo jiné její vysoká selektivita, stabilita a již zmiňovaná účinnost. Další výhodou a možností zvýšení selektivity je sériové zapojení dvou a více elektrod, na které je vloženo různé napětí. V případě, že existují v daném systému dva separované analyty a liší se svými elektrochemickými vlastnostmi, tak je možné je od sebe voltametricky rozlišit. Jejich půlvlnový potenciál se však musí lišit alespoň o 60mV. [68],



Obrázek 6: Porézní grafitová elektroda fritového typu

Zapojením čtyř nebo až šestnácti coulometrických elektrod lze získat detektor, který je podobný detektoru diodového pole, tzv. CoulArray^{TM}. Přestože má coulometrický detektor

vysoký aplikační potenciál a v sériovém uspořádání dosahuje vysoké selektivity, jedná se však o nákladné a méně robustní zařízení. [69]

Obecně elektrochemické detektory dosahují vysoké citlivosti, která je srovnatelná s citlivostí fluorimetrického nebo hmotnostního detektoru. Elektrochemická detekce je použitelná pro normální i obrácené fáze. Nejvhodnější je však použití systému obrácených fází, protože mobilní fáze musí být vodivá a je zde nutná přítomnost elektrolytů, např. fosfáty, citráty, acetáty. Jsou tu také další praktická omezení a podmínky, které musí být při práci s coulometrickým detektorem dodrženy. Důležitou roli hraje pH mobilní fáze, které vedle retence látek může ovlivňovat elektrochemickou aktivitu. Vysoká čistota komponent mobilní fáze je nezbytnou nutností. Odstranění mechanických nečistot a stejně tak odstranění rozpuštěných plynů v mobilní fázi, zejména kyslíku je tak podmínkou. Důležitým krokem čištění mobilní fáze je použití filtrů o porozitě alespoň 0,2 μm. V neposlední řadě pomáhá k čistotě také použití ultrazvukové lázně. [66], [69]

Určité nároky jsou kladeny i na použitou instrumentaci. Potíže dělají v HPLC systému součásti a spojovací materiál z nerezové oceli, ze které je možná kontaminace ionty dvojmocných kovů. Čerpadlo by mělo nejlépe pracovat v bezpulzním režimu a s reprodukovatelnou rychlostí průtoku. Pro detektor je výhodné, je-li napájen ze samostatného záložního zdroje. [66]

Celkově má systém obrácených fází v kombinaci s elektrochemickým detektorem široký aplikační rozsah a výbornou kompatibilitu s měřením vzorků biologické povahy. Přestože má metoda HPLC-ECD náročné požadavky, nepředstavují nějaké omezení či problém v rutinní praxi. Podobně vysoké nároky se dnes uplatňují i např. ve stopové analýze.

2 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo vypracovat metodu pro stanovení symetrického dimethylargininu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí a pokusit se o její optimalizaci tak, aby byla použitelná pro stanovení tohoto parametru v lidské plazmě. Získané výsledky se měly zhodnotit vzhledem k výsledkům publikovaným v literatuře.

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Chemikálie, použitý materiál a přístroje

3.1.1 Chemikálie

N^G, $N^{G'}$-dimethyl-L-arginin di(p-hydroxyazobenzen-p-sulfonát) (SDMA), ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; MW: 758,82 g/mol)

N^G-methyl-L-arginin acetát (MMA) ≥ 98 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; MW: 248,28)

ortho-ftaldialdehyd, ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; MW: 134,13 g/mol)

3-merkaptopropionová kyselina, ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; MW: 106,14 g/mol)

acetonitril pro HPLC, ≥ 99,9 % (Merck, Kenilworth, New Jersey, USA; MW: 41,05 g/mol)

dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát, ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; MW: 156,01 g/mol)

hydrogenfosforečnan sodný, ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; MW: 141,96 g/mol)

hydroxid sodný, ≥ 98 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; MW: 40 g/mol)

boritan draselný tetrahydrát, ≥ 99,5 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; MW: 305,5 g/mol)

kyselina boritá, ≥ 99,5 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; MW: 61,83 g/mol)

methanol LiChrosolv®, ≥ 99,8 % (Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; MW: 32,04 g/mol)

kyselina chlorovodíková 37 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; MW: 36,46 g/mol)

hydroxid amonný, 25 % pro HPLC (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; MW: 35,05 g/mol)

chlorid sodný, ≥ 99,5 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; MW: 58,44 g/mol)

3.1.2 Materiál a soupravy

Chromatografická kolona ARION® Polar C18, 3,0 µm, 150 mm x 4,6 mm (Chromservis, Praha, Česká republika)

SPE kolonky Strata^{TM}-X-C 33 µm Polymeric Strong Cation, 30 mg/1ml (Phenomenex, Torrance, CA, USA)

Vakuový SPE manifold Visiprep^{TM} (Supelce, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

Polytetrafluorethylenové stříkačkové filtry CHROMAFIL® (Macherey-Nagel, Düren, Německo)

3.1.3 Přístroje

Systém HPLC s elektrochemickou detekcí se skládal z:

- detektor Coulochem III (50W) (ESA, Chelmsford, MA, USA) s průtokovou analytickou buňkou model 5010A (ESA, Chelmsford, MA, USA)
- termostat pro chromatografickou kolonu CTO-10Asvp (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
- čerpadlo LC-10ADvp (Shimadzu, Kjóto, Japonsko)
- ochranná cela model 5020 (ESA, Chelmsford, MA, USA)
- manuální dávkovací ventil Rheodyne® model PEEK – 9725i (IDEX Health&Science, Northbrook, IL, USA).

Přenosný konduktometr (HANNA instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA)

Přenosný pH/mV/°C metr, model HI 8314 (HANNA instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA)

Termovap-Sample Concentrator TV 10 (ECOM spol. s r.o.)

Systém pro přípravu ultračisté vody model MicroPure UV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

3.1.4 Software

Chromatografický software Clarity (DataApex, Praha, Česká republika)

3.1.5 Ostatní materiál a pomůcky

Orbitální třepačka, pipety, skleněné zkumavky, plastové zkumavky, plastové mikrozkumavky, odměrné válce, skleněné kádinky, injekční stříkačky, mikrostříkačky Hamilton, filtrační systém na filtraci roztoků pro kapalinovou chromatografii, vakuová pumpa

3.2 Příprava roztoků

3.2.1 Mobilní fáze

Mobilní fáze A sloužila pro chromatografickou separaci a mobilní fáze B pro promytí a jako uchovávací roztok chromatografické kolony.

Mobilní fáze A

Mobilní fáze A o pH 6,1 a objemu 1000 ml obsahovala fosforečnan draselný o koncentraci 25 mmol/l a 9,5 % acetonitrilu. Připravena byla rozpuštěním 3,9 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ v 95 ml acetonitrilu a doplněna do celkového objemu 1000 ml ultračistou vodou. Počáteční pH mobilní fáze bylo 4,75 a upraveno na pH 6,1 pomocí přenosného pH metru a roztokem NaOH. Po přefiltrování a odvzdušnění v ultrazvukové lázni byla mobilní fáze A uchována při teplotě 4 °C až to analýzy.

Mobilní fáze A o pH 6,1 a objemu 500 ml obsahovala fosforečnan draselný o koncentraci 25 mmol/l a 8,5 % acetonitrilu. Připravena byla rozpuštěním 1,95 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ v 42,5 ml acetonitrilu a doplněna do celkového objemu 500 ml ultračistou vodou. Počáteční pH mobilní fáze bylo 4,83 a upraveno na pH 6,1 pomocí přenosného pH metru a roztokem NaOH. Po přefiltrování a odvzdušnění v ultrazvukové lázni byla mobilní fáze A uchována při teplotě 4 °C až to analýzy.

Mobilní fáze A o pH 6,1 a objemu 350 ml obsahovala fosforečnan draselný o koncentraci 25 mmol/l a 7,5 % acetonitrilu. Připravena byla rozpuštěním 1,37 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ v 26,3 ml acetonitrilu a doplněna do celkového objemu 350 ml ultračistou vodou. Počáteční pH mobilní fáze bylo 4,84 a upraveno na pH 6,1 pomocí přenosného pH metru a roztokem NaOH. Po přefiltrování a odvzdušnění v ultrazvukové lázni byla mobilní fáze A uchována při teplotě 4 °C až to analýzy.

Mobilní fáze B

Mobilní fáze B obsahovala 70 % acetonitrilu a byla připravena v celkovém objemu 1000 ml smícháním 700 ml acetonitrilu a 300 ml ultračisté vody. Po přefiltrování a odvzdušnění v ultrazvukové lázni byla mobilní fáze B uchována při teplotě 4 °C až to analýzy.

3.2.2 Roztoky pro extrakci na pevné fázi

Fosfátem pufrovaný fyziologický roztok

Fosfátem pufrovaný fyziologický roztok (PBS) o pH 8 a celkovém objemu 500 ml obsahoval fosfátový pufr o koncentraci 10 mmol/l a NaCl o koncentraci 40 mmol/l. PBS pufr se připravil rozpuštěním 4,091 g NaCl v 500 ml fosfátového pufru o pH 8 a koncentraci 10 mmol/l. PBS pufr byl uchován v lednici při teplotě 4 °C.

Fosfátový pufr

Fosfátový pufr o pH 8 a koncentraci 10 mmol/l byl připraven smícháním dvou zásobních roztoků. Zásobní roztok A obsahoval hydrogenfosforečnan sodný a zásobní roztok B obsahoval dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát.

Zásobní roztok A o koncentraci 0,2 mol/l byl připraven rozpuštěním 2,839 g Na_2HPO_4 ve 100 ml ultračisté vody. Zásobní roztok B o koncentraci 0,2 mol/l byl připraven rozpuštěním 3,120 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ ve 100 ml ultračisté vody. Následně byl připraven pracovní roztok fosfátového pufru o pH 8 a koncentraci 0,1 mol/l smícháním 47,35 ml roztoku A a 2,65 ml roztoku B. Smíchané roztoky se doplnily ultračistou vodou na výsledný objem 100 ml.

Nakonec se smíchalo 50ml pracovního roztoku fosfátového pufru s 450 ml ultračisté vody. Tak byl získán fosfátový pufr o pH 8 a koncentraci 10 mmol/l o celkovém objemu 500 ml a tento pufr byl uchován při teplotě 4 °C.

Eluční činidlo

Eluční činidlo bylo připraveno v celkovém objemu 100 ml smícháním 10 ml 25% roztoku amoniaku s 40 ml ultračisté vody, s 50 ml methanolu a s 0,5 ml roztoku NaOH o koncentraci 1 mol/l.

Roztok NaOH

Roztok NaOH o koncentraci 1 mol/l byl připraven rozpuštěním 5 g NaOH v 50 ml ultračisté vody a byl uchován při teplotě 4 °C.

Roztok HCl

Roztok HCl o koncentraci 100 mmol/l byl připraven z 821 µl 37% HCL a doplněním do objemu 100 ml ultračistou vodou. Tento roztok byl uchován při teplotě 4 °C.

3.2.3 Roztoky pro derivatizaci

Derivatizační činidlo

Derivatizační činidlo o celkovém objemu 4 ml bylo připraveno rozpuštěním 10 mg *ortho*-ftaldialdehydu v 200 µl methanolu a smícháním s 3,8 ml boritanového pufru a 10 µl kyseliny 3-merkaptopropionové. Takto připravené činidlo bylo následně přefiltrováno přes polytetrafluorethylenový stříkačkový filtr a uchováno při teplotě 4 °C.

Boritanový pufr

Boritanový pufr o pH 9,21 a koncentraci 200 mmol/l byl připraven rozpuštěním 3,055 g tetrahydrátu boritanu draselného v 50 ml ultračisté vody. Roztok byl uchován při teplotě 4 °C.

Neutralizační činidlo

Roztok neutralizačního činidla o koncentraci 200 mmol/l byl připraven rozpuštěním 0,157 g $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ v 5 ml ultračisté vody. Takto připravené činidlo bylo následně přefiltrováno přes polytetrafluorethylenový stříkačkový filtr a uchováno při teplotě 4 °C.

3.2.4 Roztoky standardních látek

Zásobní roztoky standardních látek

Ze standardní látky symetrického dimethylargininu (SDMA) a vnitřního standardu monomethylargininu (MMA) byly připraveny zásobní roztoky jejich rozpuštěním v 10 mmol/l HCl. Zásobní roztoky SDMA byly připraveny o koncentraci 941,31 µmol/l. Zásobní roztok vnitřního standardu MMA byl připraven o koncentraci 2876,94 µmol/l. Připravené zásobní roztoky se rozpipetovaly v alikvotních podílech do mikrozkumavek a byly uchovány při teplotě -20 °C.

Pracovní roztoky standardních látek

Ze zásobních roztoků jednotlivých standardních látek se připravily roztoky o koncentraci 40 µmol/l. Pracovní roztok SDMA byl ředěn roztokem 10 mmol/l HCl a pracovní roztok MMA se ředil PBS pufrem. Pracovní roztoky byly uchovány při teplotě 4 °C.

3.3 Biologické vzorky

Vzorky krve byly získány od pacientů léčených na Kardiologickém oddělení Interní kliniky Pardubické krajské nemocnice, a.s. Tito pacienti byli začleněni do studie s názvem „Zánětlivá odpověď po implantaci absorbovatelných koronárních stentů“, která byla schválena etickou komisí při Pardubické krajské nemocnici, a.s. dne 13. 12. 2013. Každý z pacientů podepsal informovaný souhlas. Zmíněné formuláře jsou součástí přílohy A a B.

Krev od pacientů, za účelem získání plazmy, byla odebrána do sterilních zkumavek s protisrážlivým činidlem vždy před a v různých intervalech po zákroku koronární intervence. Během transportu byly vzorky krve uchovávány u ledu. Po transportu se krev ve zkumavkách zpracovala centrifugací po dobu 10 minut při 3500 otáčkách za minutu a při teplotě 4 °C. Následně se oddělila plazma, která byla rozpipetována do zkumavek v alikvotních podílech. Alikvoty plazmy poté byly zamraženy na -80 °C a takto uchovávány až do analýzy.

Dále byly použity vzorky od dobrovolných dárců. Odběr krve proběhl na oddělení Klinické biochemie a toxikologie v Pardubické krajské nemocnici a.s. a také v prostorách společnosti MeDiLa spol. s r.o., v odběrovém centru Polabiny.

3.4 Metodika

Plazmatický vzorek byl extrahován na pevné fázi. Vzniklý eluát byl sušen při 60 ° pod proudem dusíku. Poté byl odparek derivatizován *ortho*-ftaldialdehydem s 3-merkaptopropionovou kyselinou. Symetrický dimethylarginin byl stanovován metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí.

3.4.1 Příprava standardního nebo plazmatického vzorku

Vzorky plazmy byly rozmraženy a temperovány na laboratorní teplotu. Poté bylo smícháno 200 µl plazmy nebo standardního roztoku se 100 µl vnitřního standardu MMA o koncentraci 8 µmol/l a objem byl doplněn 700 µl PBS pufru na 1 ml.

3.4.2 Extrakce na pevné fázi

Pro extrakci byly použity SPE kolonky Strata^{TM}-X-C od firmy Phenomenex s kapacitou 30 mg. Tyto kolonky byly umístěny na vakuový SPE manifold Visiprep^{TM} od firmy Supelco, ke kterému byla napojena vakuová pumpa. Samotná extrakce proběhla následovně:

- kondicionace 1 ml elučního činidla;
- ekvilibrace 1 ml redestilované vody;
- nanesení 1 ml standardního nebo plazmatického vzorku a zachycení methylargininů na pevné fázi kolonky;
- promytí kolonky 1 ml 100 mmol/l HCl;
- promytí kolonky 1 ml methanolu;
- výměna skleněných zkumavek za plastové mikrozkumavky a oplach hadiček ultračistou vodou;

- nanesení 1 ml elučního činidla na kolonku a uvolnění methylargininů z pevné fáze.

Získaný eluát byl vysušen pod proudem dusíku při teplotě 60 °C. Sušení trvalo přibližně 75 minut.

3.4.3 Derivatizace a dávkování na kolonu

Jako derivatizační činidlo byla použita směs OPA s 3-merkaptopropionovou kyselinou. Vysušený eluát byl resuspendován ve 100 µl derivatizačního činidla a poté se vzorek nechal inkubovat 10 minut při laboratorní teplotě. Po inkubaci byl vzorek zneutralizován 100 µl neutralizačního činidla obsahujícího dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát. Takto připravený vzorek o objemu 10 µl byl mikrostříkačkou ihned dávkován na kolonu.

3.4.4 Kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí

Chromatografická separace probíhala na chromatografické koloně ARION® Polar C18 za izokratických podmínek za přítomnosti mobilní fáze A o pH 6,1 o 9,5 obj. % acetonitrilu. Průtok byl 1 ml/min a teplota kolony 30 °C. Po eluci posledního analytu byla ukončena analýza a kolona promyta mobilní fází B obsahující 70 obj. % acetonitrilu. Jedna analýza trvala asi 45 minut.

Pro elektrochemickou detekci byl použit detektor Coulochem® III. Tento detektor umožňuje metodu měření amperometrické nebo coulometrické detekce. Pro detekci byla použita citlivější metoda coulometrické detekce s napětím +320 mV a citlivostí 500 nA.

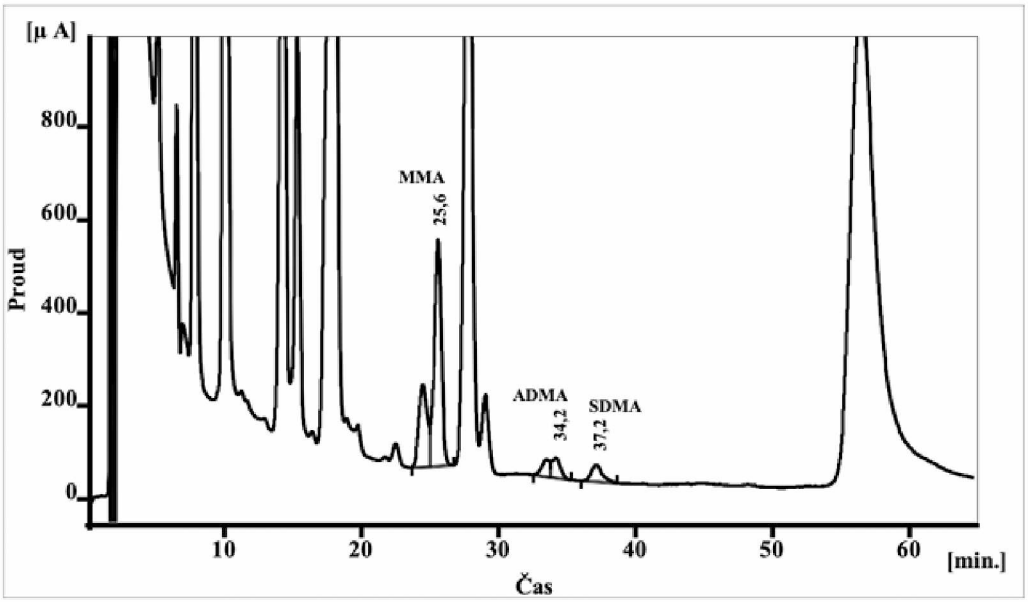
3.4.5 Vyhodnocení a výpočty

Vyhodnocení chromatogramů bylo provedeno pomocí chromatografického softwaru Clarity. Chromatogramy znázorňovaly proudovou odezvu detektoru v závislosti na čase a u získaných píků se určovala plocha pod křivkou (AUC). Ke kvantifikaci se využívala metoda jednoho standardu a pro výpočet v MS Excel byly použity hodnoty plochy pod křivkou analytu a vnitřního standardu.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Základní vědeckou publikací pro experimentální část diplomové práce zaměřenou na stanovení SDMA v lidské plazmě pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí je publikace Kleparnika a kolektivu z roku 2013. [50]

Dále tato experimentální část navazovala na diplomovou práci Mgr. Anny Runčíkové z roku 2021, ve které se zaměřovala na stanovení asymetrického dimethylargininu (ADMA) pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí. Přestože s ADMA koeluoval další neznámý pík, touto metodou se jí však úspěšně podařilo oddělit SDMA v lidské plazmě kardiaka. Tento závěr byl tak pro nás výchozím bodem a rozhodli jsme se symetrickému dimethylargininu věnovat pozornost a pokusit se o jeho optimalizaci stanovení a pokoušet se o separaci ADMA a IS od interferujících píků. Finální záznam Mgr. Runčíkové uveden na **Obrázku 7**.



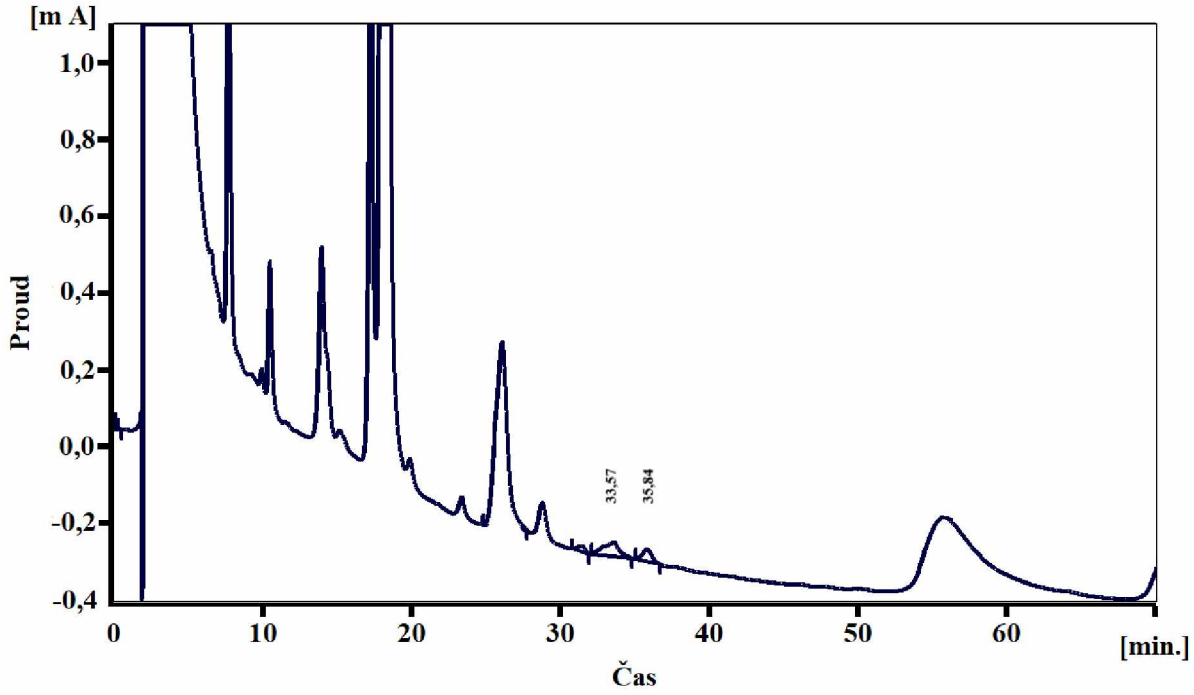
Obrázek 7 Záznam měření vzorku poolové plazmy, převzato z *[39]*; podmínky měření: T = 30 °C, průtok 1 ml/min, MF A = 9,5 % acetonitrilu, citlivost 500 nA

MMA – monomethylarginin, ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

4.1 První měření na koloně ARION® Polar C18

V první fázi nás zajímalo, zda dokážeme zopakovat stejný výsledek za stejných podmínek měření jako u poslední analýzy, která se měřila před 1,5 rokem a zda od sebe dokážeme oddělit dimethylargininy a dosáhnout u standardů ADMA a SDMA rozlišení R>2,47. Použili jsme vzorek plazmy kardiaka bez vnitřního standardu. Vzorek byl dle postupu upraven extrakcí na

pevné fázi, vysušen pod proudem dusíku a odparek byl derivatizován OPA s 3-merkaptopropionovou kyselinou. Po derivatizaci a neutralizaci byl vzorek nadávkován na kolonu. Separace probíhala při teplotě kolony 30 °C, průtoku 1ml/min s mobilní fází obsahující 9,5 % acetonitrilu, napětí +320 mV a citlivostí 500 nA. Záznam uveden na **Obrázku 8**.



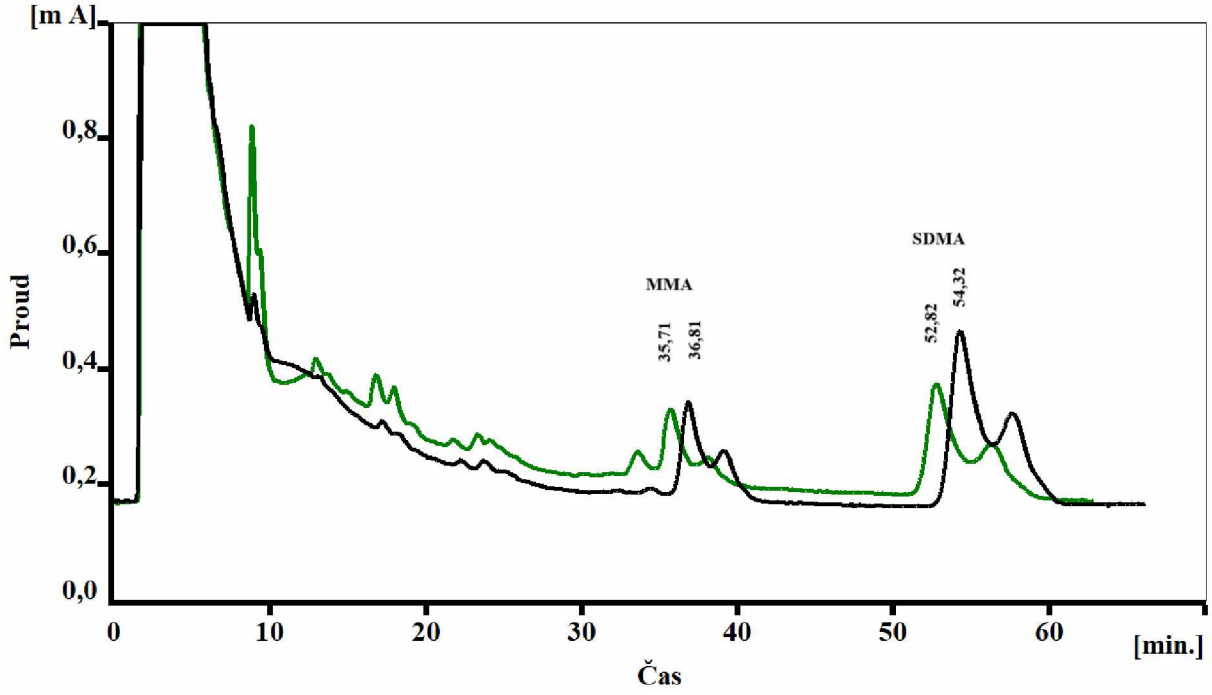
Obrázek 8 Záznam měření plazmatického vzorku kardiaka; podmínky měření: T = 30 °C, průtok 1 ml/min, MF A = 9,5 % acetonitrilu, citlivost 500 nA

Dle záznamu je zřejmé, že se nám měření povedlo zopakovat. Retenční čas pro pravděpodobný výskyt ADMA byl naměřen jako T_R = 33,6 min, pro SDMA pak T_R = 35,8 min. Přestože chromatografický záznam nebyl příliš citlivý, retenční časy byly velmi podobné s těmi na **Obrázku 7**. Jednalo se však o vzorek poolové plazmy, tedy smíchaný z plazmy více pacientů a naše měření zaznamenávalo biologický vzorek od jednoho pacienta. Záznam jasně ukazuje, že v oblasti retenčního času ADMA eluuje další neznámá látka.

4.2 Měření standardních roztoků

Před měřením plazmatických vzorků jsme provedli několik měření s nově nakoupenou standardní látkou (SDMA) a vnitřním standardem. Vyskytl se problém s tvořením dvojpíků vnitřního standardu a SDMA. Tento problém nebyl v předchozí diplomové práci popsán a tudíž ani řešen. Problém jsme se pokusili řešit navýšením poměru derivatizačního činidla ku směsi standardů. Porovnali jsme poměr použitého objemu derivatizačního činidla s objemem směsi standardu SDMA o koncentraci 10 µmol/l s IS o koncentraci 8 µmol/l. Analýza probíhala při

teplotě 37 °C, průtoku 1 ml/min a citlivosti 500 nA. K tomu jsme zvolili pomalejší mobilní fázi se 7,5 % acetonitrilu. Na obrázku srovnání nástřiků směsi derivatizačního činidla se směsí standardů v poměru 1:1 (černá barva) a 2:1 (zelená barva). Záznam měření na **Obrázku 9**.

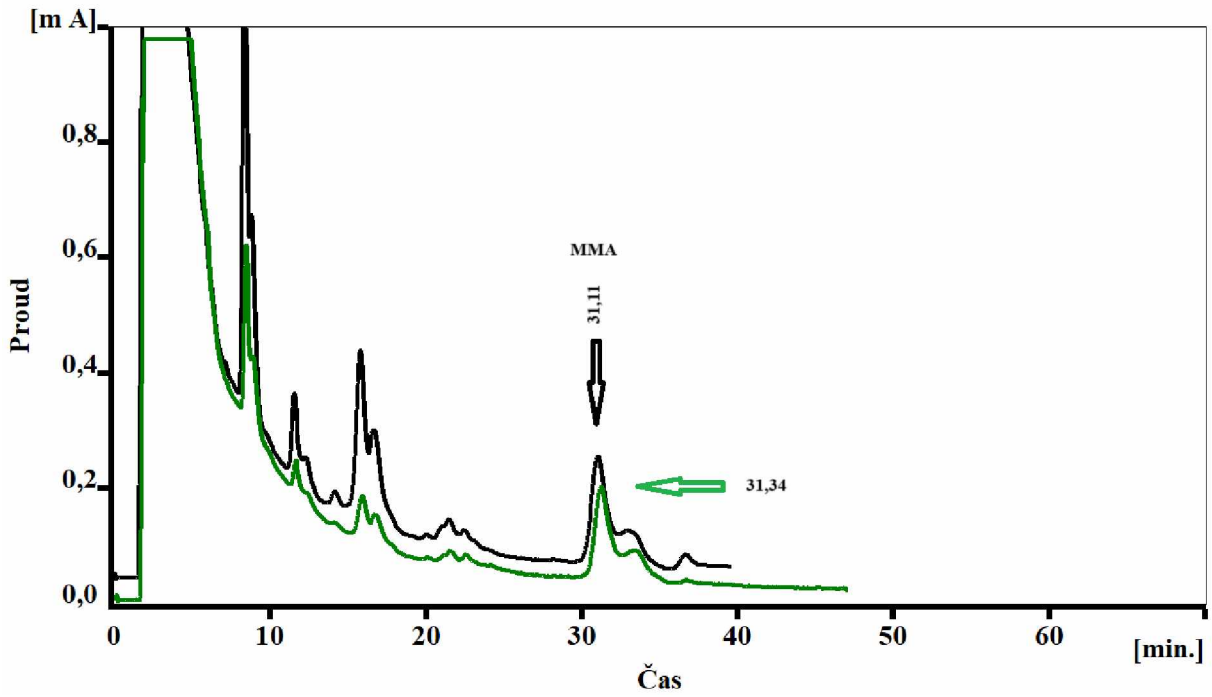


Obrázek 9 Záznam dvou chromatogramů směsi derivatizačního činidla se směsí standardů v poměru 1:1 (černá barva) a v poměru 2:1 (zelená barva)

MMA – monomethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

Změna poměru derivatizační činidlo/směs standardů však na tvorbu dvojpíků neměla vliv. Pro všechna další měření standardů a vzorků bylo použito derivatizační činidlo se vzorkem/standardem v původním poměru 1:1. Navíc jsme se přesvědčili, že analýza s takto namíchanou mobilní fází je příliš pomalá.

Pokračovali jsme s měřením standardní látky s vnitřním standardem a snažili se porovnat, zda bude mít vliv na tvorbu dvojpíků typ použitého ředícího roztoku, ve kterém se standardy ředí. Zároveň jsme změnili složení MF A, a to na 8,5 % acetonitrilu. Tím se analýza zrychlila asi o 10 minut. Měření probíhaly při teplotě 30 °C, citlivosti 500 nA a rychlosti průtoku MF 1 ml/min. Záznam na **Obrázku 10**.



Obrázek 10 Záznam chromatogramů vnitřního standardu o koncentraci 8 μmol/l rozpuštěného v PBS (černá barva) a v HCl (zelená barva)

MMA – monomethylarginin

Ze záznamu je zřejmé, že ani rozdílná činidla, ve kterých byl vnitřní standard rozpuštěn, neměla na tvorbu dvojpíků MMA žádný vliv.

Přestože jsme během měření standardní látky s vnitřním standardem nepřišli na důvod, proč se dvojpíky tvoří, rozhodli jsme se i přes tento fakt postoupit dál a přesunout se na měření vzorků z biologického materiálu. Doufali jsme, že problém vyřešíme během dalších měření a zjistíme, zda stejný problém bude i ve vzorcích.

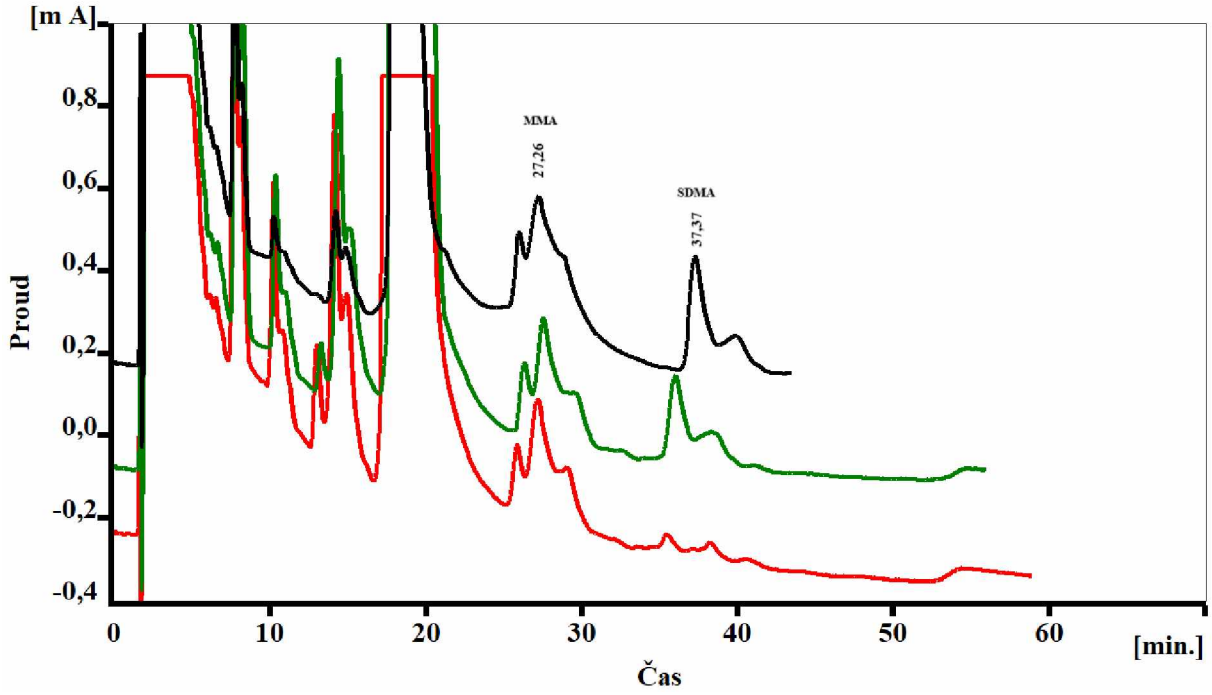
4.3 Měření vzorků lidské plazmy

Od značně starších plazmatických vzorků kardiaků jsme se přesunuli na měření vzorků lidské plazmy z krve dobrovolných dárců. Krev byla odebírána do zkumavek s heparinátem lithným a do zkumavek s ethylendiamintetraoctovou kyselinou (EDTA).

Během měření biologických vzorků nás kromě dvojpíků trápil také problém s citlivostí, která nebyla úplně podle našich představ. Pokusili jsme se tedy tento problém řešit.

Nejdříve jsme zkusili porovnat, zda bude mít vliv na citlivost měření rozdílné antikoagulační činidlo ve zkumavkách. Provedli jsme analýzu krve z heparinové zkumavky, zkumavky s EDTA a samotného standardu SDMA o koncentraci 10 μmol/l s vnitřním standardem MMA.

Analýzy probíhaly při teplotě 30 °C, citlivosti 500 nA, průtoku 1 ml/min a s 9,5 % acetonitrilu v mobilní fázi A. Záznam měření na **Obrázku 11**.



Obrázek 11 Záznam chromatogramů standardu SDMA o koncentraci 10 µmol/l s vnitřním standardem o koncentraci 8 µmol/l (černá barva), vzorku s IS z EDTA zkumavky (zelená barva) a vzorku s IS z heparinové zkumavky (červená barva)

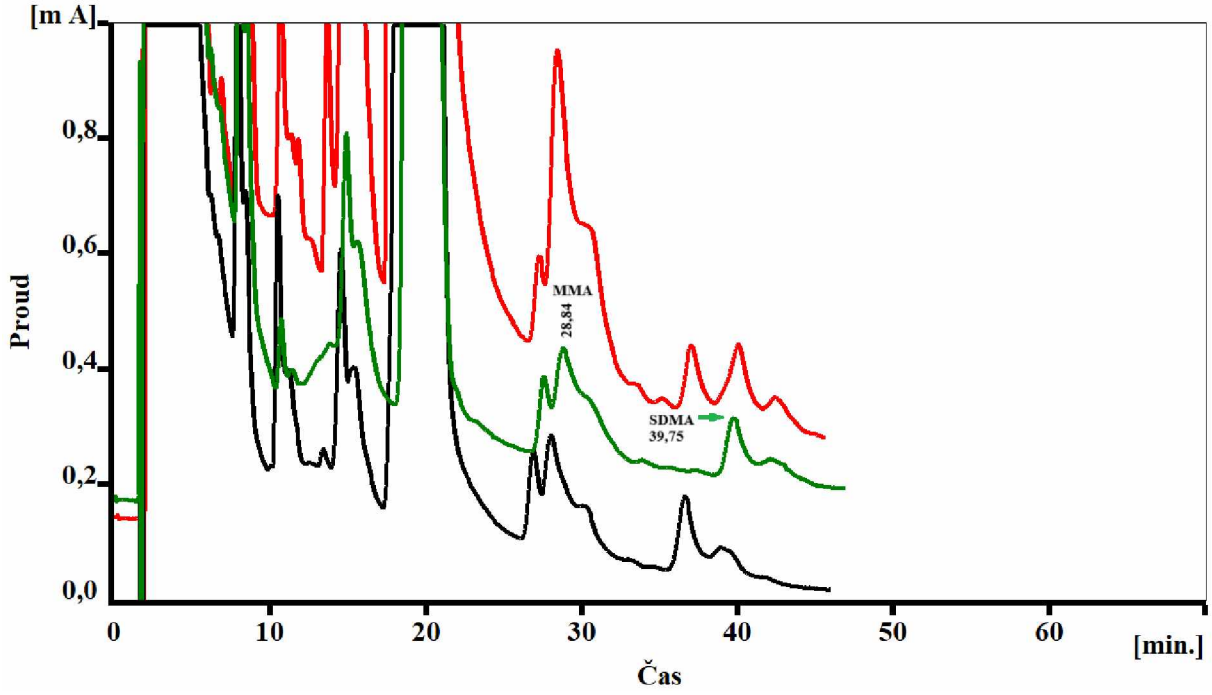
MMA – monomethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

Ze záznamů je zřejmé, že antikoagulační činidla obsažená ve zkumavkách nemají vliv na výskyt dvojpíků, ani na citlivost metody.

Kvůli zjednodušené instrumentaci (Coulochem III.) a nemožnosti použít gradientovou eluci a delšímu ustalování detektoru při změně MF jsme nedodržovali proplachy MF B po jednotlivých měřeních, jako to aplikoval Kleparnik a kolektiv (CouloArray). Místo toho jsme prodloužili proplachování MF A, abychom se vyhnuli časově náročnému ustalování detektoru při přepnutí mobilních fází. Po této sérii měření jsme se však také rozhodli pro jednorázový intenzivní proplach kolony. Proplach vodou trval 3 hodiny a po ní následoval 2hodinový proplach mobilní fází B. Ten den již neproběhlo žádné měření. Od této chvíle se mezi každým vzorkem začala kolona promývat mobilní fází B, a to vždy po dobu alespoň 10 minut. Promývání mezi jednotlivými vzorky znamenalo značné zlepšení citlivosti metody.

Po proplachu následovalo měření standardu SDMA o koncentraci 5 µmol/l s IS (zelená barva). Dále jsme měřili vzorek plazmy z EDTA zkumavky s IS a přídavkem 1 µmol/l (červená

barva) a vzorek kardiaka s IS (černá barva). Všechny tři analýzy byly provedeny z týden starých odparků. Měření proběhlo za T = 30°C, citlivosti 500 nA, průtoku 1 ml/min a složení MF A 9,5 % acetonitrilu. Záznam měření na **Obrázku 12**.



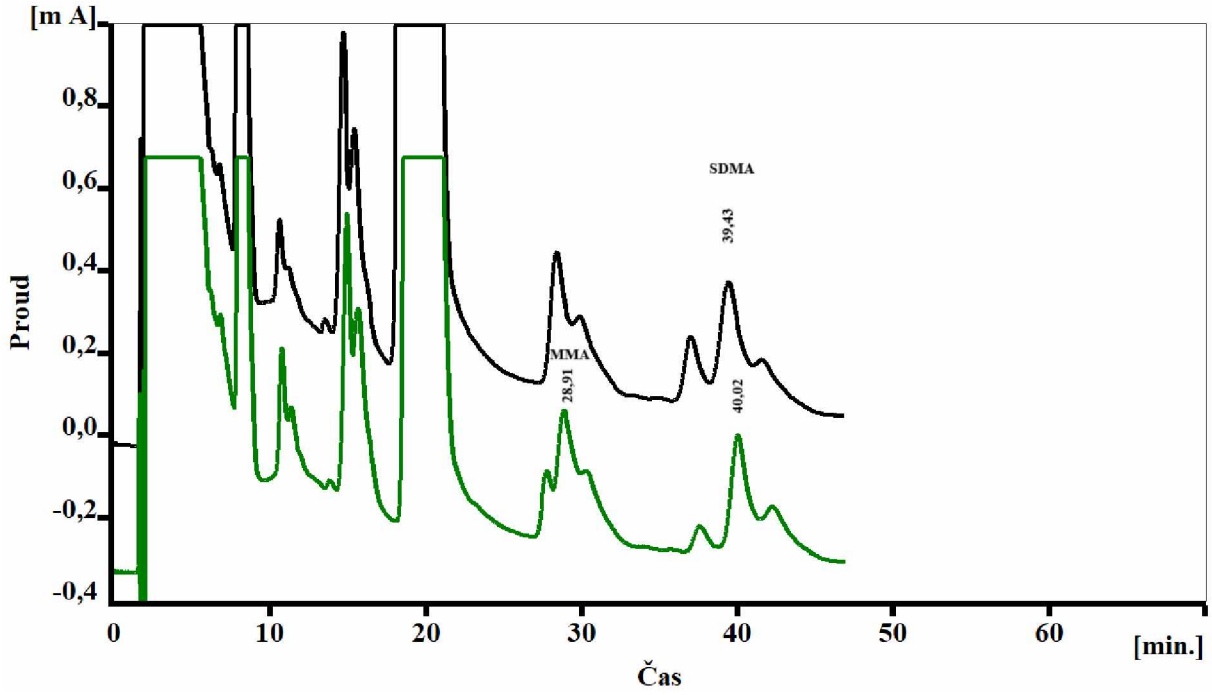
Obrázek 12 Záznam chromatogramů standardu SDMA o koncentraci 5 µmol/l s IS o koncentraci 8 µmol/l (zelená barva), vzorku z EDTA zkumavky s IS a přídavkem 0,25 µmol/l SDMA (červená barva) a vzorku kardiaka s IS (černá barva)

MMA – monomethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

Ze záznamu je zřejmé, že díky intenzivnímu proplachu se zvýšila citlivost metody. Zavedení proplachů MF B mezi jednotlivým měřením vzorků mělo také pozitivní vliv na citlivost a opakovatelnost záznamů. Červený záznam poukazuje na fakt, že bez vhodného vnitřního standardu není možné stanovení provádět. Citlivost záznamu je oproti ostatním chromatogramům několikanásobně vyšší. S navýšením koncentrace SDMA standardním přídavkem do vzorku je zřejmé, že vyšší koncentrace zhoršuje tvar píku a interferují v záznamu další látky. Přestože se červený a černý záznam významně liší dosaženou citlivostí, je zřejmé, že v černém záznamu je před retenčním časem SDMA navíc výrazný interferující pík.

Po zavedení proplachu MF B mezi jednotlivými měření jsme vyzkoušeli, zda bude mít promývání vliv na dvojpíky MMA a SDMA v měřených standardech. Provedli jsme analýzu standardů, kdy první standard obsahoval SDMA o koncentraci 10 umol/l s IS (zelená barva). Druhý standard o stejné koncentraci SDMA byl nadávkován na kolonu bez IS (černá barva).

Analýza probíhala při teplotě 30 °C, citlivosti 500 nA, průtoku 1 ml/min a s 9,5 % acetonitrilu v mobilní fázi A.

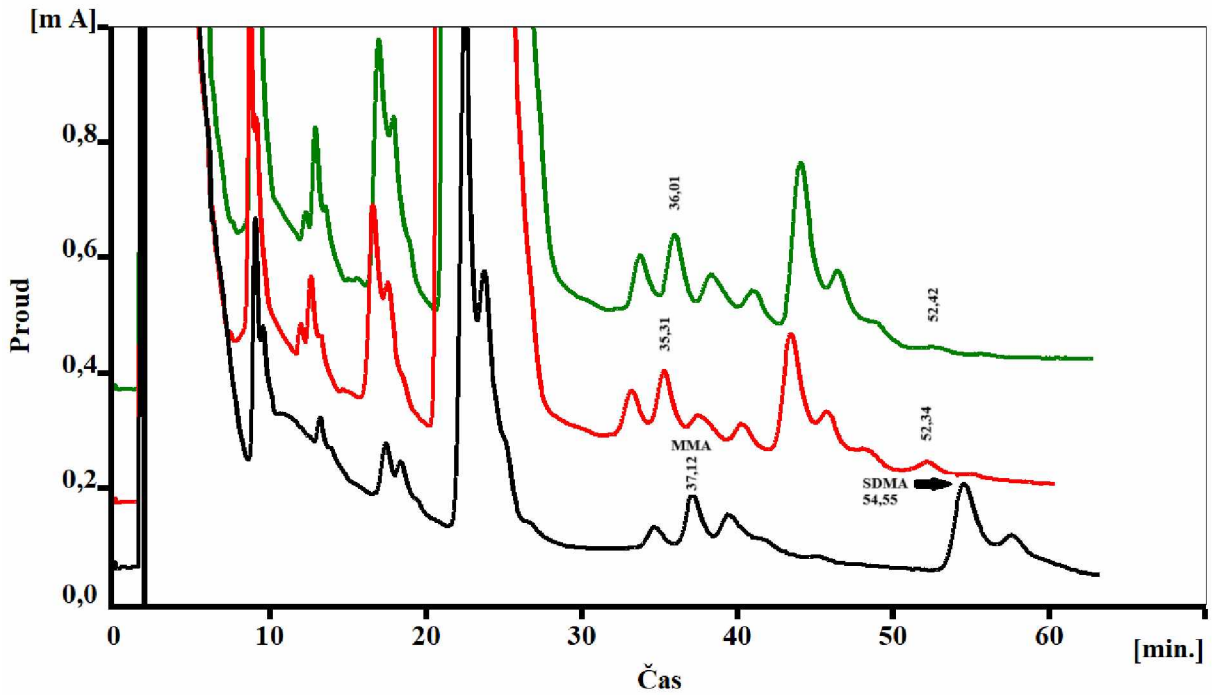


Obrázek 13 Záznam chromatogramů standardu SDMA o koncentraci 10 µmol/l s IS (zelená barva) a standardu SDMA o koncentraci 10 µmol/l bez IS (černá barva)

MMA – monomethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

Ze záznamu je patrné, že v retenčním čase MMA se vyskytuje dvojpík, který se objevuje nehledě na použití vnitřního standardu. Tento dvojpík není možné oddělit od MMA a objevuje se při použití proplachu MF B.

Následující dny jsme provedli měření standardu SDMA s IS (černá barva), vzorku s IS z EDTA zkumavky (zelená barva) a vzorku s IS a přídavkem 1 µmol/l z EDTA zkumavky (červená barva). Ve snaze oddělit dvojpíky u retenčních časů MMA a SDMA jsme použili pomalejší mobilní fází o složení 8,5 % acetonitrilu. Ostatní podmínky měření zůstaly zachovány, tedy teplota 30 °C, citlivost 500 nA a průtok 1 ml/min. Analýza se protáhla přibližně o 10 minut. Záznam na **Obrázku 14**.

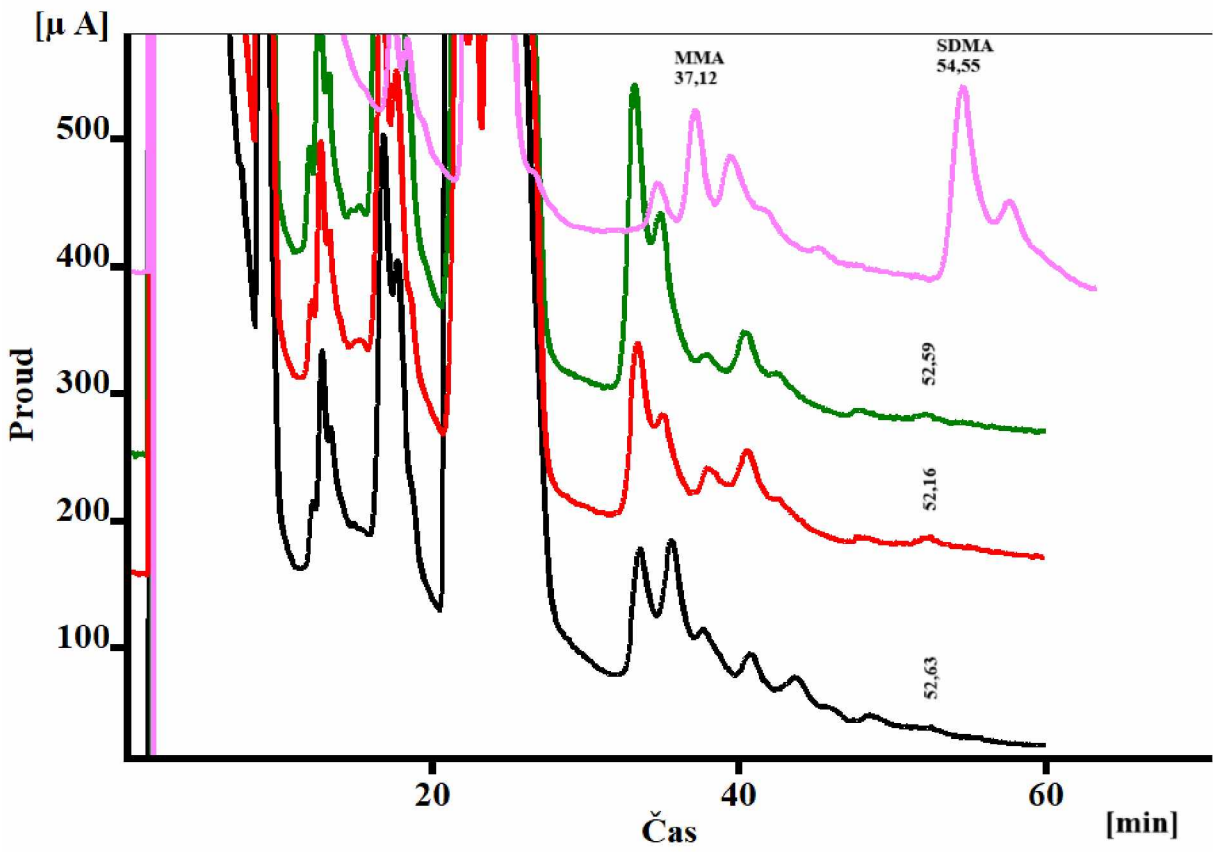


Obrázek 14 Záznam chromatogramů standardu SDMA o koncentraci 10 µmol/l s IS o koncentraci 8 µmol/l (černá barva), vzorku z EDTA zkumavky s IS (zelená barva) a vzorku z EDTA zkumavky s IS a přídavkem 1 µmol/l (červená barva)

MMA – monomethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

Tento chromatogram zaznamenává zásadní změnu, kterou jsme provedli při proplachu mezi jednotlivými měření vzorků. Jako proplachovací roztok totiž nebyla použita MF B, ale roztok acetonitrilu s vodou v poměru 1:1. Takto připravený roztok se nechal proplachovat kolonou po každém měření přibližně 20 minut. Prvním měřeným záznamem před zavedením těchto proplachů je chromatogram standardu SDMA s IS (černá barva). Ze záznamu je zřejmé, že změna promývacího roztoku v kombinaci s pomalejší MF A pomohla posunu interferujícího dvojpíku u měřených vzorků a tyto dva záznamy se povedlo zopakovat.

Při posledním měření jsme se chtěli přesvědčit, zda nám promývací krok pomůže k naměření záznamů, které budou opakovatelné při měření několika biologických vzorků po sobě a zda se podaří posunout interferující dvojpík z retenčního času SDMA. Provedli jsme měření vzorku EDTA s IS (černá barva) a dvou vzorků EDTA bez IS (červená barva, zelená barva). Měření probíhalo při teplotě 30 °C, citlivosti 500 nA a průtoku 1 ml/min. Složení MF A s obsahem **8,5** % acetonitrilu. Záznam uveden na **Obrázku 15**. Pro porovnání standard SDMA s IS naměřen předchozí den (růžová barva).



Obrázek 15 Přiblížený záznam chromatogramů standardu SDMA o koncentraci 10 µmol/l s IS o koncentraci 8 µmol/l (růžová barva), vzorek z EDTA zkumavky s IS (černá barva), vzorek z EDTA zkumavky bez IS (červená barva) a vzorek z EDTA zkumavky bez IS (zelená barva)

MMA – monomethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

Ze záznamu je zřejmé, že díky promývacímu roztoku s acetonitrilem a vodou v poměru 1:1 a pomalejší MF A o složení 8,5 % acetonitrilu se nám podařilo promýt kolonu tak, aby se SDMA co nejvíce oddělil od interferujících píků. Pro porovnání zde uvádíme záznam standardu SDMA z předchozího dne. Povedlo se nám 3x po sobě zopakovat měření s podobným záznamem, kdy průměrná hodnota retenčního času pravděpodobného výskytu SDMA byla vypočtena na T_R = 52,46 min. Dále je z tohoto záznamu zřejmé, že u této metody MMA jako vnitřní standard není vhodný, jelikož promývací krok či změna složení MF A na dvojpík u MMA nemá vliv.

4.4 Zhodnocení metody

Přestože se SDMA a ADMA běžně stanovují simultánně během jedné analýzy, tato práce navazovala na diplomovou práci, ve které byl dopodrobna popsán klinický význam i stanovení ADMA a dostali jsme tak prostor zaměřit se podrobněji na jeden izomer.

Metodu přípravy vzorků převzata od Kleparnika a kolektivu nebylo zapotřebí nijak upravovat, jelikož se jednalo o postup vycházející z dalších publikací, kde se zúčastněným podařilo stanovit oba dimethylargininy vedle sebe. Například Suzuki a kolektiv použili identické eluční činidlo, které obsahovalo také demineralizovanou vodu. Bohužel přítomnost vody prodlužovala krok odpařování vzorků po extrakci. Přestože se jednalo o poměrně dlouhý postup přípravy, nebylo možné využít jiný způsob zakoncentrování vzorku. Navíc je tento způsob přípravy běžně používaný v praxi. [50], [51], [52]

Nevýhodou této metody byla přítomnost dvojpíku vnitřního standardu a standardu SDMA, se kterými jsme měli problém po celou dobu měření. Problém se objevoval jak u standardních vzorků bez IS, tak u biologických vzorků. Interference u SDMA se nakonec povedlo odstranit při použití mobilní fáze o složení 8,5 % a promývání kolony promývacím roztokem acetonitrilu s vodou v poměru 1:1 mezi každým měřením, a to po dobu 20 minut. Promývací krok se ukázal být v této metodě klíčový. U promývání jsme také vycházeli z publikací, kde u proplachu autoři používali MF B o složení 70 % acetonitrilu. Nakonec jsme se však rozhodli pro změnu složení.

Výskyt interferencí v oblasti MMA i přes zavedení promývacího kroku a změny složení MF A znemožnil použití toho vnitřního standardu u této konkrétní metody s detektorem Coulochem III. Pro tuto metodu by bylo vhodnější použit vnitřní standard, který by eluoval až za dimethylargininy, ne však příliš daleko, aby se analýza neprotáhla déle než na 60 minut. Pak by totiž hrozilo, že OPA deriváty nebudou dostatečně stabilní. Jako vhodný vnitřní standard pro tuto metodu by se mohl jevit N^{ω}-propyl-L-arginin, který použili Suzuki a kolektiv při jejich analýze. Další vhodnou variantou by mohlo být použití monoethyl-L-arginin, který eluuje přibližně 5 minut po SDMA. Tento IS použili Alkaitis a kolektiv při stanovení dimethylargininů metodou HPLC s fluorescenční detekcí. [51], [53]

Na základě metody jednoho standardu, kdy jsme AUC analytu vztáhli k AUC vnitřního standardu MMA, jsme vypočítali průměr předběžné hrubě orientační koncentrace SDMA z posledních měření plazmatických vzorků. Pro SDMA to byla hodnota 0,41 μmol/l. Tato hodnota nebyla nijak v rozporu s hodnotami publikovanými v literatuře.

Atzler a kolektiv uvádí střední hodnotu cirkulujícího SDMA na 0,43 μmol/l, vztaženou na skupinu 1359 zdravých dobrovolných dárců. [70]

Další nevýhodou metody byla kombinace derivatizačního činidla s použitou chromatografickou kolonou ARION® Polar C18. Ze záznamů je zřejmé, že tvořené OPA deriváty při derivatizačním kroku nějakým způsobem interagují s povrchem kolony a nejspíš

mají tendenci vytvářet dvojpíky na jejím povrchu a poté náhodně eluovat. Bohužel, zatím nejsou dostupné jiné publikace, které by využívaly chromatografickou kolonu ARION® Polar C18 v kombinaci s elektrochemickým detektorem, a tudíž toto tvrzení nelze potvrdit, ani zcela vyvrátit.

Během kompletování dat a výsledků této metody probíhalo další měření na chromatografické koloně ARION® Polar C18, avšak metodou LC-MS. Kolega při postupu přípravy vzorku nepoužíval derivatizační činidlo. Analýzu se mu úspěšně podařilo provést a oddělit píky i bez derivatizačního kroku. V tomto případě se dvojpíky SDMA nevyskytovaly.

Metoda LC-MS s různou variantou detektorů se zdá být tou správnou volbou při simultánním stanovení dimethylargininů. Velkou výhodou je jednoduchost přípravy vzorku, kdy stačí pouhá precipitace. Derivatizace u této metody není nutná a oproti přípravě vzorku u metody HPLC-ECD se tak její doba značně zkrátí. Celková doba analýza pak bývá kolem 10 minut. Nevýhodu zde však hrají tzv. matricové efekty, které lze eliminovat izotopem značeným vnitřním standardem. Výběr správného IS je klíčový. Značnou nevýhodou metody by však mohla být její finanční náročnost. [54]

ZÁVĚR

Cílem práce bylo pokusit se optimalizovat metodu pro stanovení symetrického dimethylargininu v lidské plazmě pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí.

Dle našeho názoru je vypracovaná metoda použitelná za předpokladu, že se monomethylarginin nahradí jiným vnitřním standardem, který bude eluovat až za dimethylargininy. Je však nutné počítat s dalším prodloužením analýzy, která je už sama sobě dlouhá.

Promytí kolony po analýze je nutné kvůli interferujícím píkům a optimální citlivosti. Interakce OPA derivátů s chromatografickou kolonou, která se pravděpodobně projevuje tvorbou dvojpíků v chromatografickém záznamu, značně komplikuje vyhodnocení.

I přes komplikace s koelujícími dvojpíky se nakonec povedla alespoň orientačně stanovit koncentrace SDMA v plazmě od zdravého dárce.

POUŽITÁ LITERATURA

[1] KIELSTEIN, Jan; FLISER, Danilo a VELDINK, Hendrik. Asymmetric Dimethylarginine and Symmetric Dimethylarginine: Axis of Evil or Useful Alliance?. online. *Seminars in Dialysis*. 2009, roč. 22, č. 4, s. 346-350. ISSN 08940959. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/j.1525-139X.2009.00578.x. [cit. 2023-04-13].

[2] MORRIS, Sidney M. Arginine Metabolism Revisited. online. *The Journal of Nutrition*. 2016, roč. 146, č. 12, s. 2579-2586. ISSN 00223166. Dostupné z: https://doi.org/10.3945/jn.115.226621. [cit. 2023-04-12].

[3] TSIKAS, Dimitrios; BOLLENBACH, Alexander; HANFF, Erik et al. Asymmetric dimethylarginine (ADMA), symmetric dimethylarginine (SDMA) and homoarginine (hArg): the ADMA, SDMA and hArg paradoxes. online. *Cardiovascular Diabetology*. 2018, roč. 17, č. 1, s. 1-4. ISSN 1475-2840. Dostupné z: https://doi.org/10.1186/s12933-017-0656-x. [cit. 2023-04-12].

[4] TAIN, You-Lin a HSU, Chien-Ning. Toxic Dimethylarginines: Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Symmetric Dimethylarginine (SDMA). online. *Toxins*. 2017, roč. 9, č. 3, s. 1-20. ISSN 2072-6651. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/toxins9030092. [cit. 2023-04-13].

[5] OLIVA-DAMASO, Elena; OLIVA-DAMASO, Nestor; RODRIGUEZ-ESPARRAGON, Francisco et al. Asymmetric (ADMA) and Symmetric (SDMA) Dimethylarginines in Chronic Kidney Disease: A Clinical Approach. online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, roč. 20, č. 15, s. 1-15. ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms20153668. [cit. 2023-04-13].

[6] HATZOGLOU, Maria; FERNANDEZ, James; YAMAN, Ibrahim et al. REGULATION OF CATIONIC AMINO ACID TRANSPORT: The Story of the CAT-1 Transporter. online. *Annual Review of Nutrition*. 2004, roč. 24, č. 1, s. 377-399. ISSN 0199-9885. Dostupné z: https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.23.011702.073120. [cit. 2023-07-11].

[7] BANJARNAHOR, Sofna; RODIONOV, Roman; KÖNIG, Jörg et al. Transport of L-Arginine Related Cardiovascular Risk Markers. online. *Journal of Clinical Medicine*. 2020, roč. 9, č. 12, s. 1-41. ISSN 2077-0383. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/jcm9123975. [cit. 2023-04-13].

[8] KOCH, Alexander; WEISKIRCHEN, Ralf; BRUENSING, Jan et al. Regulation and Prognostic Relevance of Symmetric Dimethylarginine Serum Concentrations in Critical Illness and Sepsis. online. *Mediators of Inflammation*. 2013, roč. 2013, č. 413826, s. 1-8. ISSN 0962-9351. Dostupné z: https://doi.org/10.1155/2013/413826. [cit. 2023-04-13].

[9] BÖGER, Rainer H. Asymmetric Dimethylarginine, an Endogenous Inhibitor of Nitric Oxide Synthase, Explains the "L-Arginine Paradox" and Acts as a Novel Cardiovascular Risk Factor. online. *The Journal of Nutrition*. 2004, roč. 134, č. 10, s. 2842-2847. ISSN 00223166. Dostupné z: https://doi.org/10.1093/jn/134.10.2842S. [cit. 2024-04-15].

[10] BODEBOGER, S; SCALERA, F a IGNARRO, L. The l-arginine paradox: Importance of the l-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. online. *Pharmacology & Therapeutics*. 2007, roč. 114, č. 3, s. 295-306. ISSN 01637258. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.03.002. [cit. 2024-04-15].

[11] TSIKAS, Dimitrios; BÖGER, Rainer H; SANDMANN, Jörg et al. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L -arginine paradox. online. *FEBS Letters*. 2000, roč. 478, č. 1-2, s. 1-3. ISSN 0014-5793. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01686-0. [cit. 2024-04-15].

[12] DIOGUARDI, Francesco Saverio. To Give or Not to Give? Lessons from the Arginine Paradox. online. *Lifestyle Genomics*. 2011, roč. 4, č. 2, s. 90-98. ISSN 2504-3161. Dostupné z: https://doi.org/10.1159/000327777. [cit. 2024-04-15].

[13] PATEL, Liyona; KILBRIDE, Hannah; STEVENS, Paul et al. Symmetric dimethylarginine is a stronger predictor of mortality risk than asymmetric dimethylarginine among older people with kidney disease. online. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine*. 2019, roč. 56, č. 3, s.

367-374. ISSN 0004-5632. Dostupné z: https://doi.org/10.1177/0004563218822655. [cit. 2023-04-12].

[14] PRIYADARSHINI, G. a RAJAPPA, Medha. Predictive markers in chronic kidney disease. online. *Clinica Chimica Acta*. 2022, roč. 535, s. 180-186. ISSN 00098981. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.08.018. [cit. 2023-04-12].

[15] MOUREK, Jindřich. *Fyziologie: učebnice pro studenty zdravotnických oborů*. online. 2., dopl. vyd. Sestra (Grada). Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-3918-2. Dostupné z: https://www.grada.cz/fyziologie-6805/?gad_source=1&gclid=Cj0KCQiAwbitBhDIARIsABfFYILBVekXKQY83YruPjYoSjWMAY9w0Nx72FqaydvcgAOlacD51Jc-sUgaAu-AEALw_wcB. [cit. 2023-01-22].

[16] COYNE, Michael; SCHULTZE, A.; MCCRANN, Donald et al. Evaluation of renal injury and function biomarkers, including symmetric dimethylarginine (SDMA), in the rat passive Heymann nephritis (PHN) model. online. *PLOS ONE*. 2022, roč. 17, č. 5, s. 1-15. ISSN 1932-6203. Dostupné z: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269085. [cit. 2023-04-13].

[17] SOUTH SHORE NEPHROLOGY. *Nephron structure*. online. In: South Shore Nephrology. 2014. Dostupné z: https://southshorenephrology.com/education/nephron-structure. [cit. 2024-02-17].

[18] EL-KHOURY, Joe; BUNCH, Dustin; HU, Bo et al. Comparison of symmetric dimethylarginine with creatinine, cystatin C and their eGFR equations as markers of kidney function. online. *Clinical Biochemistry*. 2016, roč. 49, č. 15, s. 1140-1143. ISSN 00099120. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2016.07.009. [cit. 2023-04-12].

[19] FELIERS, Denis; LEE, Duck-Yoon; GORIN, Yves et al. Symmetric dimethylarginine alters endothelial nitric oxide activity in glomerular endothelial cells. online. *Cellular Signalling*. 2015, roč. 27, č. 1, s. 1-5. ISSN 08986568. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.09.024. [cit. 2023-04-12].

[20] FOŘTOVÁ, Magdalena. *Biomarkery časného poškození ledvin*. online, Dizertační práce. Praha: Univerzita Karlova, 2018. Dostupné z: https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/104333/140071205.pdf?sequence=1&isAllowed=y. [cit. 2023-01-22].

[21] LIXIA ZENG, Anna a SUBRAMANIAM PENNATHUR, Jaeman. Metabolomic Profiling of Arginine Metabolome Links Altered Methylation to Chronic Kidney Disease Accelerated Atherosclerosis. online. *HHS Public Access*. 2015, roč. 14, č. 14, s. 1-20. ISSN 0974276X. Dostupné z: https://doi.org/10.4172/jpb.S14-001. [cit. 2023-04-13].

[22] KIELSTEIN, Jan; FLISER, Danilo a VELDINK, Hendrik. Asymmetric Dimethylarginine and Symmetric Dimethylarginine: Axis of Evil or Useful Alliance?. online. *Seminars in Dialysis*. 2009, roč. 22, č. 4, s. 346-350. ISSN 08940959. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/j.1525-139X.2009.00578.x. [cit. 2023-08-10].

[23] BOELAERT, Jente; SCHEPERS, Eva; GLORIEUX, Griet et al. Determination of Asymmetric and Symmetric Dimethylarginine in Serum from Patients with Chronic Kidney Disease: UPLC-MS/MS versus ELISA. online. *Toxins*. 2016, roč. 8, č. 5, s. 1-14. ISSN 2072-6651. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/toxins8050149. [cit. 2023-09-11].

[24] NABITY, Mary B. Traditional Renal Biomarkers and New Approaches to Diagnostics. online. *Toxicologic Pathology*. 2018, roč. 46, č. 8, s. 999-1001. ISSN 0192-6233. Dostupné z: https://doi.org/10.1177/0192623318800709. [cit. 2024-04-12].

[25] ONOPIUK, Anna; TOKARZEWICZ, Anna a GORODKIEWICZ, Ewa. Cystatin C. online. *Advances in Clinical Chemistry*. Advances in Clinical Chemistry. 2015, roč. 2023, č. 68, s. 57-69. ISBN 9780128022665. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/bs.acc.2014.11.007. [cit. 2024-04-13].

[26] RYSZ, Jacek; GLUBA-BRZÓZKA, Anna; FRANCZYK, Beata et al. Novel Biomarkers in the Diagnosis of Chronic Kidney Disease and the Prediction of Its Outcome. online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2017, roč. 18, č. 8, s.

1-17. ISSN 1422-0067. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/ijms18081702. [cit. 2024-04-13].

[27] MARAKALA, Vijaya. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in kidney injury – A systematic review. online. *Clinica Chimica Acta*. 2022, roč. 536, s. 135-141. ISSN 00098981. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.cca.2022.08.029. [cit. 2024-04-13].

[28] LAFAVERS, Kaice a GARIMELLA, Pranav. Uromodulin: more than a marker for chronic kidney disease progression. online. *Wolters Kluwer Health*. 2023, roč. 32, č. 3, s. 271-277. ISSN 1062-4821. Dostupné z: https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000885. [cit. 2024-04-13].

[29] TANG, Tao-Tao; WANG, Bin; LI, Zuo-Lin et al. Kim-1 Targeted Extracellular Vesicles: A New Therapeutic Platform for RNAi to Treat AKI. online. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2021, roč. 32, č. 10, s. 2467-2483. ISSN 1046-6673. Dostupné z: https://doi.org/10.1681/ASN.2020111561. [cit. 2024-05-13].

[30] LIN, Xin; YUAN, Jing; ZHAO, Yingting et al. Urine interleukin-18 in prediction of acute kidney injury: a systemic review and meta-analysis. online. *Journal of Nephrology*. 2015, roč. 28, č. 1, s. 7-16. ISSN 1121-8428. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s40620-014-0113-9. [cit. 2024-05-13].

[31] SETHI, Sidharth; SHARMA, Rajesh; GUPTA, Aditi et al. Long-Term Renal Outcomes in Children With Acute Kidney Injury Post Cardiac Surgery. online. *Kidney International Reports*. 2021, roč. 6, č. 7, s. 1850-1857. ISSN 24680249. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.ekir.2021.04.018. [cit. 2024-04-13].

[32] TEERLINK, Tom; LUO, Zaiming; PALM, Fredrik et al. Cellular ADMA: Regulation and action. online. *Pharmacological Research*. 2009, roč. 60, č. 6, s. 448-460. ISSN 10436618. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.08.002. [cit. 2023-09-11].

[33] LEONE, A.; MONCADA, S.; VALLANCE, P. et al. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. online. *The*

Lancet. 1992, roč. 339, č. 8793, s. 572-575. ISSN 01406736. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/0140-6736(92)90865-Z. [cit. 2023-01-22].

[34] KIELSTEIN, Jan; FLISER, Danilo a VELDINK, Hendrik. Asymmetric Dimethylarginine and Symmetric Dimethylarginine: Axis of Evil or Useful Alliance?. online. *Seminars in Dialysis*. 2009, roč. 22, č. 4, s. 346-350. ISSN 08940959. Dostupné z: https://doi.org/10.1111/j.1525-139X.2009.00578.x. [cit. 2023-09-10].

[35] EL-KHOURY, Joe; BUNCH, Dustin; REINEKS, Edmunds et al. A simple and fast liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for measurement of underivatized l-arginine, symmetric dimethylarginine, and asymmetric dimethylarginine and establishment of the reference ranges. online. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2012, roč. 402, č. 2, s. 771-779. ISSN 1618-2642. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00216-011-5462-9. [cit. 2023-04-13].

[36] HYLA-KLEKOT, Lidia; BRYNIARSKI, Piotr; PULCER, Barbara et al. Dimethylarginines as Risk Markers of Atherosclerosis and Chronic Kidney Disease in Children with Nephrotic Syndrome. online. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*. 2015, roč. 24, č. 2, s. 307-313. ISSN 1899-5276. Dostupné z: https://doi.org/10.17219/acem/40465. [cit. 2023-04-13].

[37] SCHLESINGER, Sabrina; SONNTAG, Svenja; LIEB, Wolfgang et al. Asymmetric and Symmetric Dimethylarginine as Risk Markers for Total Mortality and Cardiovascular Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies. online. *PLOS ONE*. 2016, roč. 11, č. 11, s. 1-26. ISSN 1932-6203. Dostupné z: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165811. [cit. 2023-04-13].

[38] ZAFARI, Parisa; ZARIFIAN, Ahmadreza; ALIZADEH-NAVAEI, Reza et al. Asymmetric and symmetric dimethylarginine concentration as an indicator of cardiovascular diseases in rheumatoid arthritis patients: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. online. *Clinical Rheumatology*. 2020, roč. 39, č. 1, s. 127-134. ISSN 0770-3198. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s10067-019-04713-z. [cit. 2023-04-13].

[39] RUNČÍKOVÁ, Anna. *Stanovení asymetrického dimethylargininu v lidské plazmě*. online, Diplomová práce. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2021. Dostupné z:

https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/78619/RuncikovaA_Stanoveni_dimethylargininu_PZ_2021.pdf?sequence=1&isAllowed=y. [cit. 2023-09-11].

[40] ZOBEL, Emilie; VON SCHOLTEN, Bernt; REINHARD, Henrik et al. Symmetric and asymmetric dimethylarginine as risk markers of cardiovascular disease, all-cause mortality and deterioration in kidney function in persons with type 2 diabetes and microalbuminuria. online. *Cardiovascular Diabetology*. 2017, roč. 16, č. 1, s. 1-9. ISSN 1475-2840. Dostupné z: https://doi.org/10.1186/s12933-017-0569-8. [cit. 2023-04-12].

[41] EYILETEN, Ceren; GASECKA, Aleksandra; NOWAK, Anna et al. High concentration of symmetric dimethylarginine is associated with low platelet reactivity and increased bleeding risk in patients with acute coronary syndrome. online. *Thrombosis Research*. 2022, roč. 213, č. 4, s. 195-202. ISSN 00493848. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.thromres.2022.03.025. [cit. 2024-01-27].

[42] HOROWITZ, John; DE CATERINA, Raffaele; HERESZTYN, Tamila et al. Asymmetric and Symmetric Dimethylarginine Predict Outcomes in Patients With Atrial Fibrillation. online. *Journal of the American College of Cardiology*. 2018, roč. 72, č. 7, s. 721-733. ISSN 07351097. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jacc.2018.05.058. [cit. 2023-04-12].

[43] SZABO, Zsuzsanna; BARTHA, Eva; NAGY, Lajos et al. Increased symmetric dimethylarginine, but not asymmetric dimethylarginine, concentrations are associated with transient myocardial ischemia and predict outcome. online. *Journal of International Medical Research*. 2020, roč. 48, č. 6, s. 1-9. ISSN 0300-0605. Dostupné z: https://doi.org/10.1177/0300060520920439. [cit. 2023-04-12].

[44] CHANDRASEKHARAN, Unnikrishnan; WANG, Zeneng; WU, Yuping et al. Elevated levels of plasma symmetric dimethylarginine and increased arginase activity as potential indicators of cardiovascular comorbidity in rheumatoid arthritis. online. *Arthritis Research & Therapy*. 2018, roč. 20, č. 1, s. 1-12. ISSN 1478-6362. Dostupné z: https://doi.org/10.1186/s13075-018-1616-x. [cit. 2023-04-12].

[45] RELFORD, Roberta; ROBERTSON, Jane a CLEMENTS, Celeste. Symmetric Dimethylarginine. online. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal*

Practice. 2016, roč. 46, č. 6, s. 941-960. ISSN 01955616. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2016.06.010. [cit. 2023-05-10].

[46] ERNST, Rie; OGEER, Jennifer; MCCRANN, Donald et al. Comparative performance of IDEXX SDMA Test and the DLD SDMA ELISA for the measurement of SDMA in canine and feline serum. online. *PLOS ONE*. 2018, roč. 13, č. 10, s. 1-11. ISSN 1932-6203. Dostupné z: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0205030. [cit. 2024-01-09].

[47] IDEXX. *IDEXX SDMA Test*. online. In: Idexx.cz. 2019. Dostupné z: https://www.idexx.cz/cs-cz/veterinary/reference-laboratories/sdma/get-started/. [cit. 2024-03-10].

[48] SCHOU-PEDERSEN, Anne a LYKKESFELDT, Jens. Comparison of Three Sample Preparation Procedures for the Quantification of L-Arginine, Asymmetric Dimethylarginine, and Symmetric Dimethylarginine in Human Plasma Using HPLC-FLD. online. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*. 2018, roč. 2018, č. 4, s. 1-7. ISSN 2090-8865. Dostupné z: https://doi.org/10.1155/2018/6148515. [cit. 2023-09-11].

[49] DE JONG, Sigrid a TEERLINK, Tom. Analysis of asymmetric dimethylarginine in plasma by HPLC using a monolithic column. online. *Analytical Biochemistry*. 2006, roč. 353, č. 2, s. 287-289. ISSN 00032697. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.ab.2006.03.010. [cit. 2023-09-11].

[50] KLEPARNIK, Martin; TOMANDLOVA, Marie; GLATZ, Zdenek et al. Determination of asymmetric and symmetric dimethylarginines in human plasma by HPLC with electrochemical detection. online. *Journal of Separation Science*. 2013, roč. 36, č. 23, s. 3696-3701. ISSN 16159306. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/jssc.201300813. [cit. 2023-04-12].

[51] SUZUKI, Katsuhiro; KATAYAMA, Masatoki; TAKAMATSU, Kiyoshi et al. The stable o -phthalaldehyde-ferrocene/6-ferrocenyl-1-hexanethiol pre-column derivatization high-performance liquid chromatography of dimethylarginine by novel dual fluorescence and electrochemical detector. online. *Biomedical Chromatography*.

2013, roč. 27, č. 4, s. 535-538. ISSN 0269-3879. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/bmc.2823. [cit. 2024-04-13].

[52] 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. 2023-07-11].

[53] ALKAITIS, Matthew; NARDONE, Glenn; CHERTOW, Jessica et al. Resolution and quantification of arginine, monomethylarginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in plasma using HPLC with internal calibration. online. *Biomedical Chromatography*. 2016, roč. 30, č. 3, s. 294-300. ISSN 0269-3879. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/bmc.3548. [cit. 2023-04-13].

[54] BONNITCHA, Paul; SULLIVAN, David; FITZPATRICK, Michael et al. Design and validation of an LC-MS/MS method for simultaneous quantification of asymmetric dimethylguanidino valeric acid, asymmetric dimethylarginine and symmetric dimethylarginine in human plasma. online. *Pathology*. 2022, roč. 54, č. 5, s. 591-598. ISSN 00313025. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.pathol.2022.01.008. [cit. 2023-04-12].

[55] HUANG, Lan-Fang; GUO, Fang-Qiu; LIANG, Yi-Zeng et al. Simultaneous determination of L-arginine and its mono- and dimethylated metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography?mass spectrometry. online. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2004, roč. 380, č. 4, s. 643-649. ISSN 1618-2642. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/s00216-004-2759-y. [cit. 2023-01-23].

[56] NOVÁKOVÁ, Lucie; DOUŠA, Michal a ČESLA, Petr. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.

[57] BOLLENBACH, Alexander; HANFF, Erik; BECKMANN, Bibiana et al.. GC-MS quantification of urinary symmetric dimethylarginine (SDMA), a whole-body symmetric l -arginine methylation index. online. *Analytical Biochemistry*. 2018, roč. 556, s. 40-44. ISSN 00032697. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.ab.2018.06.021. [cit. 2023-04-12].

[58] TSIKAS, D; SCHUBERT, B; GUTZKI, F;et al. Quantitative determination of circulating and urinary asymmetric dimethylarginine (ADMA) in humans by gas chromatography–tandem mass spectrometry as methyl ester tri(N-pentafluoropropionyl) derivative. online. *Journal of Chromatography B*. 2003, roč. 798, č. 1, s. 87-99. ISSN 15700232. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.09.001. [cit. 2023-07-11].

[59] SCHULZE, Friedrich; WESEMANN, Reinhard; SCHWEDHELM, Edzard et al. Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. online. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2004, roč. 42, č. 12, s. 59-64. ISSN 1434-6621. Dostupné z: https://doi.org/10.1515/CCLM.2004.257. [cit. 2023-07-11].

[60] BOELAERT, Jente; SCHEPERS, Eva; GLORIEUX, Griet et al. Determination of Asymmetric and Symmetric Dimethylarginine in Serum from Patients with Chronic Kidney Disease: UPLC-MS/MS versus ELISA. online. *Toxins*. 2016, roč. 8, č. 5, s. 1-14. ISSN 2072-6651. Dostupné z: https://doi.org/10.3390/toxins8050149. [cit. 2023-04-13].

[61] KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Třetí, upravené vydání. Ostrava: Pavel Klouda - nakladatelství Pavko, 2016. ISBN 978-80-86369-22-8.

[62] CAUSSÉ, E; SIRI, N; ARNAL, J.F; et al. Determination of asymmetrical dimethylarginine by capillary electrophoresis–laser-induced fluorescence. online. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*. 2000, roč. 741, č. 1, s. 77-83. ISSN 03784347. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0378-4347(00)00034-7. [cit. 2023-01-22].

[63] TRAPP, Gabriele; SYDOW, Karsten; DULAY, Maria et al. Capillary electrophoretic and micellar electrokinetic separations of asymmetric dimethyl-L-arginine and structurally related amino acids: Quantitation in human plasma. online. *Journal of Separation Science*. 2004, roč. 27, č. 17-18, s. 1483-1490. ISSN 1615-9306. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/jssc.200401918. [cit. 2023-01-22].

[64] DESIDERIO, Claudia; ROSSETTI, Diana; MESSANA, Irene; GIARDINA, Bruno et al. Analysis of arginine and methylated metabolites in human plasma by

field amplified sample injection capillary electrophoresis tandem mass spectrometry. online. *ELECTROPHORESIS*. 2010, roč. 31, č. 11, s. 1894-1902. ISSN 0173-0835. Dostupné z: https://doi.org/10.1002/elps.200900690. [cit. 2024-04-15].

[65] BAUR, John E. a WIGHTMAN, R.Mark. Microcylinder electrodes as sensitive detectors for high-efficiency, high-speed liquid chromatography. online. *Journal of Chromatography A*. 1989, roč. 482, č. 1, s. 65-73. ISSN 00219673. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)93207-8. [cit. 2024-02-17].

[66] BARTOŠOVÁ, Zdenka. *MOŽNOSTI VYUŽITÍ ELEKTROCHEMICKÝCH DETEKČNÍCH SYSTÉMŮ V SEPARAČNÍCH TECHNIKÁCH*. Disertační práce. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2015.

[67] BARTOŠOVÁ, Zdenka; JIROVSKÝ, David a HORNA, Aleš. High-performance liquid chromatographic method with amperometric detection employing boron-doped diamond electrode for the determination of sildenafil, vardenafil and their main metabolites in plasma. online. *Journal of Chromatography A*. 2011, roč. 1218, č. 44, s. 7996-8001. ISSN 00219673. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/j.chroma.2011.09.001. [cit. 2024-02-17].

[68] BARTOSOVA, Zdenka; RIMAN, Daniel a JAKUBEC, Petr. Electrochemically Pretreated Carbon Microfiber Electrodes as Sensitive HPLC-EC Detectors. online. *The Scientific World Journal*. 2012, roč. 2012, č. 7, s. 1-6. ISSN 1537-744X. Dostupné z: https://doi.org/10.1100/2012/295802. [cit. 2024-02-17].

[69] ARAI, Hirofumi; TERAO, Junji a ABDALLA, Dulcineia S.P. Coulometric detection in high-performance liquid chromatographic analysis of cholesteryl ester hydroperoxides. online. *Free Radical Biology and Medicine*. 1996, roč. 20, č. 3, s. 365-371. ISSN 08915849. Dostupné z: https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)02062-X. [cit. 2024-02-17].

[70] ATZLER, Dorothee; SCHWEDHELM, Edzard; NAUCK, Matthias et al. Serum reference intervals of homoarginine, ADMA, and SDMA in the Study of Health in Pomerania. online. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*. 2014, roč. 52, č. 12, s. 12. ISSN 1437-4331. Dostupné z: https://doi.org/10.1515/cclm-2014-0314. [cit. 2024-04-15].

PŘÍLOHY

Příloha A *Stanovisko etické komise 1. část* 70

Příloha A *Stanovisko etické komise 2. část* 71

Příloha B *Informovaný souhlas* 72

Příloha A *Stanovisko etické komise 1. část*

Stanovisko Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, a. s.
ze dne 13. 12. 2013 (15.00 h)

Přítomni: MUDr. Josef Hájek, CSc., MUDr. David Stuchlík, MUDr. Jan Mejzlík, Ph.D., Mgr. Jaroslav Procházka, JUDr. Josef Rokos, Mgr. Jana Škvrňáková, Ph.D., MUDr. Marek Sychra, MUDr. Petr Formánek, doc. MUDr. Edvard Ehler, CSc.
Omluveni: MUDr. Zuzana Kala Grofová, Anna Němcová,

Schůzi zahájil a řídil MUDr. Josef Hájek, CSc.
Sekretářka EK seznámila členy s korespondencí se SÚKL a multicentrickými etickými komisemi za období 25.11.2013 – 13.12.2013.

434/13.12.2013

- MUDr. Vojtěch Novotný, lékař kardiologického odd. PKN, a.s., požádal členy EK o souhlas s prováděním studie s názvem **„Zánětlivá odpověď po implantaci absorbovatelných koronárních stentů“.** Studie je zaměřená na sledování zánětlivé reakce, nových markerů oxidačního stresu a dalších biochemických parametrů u pacientů s ischemickou chorobou srdeční a uskuteční se v rámci spolupráce Pardubické krajské nemocnice, a.s., Kardiologického centra Agel, a.s. a Univerzity Pardubice na Kardiologickém oddělení s vědomím a pod dohledem prim. MUDr. Petra Vojtíška, CSc. a MUDr. Iva Varvařovského, Ph.D. Studie nemá komerční charakter a rozšiřuje již probíhající studii, schválenou Etickou komisí při PKN, a.s. dne 11.5.2012. Získaná data využije MUDr. Vojtěch Novotný k sepsání disertační práce v rámci doktorského studijního programu (Ph.D.) na Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové, školitelem je doc. MUDr. Josef Šťásek, Ph.D.
  Na studii se budou podílet:
  Kardiologické oddělení: prim. MUDr. P. Vojtíšek, CSc., MUDr. V. Novotný
  Kardiologické centrum Agel, a.s.: MUDr. I. Varvařovský, Ph.D., MUDr. J. Matějka, Ph.D., MUDr. V. Rozsíval, CSc., MUDr. V. Novotný.
  Oddělení klinické biochemie a diagnostiky: prim. PharmDr. J. Skalický, Ph.D., Mgr. J. Kovařík
  Univerzita Pardubice:MUDr. V. Mužáková, Ph.D., Mgr. P. Žáková, Ph.D., Doc. Mgr. R. Kanďár, Ph.D.
  Byly předloženy dokumenty: protokol studie, informovaný souhlas, pacientský dotazník, informovaný souhlas s provedením koronarografie /PCI, informace výrobců o stentech.
  Členové EK studii po prostudování předložených dokumentů – v souladu s ICH GCP – schválili.

V Pardubicích 13. 12. 2013
Zapsala: Ivana Faiklová

Etická komise

Předběžný termín příští schůze etické komise: **24. 1. 2014**

MUDr. Josef Hájek, CSc.
předseda Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, a. s

Příloha A *Stanovisko etické komise 2. část*

Etická komise při Pardubické krajské nemocnici, a. s.
- její složení na schůzi konané

dne 13. 12. 2013

podpis

MUDr. Josef Hájek, CSc. – předseda EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
doc. MUDr. Edvard Ehler, CSc. – člen EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
MUDr. Petr Formánek – člen EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
MUDr. Zuzana Kala Grofová – členka EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
MUDr. Jan Mejzlík, Ph.D. – člen EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
Anna Němcová zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
Mgr. Jaroslav Procházka – člen EK není zaměstnán v Pardubické krajské nemocnici, a.s.	
JUDr. Josef Rokos – člen EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
MUDr. David Stuchlík – člen EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
MUDr. Marek Sychra – člen EK zaměstnanec Pardubické krajské nemocnice, a.s.	
Mgr. Jana Škvrňáková, Ph.D. není zaměstnána v Pardubické krajské nemocnici, a.s.	

Etická komise
při Pardubické krajské nemocnici, a.s.
Kyjevská 44
532 03 Pardubice

Příloha B *Informovaný souhlas*

INFORMACE PRO ÚČASTNÍKY STUDIE

Vážená paní, vážený pane,

v současné době probíhá na našem pracovišti ve spolupráci s Univerzitou Pardubice výzkumná práce (studie) s názvem „Zánětlivá reakce po implantaci koronárních stentů".

Tato výzkumná práce je zaměřena na sledování ukazatelů zánětu a oxidačního stresu v krvi pacientů po perkutánní koronární intervenci (PCI) a vyhodnocení jejich významu v závislosti na typu použitého stentu.

V současné době je standardní léčbou ischemické choroby srdeční tzv. perkutánní koronární intervence (PCI), která spočívá v roztažení zúženého místa věnčité tepny speciálním balónkem a jeho následné vyztužení stentem. Stentů je několik typů, nejčastěji jsou používány stenty kovové, jejichž struktura je potažená léčivou látkou, která se postupně uvolňuje a brání následnému opětovnému zužování věnčité tepny v reakci na cizí materiál stentu. Tyto stenty označujeme jako tzv. „lékové stenty". Nověji jsou dostupné stenty, které jako kostru místo kovu využívají organickou látku (kyselinu polymléčnou), která se v organismu postupně rozkládá, až přibližně po dvou letech z organismu zcela zmizí. Výhodou tohoto typu stentu je možnost navrácení věnčité tepny do stavu blízkého stavu původnímu, tedy se zachovanou schopností reagovat na přirozené podněty k rozšíření či zúžení tepny. Nevýhodou je pak nemožnost zavést tyto stenty do všech typů zúžení, tj. nelze je využít ve všech situacích. Tyto stenty nazýváme „absorbovatelné stenty" a jsou rovněž potažené výše uvedeným léčivem zabraňujícímu opětovnému zúžení tepny.

V předkládané práci budeme srovnávat laboratorní parametry zánětlivé odpovědi na zavedení těchto dvou typů stentů. Předchozí práce prokázaly, že čím vyšší je zánětlivá reakce po výkonu na věnčité tepně, tím vyšší je riziko pozdějších komplikací ve smyslu opětovného zužování věnčité tepny či srdečního infarktu.

K účasti v této výzkumné práci jste byl/a osloven/a vzhledem k tomu, že Váš zdravotní stav vyžaduje ošetření zúžení věnčité tepny stentem a zároveň jde o zúžení tepny, které je vhodné k zavedení obou typů stentů.

V případě, že se rozhodnete pro účast v této výzkumné práci, bude na základě náhodného výběru (tzv. randomizace) zvolen k ošetření zúžení věnčité tepny jeden z výše uvedených typů stentů. Rizika spojená s účastí ve studii se neliší od běžných rizik v souvislosti s PCI a zavedením stentu. Tato rizika jsou podrobně popsána v Informovaném souhlase s provedením koronarografie/PCI, který jste před výkonem podepsal/a.

Zátěž vyplývající ze zařazení do studie spočívá ve třech odběrech 19 ml krve během stávající hospitalizace a ve vyplnění dotazníku, dále v klinické kontrole a odběru krve po jednom roce. Další podrobnosti a informace Vám budou na požádání sděleny.

Vaše účast na této studii je zcela dobrovolná.