

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení symetrického a asymetrického dimethylargininu v lidské plazmě
metodou HPLC/MS
Diplomová práce

University of Pardubice
Faculty of Chemical Technology

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

Diploma thesis

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2024/2025

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Klára Sopóciová**
Osobní číslo: **C23236**
Studijní program: **N0512A130006 Analýza biologických materiálů**
Téma práce: **Stanovení symetrického a asymetrického dimethylargininu v lidské plazmě metodou HPLC/MS**
Téma práce anglicky: **The Determination of Symmetric and Asymmetric Dimethylarginine in Human Plasma by HPLC/MS**
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 i asymetrického dimethylargininu v lidské plazmě. U HPLC/MS stanovení se podrobněji zaměřte na přípravu vzorku.

Experimentální část:

Pokuste se vypracovat HPLC/MS metodu stanovení symetrického i asymetrického dimethylargininu v lidské plazmě s využitím modifikované C18 kolony (Arion Polar C18) a vybrané HILIC kolony. Porovnejte výsledky získané na těchto rozdílných kolonách a porovnejte je s aktuálními dostupnými literárními údaji.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Pavla Žáková, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **20. prosince 2024**
Termín odevzdání diplomové práce: **9. května 2025**

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

L.S.

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

V Pardubicích dne 28. února 2025

Prohlašuji:

Práci s názvem *Stanovení symetrického a asymetrického dimethylargininu v lidské plazmě metodou HPLC/MS* 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 9.5. 2025

Bc. Klára Sopóciová v.r

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych především poděkovala Mgr. Pavle Žákové, Ph.D. za pomoc, cenné rady a vedení mé diplomové práce. Také bych chtěla poděkovat panu prof. Mgr. Romanu Kandárovi, Ph.D. za pomoc a věcné připomínky k praktické části této práce. Dále bych chtěla poděkovat také své rodině a přátelům za podporu během psaní této diplomové práce a celého mého studia.

ANOTACE

Tato diplomová práce s názvem *Stanovení symetrického a asymetrického dimethylargininu v lidské plazmě metodou HPLC/MS* se zaměřuje na vývoj a optimalizaci analytické metody pro stanovení těchto látek, které představují potencionální biomarkery řady onemocnění. Pro účely separace byly testovány dvě různé chromatografické kolony – modifikovaná C₁₈ kolona a kolona typu HILIC. Práce je dále zaměřena na optimalizaci přípravy vzorků a srovnání účinnosti separace na obou kolonách.

KLÍČOVÁ SLOVA

L-arginin, symetrický dimethylarginin, asymetrický dimethylarginin, HPLC, MS/MS, HILIC, příprava vzorků

TITLE

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

ANNOTATION

This thesis, titled *The Determination of Symmetric and Asymmetric Dimethylarginine in Human Plasma by HPLC/MS*, focuses on the development and optimization of an analytical method for the determination of these compounds, which represent potential biomarkers for a number of diseases. Two different chromatographic columns were tested for separation – a modified C₁₈ column and a HILIC column. The work further focuses on sample preparation optimization and comparison of separation efficiency between the two columns.

KEYWORDS

L-arginine, symmetrical dimethylarginine, asymmetrical dimethylarginine, HPLC, MS/MS, HILIC, sample preparation

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ.....	10
SEZNAM ZKRATEK.....	13
ÚVOD.....	14
1 TEORETICKÁ ČÁST.....	15
1.1 Arginin.....	15
1.1.1 Asymetrický dimethylarginin (ADMA).....	16
1.1.2 Symetrický dimethylarginin (SDMA).....	17
1.2 Metabolismus.....	17
1.2.1 Syntéza ADMA a SDMA.....	19
1.2.2 Metabolismus a eliminace oxidu dusnatého.....	20
1.3 Degradace a eliminace.....	21
1.3.1 Degradace a eliminace ADMA.....	22
1.3.2 Degradace a eliminace SDMA.....	22
1.4 Klinický význam argininu a dimethylargininů.....	23
1.4.1 Arginin.....	24
1.4.2 ADMA.....	24
1.4.3 SDMA.....	25
1.5 Genová exprese L-argininu a využití v protinádorové léčbě.....	26
1.6 L-arginin jako doplněk stravy.....	28
1.7 Příprava biologických vzorků pro stanovení dimethylovaných argininů.....	29
1.8 Stanovení ADMA a SDMA pomocí kapalinové chromatografie.....	35
1.8.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie (HPLC).....	35
1.8.2 Hmotnostní spektrometrie.....	37
2 CÍL PRÁCE.....	40
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	41
3.1 Chemikálie, přístroje a pomůcky.....	41

3.1.1	Chemikálie a plyny.....	41
3.1.2	Přístroje a software.....	41
3.1.3	Pomůcky.....	42
3.2	Biologické vzorky.....	42
3.3	Roztoky.....	42
3.3.1	Příprava standardů.....	42
3.3.2	Mobilní fáze.....	43
3.4	Stanovení dimethylargininů pomocí LC-MS/MS.....	44
3.4.1	Chromatografická separace.....	44
3.4.2	Hmotnostní detekce.....	45
4	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	46
	ZÁVĚR.....	69
	POUŽITÁ LITERATURA.....	70

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obrázek 1: Arginin a methylované argininy (upraveno) [5].....	16
Obrázek 2: Metabolická dráha argininu (upraveno) [1].....	18
Obrázek 3: Posttranslační úpravy argininu (upraveno) [17].....	19
Obrázek 4: Syntéza oxidu dusnatého (upraveno) [24].....	20
Obrázek 5: Degradace L-argininu (upraveno) [27].....	21
Obrázek 6: Metabolická dráha ADMA a SDMA (upraveno) [31].....	23
Obrázek 7: Degradaci argininu v nádorových buňkách s deficitem ASS1 nebo s vysokou spotřebou exogenního argininu (upraveno) [1].....	28
Obrázek 8: Vrstva vody na povrchu HILIC stacionární fáze [52].....	36
Obrázek 9: MS/MS fragmentace dimethylargininů (upraveno) [4].....	38
Obrázek 10: Retenční časy ADMA a SDMA při 85 % ACN a 15 % MF A (0,05% kys. mravenčí; 3,8 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C.....	47
Obrázek 11: Retenční časy ADMA a SDMA při 82 % ACN a 18 % MF B (0,05% kys. mravenčí; 6 mM mravenčan amonný); průtok 0,05 ml/min; teplota kolony 30 °C.....	48
Obrázek 12: Retenční časy ADMA a SDMA při 82 % ACN a 18 % MF B (0,1% kys. mravenčí; 6 mM mravenčan amonný); průtok 0,05 ml/min; teplota kolony 30 °C.....	48
Obrázek 13: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF A (0,05 % kys. mravenčí; 3,8 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C.....	49
Obrázek 14: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF A (0,05% kys. mravenčí; 3,8 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 25 °C.....	50
Obrázek 15: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF A (0,05% kys. mravenčí; 3,8 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 37 °C.....	50
Obrázek 16: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF B (0,05% kys. mravenčí; 6,0 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C.....	51
Obrázek 17: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF B (0,05% kys. mravenčí; 6,0 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; ředěný standard 50x.....	51
Obrázek 18: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF B (0,05% kys. mravenčí; 6,0 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard s vodou.....	52ž

Obrázek 19: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF B (0,05% kys. mravenčí; 6,0 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard s acetonitril/voda (80:20).....	52
Obrázek 20: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF C (0,1% kys. mravenčí; 6,0 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard naředěn 50x.....	53
Obrázek 21: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF D (3,8 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard naředěn 50x..	53
Obrázek 22: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF D (0,05% kys. mravenčí; 10 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard naředěn 50x	54
Obrázek 23: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF F (0,1% kys. mravenčí; 10 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard naředěn 50x	54
Obrázek 24: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF G (0,01% kys. mravenčí; 1,2 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard naředěn 50x.....	55
Obrázek 25: Retenční časy ADMA a SDMA při 78 % ACN a 22 % MF B (0,05% kys. mravenčí; 6 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C.....	55
Obrázek 26: Retenční časy ADMA a SDMA při 78 % ACN a 22 % MF B (0,1% kys. mravenčí; 6 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard naředěn 50x	56
Obrázek 27: Retenční časy ADMA a SDMA při 75 % ACN a 25 % MF B (0,1% kys. mravenčí; 6 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard naředěn 50x	56
Obrázek 28: Retenční časy ADMA a SDMA při 75 % ACN a 25 % MF B (0,05% kys. mravenčí; 6,0 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard s vodou.....	57
Obrázek 29: Retenční časy ADMA a SDMA při 75 % ACN a 25 % MF B (0,05% kys. mravenčí; 6,0 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard s acetonitril/voda (80:20).....	57
Obrázek 30: Retenční časy ADMA a SDMA při 75 % ACN a 25 % MF B (0,05% kys. mravenčí; 6,0 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard s acetonitril/voda (50:50).....	58

Obrázek 31: Retenční časy ADMA a SDMA při 75 % ACN a 25 % MF B (0,1% kys. mravenčí; 10 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard naředěn 50x	58
Obrázek 32: Gradientová eluce 1 (1,2 mM mravenčan amonný, 0,01% kys. mravenčí ve vodě a v acetonitrilu).....	59
Obrázek 33: Gradientová eluce 2 (1,2 mM mravenčan amonný, 0,01% kyselina mravenčí ve vodě; acetonitril).....	60
Obrázek 34: Gradientová eluce 3 (1,2 mM mravenčan amonný, 0,01% kyselina mravenčí ve vodě; acetonitril).....	60
Obrázek 35: Gradientová eluce 4 (1,2 mM mravenčan amonný, 0,01% kyselina mravenčí ve vodě; acetonitril).....	61
Obrázek 36: Retenční časy ADMA a SDMA ve standardu (dávkování 0,2 µl).....	62
Obrázek 37: Retenční časy ADMA a SDMA ve standardu (dávkování 1 µl).....	63
Obrázek 38: Retenční časy ADMA a SDMA ve standardu (dávkování 2 µl).....	63
Obrázek 39: Retenční časy ADMA a SDMA ve vzorku (dávkování 0,2 µl).....	64
Obrázek 40: Retenční časy ADMA a SDMA ve vzorku (dávkování 1 µl).....	64
Obrázek 41: Retenční časy ADMA a SDMA ve vzorku (dávkování 2 µl).....	65
Obrázek 42: Retenční časy ADMA a SDMA ve vzorku (dávkování 5 µl).....	65
Obrázek 43: Obrázek 42: Retenční časy ADMA a SDMA ve vzorku s přidavkem (dávkování 2µl).....	66
Obrázek 44: Retenční časy ADMA a SDMA v mobilní fázi s přidavkem.....	66
Obrázek 45: Retenční časy ADMA a SDMA ve vzorku s vodou.....	67
Obrázek 46: Retenční časy ADMA a SDMA ve vzorku se standardem.....	67

SEZNAM ZKRATEK

ACN	Acetonitril
ADC	Arginindekarboxyláza
ADI	Arginin deimináza
ADMA	Asymetrický dimethylarginin
AGXT2	Alaninglyoxylát-aminotransferáza 2
ASL	Argininosukcinát lyáza
ASS	Argininosukcinát syntetáza
Ca ²⁺	Vápenatý iont
CAT	Transportéry kationtových aminokyselin
CKD	Chronické onemocnění ledvin
DDAH	Dimethylarginin-dimethylaminohydroláza
ESI	Ionizace elektrosprejem
GC	Plynová chromatografie
HCl	Kyselina chlorovodíková
HDL	Lipoprotein o vysoké hustotě
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	Vysokoúčinné kapalinová chromatografie
HPLC-MS	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí
LDL	Lipoprotein o nízké hustotě
L-NMMA	N ^G -monomethyl-L-arginin
ME	Matricové efekty
MF	Mobilní fáze
MMA	Monomethylarginin
nNos, eNOS, iNOS	Neuronální, endotelová, indukovatelná syntáza oxidu dusnatého
NO•	Oxid dusnatý
NOS	Syntáza oxidu dusnatého
ODC	Ornitindekarboxyláza
PEG	Polyethylenglykol
PRMT	Protein arginin methyltransferáza
SDMA	Symetrický dimethylarginin
SPE	Extrakce na pevné fázi
TFA	Kyselina trifluoroctová

ÚVOD

Symetrický dimethylarginin a asymetrický dimethylarginin představují významné endogenní deriváty aminokyseliny L-argininu, které vznikají enzymatickou posttranslační metylací argininových zbytků v proteinech. Za posledních dvacet let jsou tyto molekuly stále více v centru zájmu biomedicínského výzkumu díky jejich úzkému propojení s patofyziologií celé řady onemocnění, zejména kardiovaskulárních a renálních. Zatímco asymetrický dimethylarginin působí jako přímý inhibitor syntázy oxidu dusnatého a snižuje biologickou dostupnost oxidu dusnatého, symetrický dimethylarginin ovlivňuje dostupnost L-argininu nepřímo a zároveň se považuje za cenný indikátor renálních funkcí.

Oxid dusnatý, jehož produkce je klíčová pro regulaci cévního tonu, krevního tlaku a funkci endotelu, je syntetizován z L-argininu pomocí izoforem enzymu syntázy oxidu dusnatého. Jakýkoli zásah do tohoto procesu, například zvýšené koncentrace asymetrického dimethylargininu v plazmě, může vést k endoteliální dysfunkci, ateroskleróze, hypertenzi a dalším chorobným stavům. Význam symetrický dimethylarginin je pak často spojován především s rychlostí glomerulární filtrace, což jej činí biomarkerem zhoršené funkce ledvin.

Pro studium těchto dvou methylovaných derivátů je nezbytné využívat analytické metody s vysokou citlivostí, selektivitou a dostatečnou schopností odlišit strukturní izomery. Jednou z nejúčinnějších metod současné analytické chemie je kombinace vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií, která umožňuje přesnou identifikaci a kvantifikaci těchto látek i ve velmi nízkých koncentracích.

1 TEORETICKÁ ČÁST

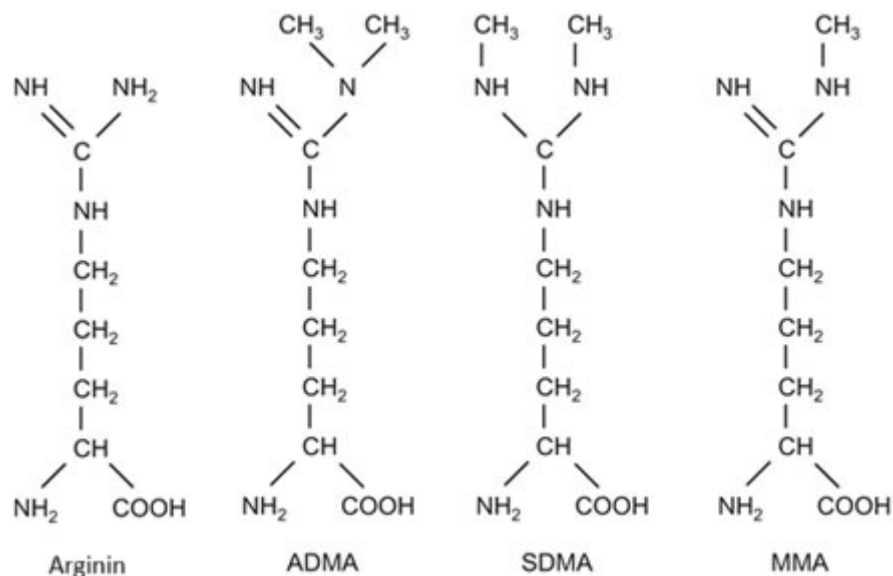
1.1 Arginin

Arginin je semi-esenciální aminokyselina, která hraje klíčovou roli v mnoha fyziologických procesech, včetně syntézy bílkovin, buněčné proliferace, svalové kontrakce, imunitní odpovědi, neurotransmise, vazodilatace (rozšíření cév), sekrece hormonů a syntézy dalších aminokyselin. Nedávné studie naznačují, že arginin může rovněž podporovat hojení ran, buněčné dělení, tvorbu amoniaku a snižovat hladinu cukru v krvi. Tyto vlastnosti argininu mohou být přínosné při léčbě nádorových onemocnění jeho deprivací, neboť nádorové buňky často vykazují změněný metabolismus a jsou závislé na vnějším přísunu argininu pro svůj růst. Nadbytek nebo nedostatek argininu, tak může mít významný dopad na zdravotní stav organismu. [1]

Arginin se rovněž podílí na přeměně amoniaku, toxické látky produkované organismem na netoxickou močovinu. Kromě toho je prekurzorem v biosyntéze oxidu dusnatého, polyaminů, prolinu, kreatinu a agmatinu. Arginin je získáván jak z potravy, tak i endogenní syntézou. Tato syntéza probíhá z citrulinu primárně ve střevech a ledvinách, ale může se syntetizovat i v jiných typech buněk. Epitelové buňky tenkého střeva rozkládají bílkoviny z potravy a uvolňují citrulin do krevního oběhu. Citrulin je následně v ledvinových buňkách přeměněn na arginin a vrácen zpět do oběhu jako zásoba. [1-3]

Jedna z významných metabolických drah L-argininu zahrnuje metylaci jeho guanidinové skupiny, což vede ke vzniku tří hlavních sloučenin: N^G-monomethyl-L-argininu (L-NMMA), asymetrického dimethylargininu (ADMA) a symetrického dimethylargininu (SDMA). Tyto látky vznikají posttranslační metylací argininových zbytků v proteinech, kterou katalyzují enzymy z rodiny protein arginin methyltransferáz. Tyto enzymy hrají zásadní roli nejen v regulaci buněčné signalizace a transportu do jádra, ale také v modulaci interakcí s nukleovými kyselinami. [4]

Na obrázku č. 1 jsou znázorněny chemické struktury L-argininu a jeho tří methylovaných derivátů: ADMA, SDMA a L-NMMA (někdy označovaný jako MMA).



Obrázek 1: Arginin a methylované argininy (upraveno); ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin, MMA – monomethylarginin [5]

ADMA a SDMA jsou toxické, neproteinogenní deriváty aminokyseliny argininu. Obě látky jsou klasifikovány jako uremické toxiny, které se podílí na inhibici produkce oxidu dusnatého a hrají multifunkční roli v mnoha lidských onemocněních. ADMA a SDMA se ukázaly jako silné faktory kardiovaskulárních onemocnění a řady dalších různých onemocnění. [6]

ADMA i SDMA se podílejí na regulaci různých biologických funkcí, včetně endoteliální dysfunkce, což je neschopnost endoteliálních buněk produkovat dostatečné množství bioaktivního oxidu dusnatého a zvyšuje tak riziko kardiovaskulárních příhod, aterosklerózy, oxidačního stresu, apoptózy, urémie, autofágie (autodegradační proces, který má klíčovou roli v energetické rovnováze a odstraňování poškozených organel a proteinů. Deregulace autofágie může vést k nemocem, jako je rakovina a neurogeneze, kardiopatie či diabetes.) a imunitní dysfunkce. [6, 9]

1.1.1 Asymetrický dimethylarginin (ADMA)

ADMA působí jako kompetitivní inhibitor syntázy oxidu dusnatého (NOS). Inhibuje cévní produkci oxidu dusnatého při koncentracích, které se běžně vyskytují za patologických podmínek. V posledních letech je ADMA studován také jako biomarker kardiovaskulárního rizika. Zvýšené hladiny asymetrického dimethylargininu v krevním oběhu jsou u pacientů s chronickým onemocněním ledvin, obdobně jako v případě SDMA. Enzym NOS využívá L-arginin jako substrát k produkci oxidu dusnatého a L-citrulinu. Jak už bylo uvedeno ADMA je syntetizován posttranslační modifikací argininu pomocí protein arginin methyltransferáz,

konkrétně enzymy typu I. Průběh této modifikace bude detailně znázorněn a vysvětlen v kapitole 1.2. [10-12]

Monomethylarginin a L-arginin působí také jako kompetitivní inhibitory enzymu NOS. Vzhledem k tomu, že koncentrace ADMA v krvi je přibližně 5 až 10krát vyšší koncentraci než MMA, je ADMA považován za biologicky významnější z těchto dvou inhibitorů. Naproti tomu SDMA je v oběhu přítomen v podobné koncentraci, ale není považován za přímého inhibitora NOS. [13, 14]

1.1.2 Symetrický dimethylarginin (SDMA)

SDMA soutěží s ADMA a L-argininem o transport do buněk a reabsorpci v ledvinách. Z tohoto důvodu se předpokládá, že SDMA může nepřímo ovlivňovat dostupnost L-argininu pro NOS a tím produkci oxidu dusnatého (NO^{*}). [4]

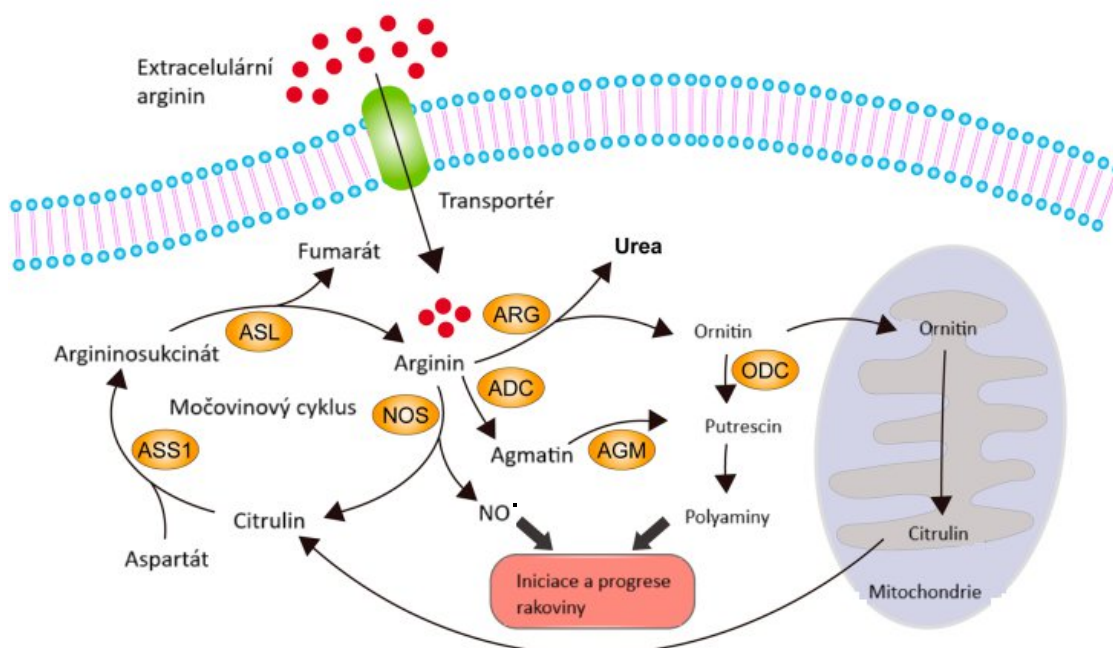
Jak už bylo zmíněno výše, koncentrace SDMA v krvi bývá zvýšená u pacientů s poruchou renálních funkcí, a proto je považován za spolehlivý marker rychlosti glomerulární filtrace. SDMA vzniká ve všech buňkách jako vedlejší produkt buněčného metabolismu a je vylučován převážně ledvinami. Kromě vlivu na dostupnost NO^{*} se SDMA podílí i na modulaci zánětlivých procesů, signalizaci NO^{*} a funkci lipoproteinů s vysokou hustotou (HDL). [12, 13]

1.2 Metabolismus

Arginin představuje klíčový metabolický substrát, který se podílí na syntéze celé řady biologicky významných látek v těle. Mezi tyto látky patří močovina, polyaminy, prolin, glutamát, kreatin, oxid dusnatý, agmatin a ornitin. Agmatin a ornitin slouží jako prekurzory putrescinu, jenž je výchozí molekula pro syntézu polyaminů. Oxid dusnatý a polyaminy hrají důležitou roli v buněčné proliferaci a diferenciaci, a jejich poruchy metabolismu mohou ovlivňovat nádorové procesy. Metabolická dráha argininu v lidské buňce bude znázorněna na obrázku č. 2. [1, 15]

Koncentrace L-argininu v organismu je regulována rovnováhou mezi jeho syntézou, degradací, přeměnou na další metabolity a vylučováním. Vstřebávání L-argininu probíhá především ve střevech, kde se přeměňuje na L-citrulin, který dále vstupuje do krevního oběhu. Arginin může rovněž být syntetizován prostřednictvím močovinového cyklu, jak je znázorněno na obrázku č. 2. Klíčovými enzymy této dráhy jsou arginosukcinát syntetáza 1 (ASS1), která katalyzuje citrulin a aspartát za vzniku arginosukcinátu, a arginosukcinát lyáza (ASL), která následně štěpí arginosukcinát na fumarát a arginin. Obrázek znázorňuje kromě syntézy argininu i jeho následnou degradaci, která bude podrobněji popsána na obrázku č. 5 v kapitole

Degradace a eliminace. Obrázek také naznačuje vznik patologického jevu v podobě rakoviny, touto částí obrázku se budu zabývat v kapitole o genové expresi a využití v protinádorové léčbě. [3, 16]

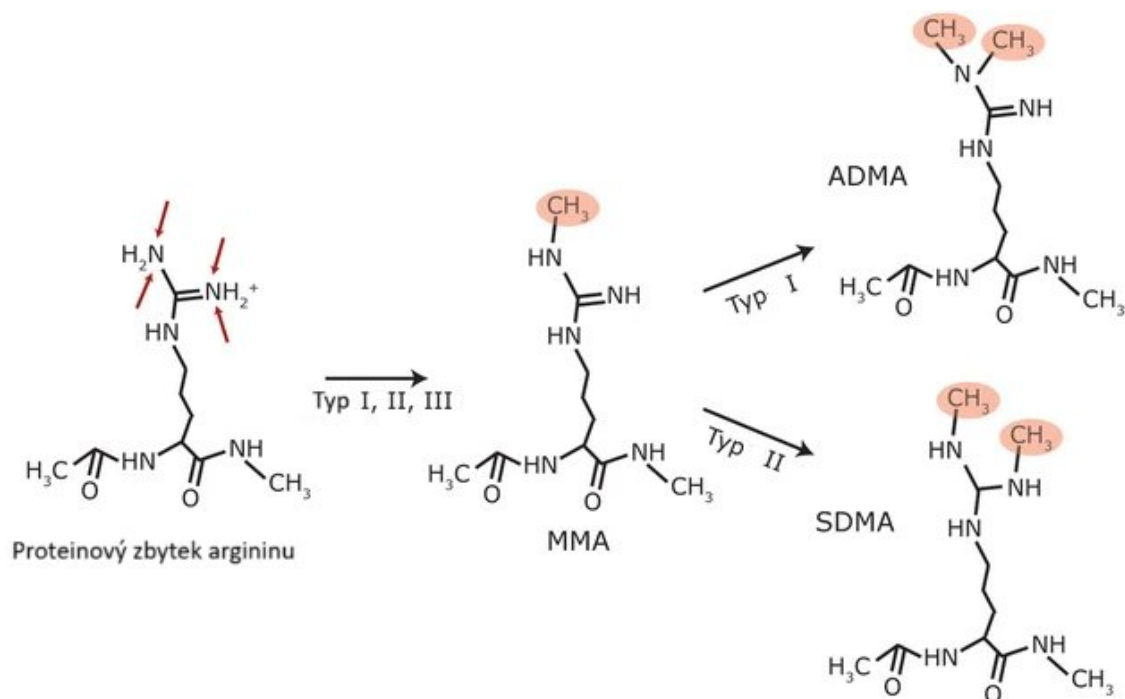


Obrázek 2: Metabolická dráha argininu (upraveno); ASL – argininosukcinát lyáza, NOS – syntáza oxidu dusnatého, ASS1 – argininosukcinát syntetáza 1, ARG – argináza, ADC – arginindekarboxyláza, AGM – agmatináza, ODC – ornitindekarboxyláza, NO[•] – oxid dusnatý [1]

Již v roce 1968 se Paik a Kim pokusili purifikovat enzym zodpovědný za metylaci lyzinových zbytků histonů. Izolovaný enzym, označený jako protein metyláza I, nebyl lyzin methyltransferázou, ale protein arginin methyltransferázou (PRMT). V současnosti bylo identifikováno celkem 11 PRMT enzymů, které jsou rozděleny do čtyř typů na základě typu produktů, které katalyzují. [18, 19]

Typy I až III se vyskytují u savců a všechny jsou schopny katalyzovat přenos jedné methylové skupiny na koncový atom dusíku v guanidinové skupině argininu za vzniku N-monomethylargininu. Enzymy typu I (PRMT 1, 2, 3, 4, 6, 8) jsou nejrozšířenější a následně připojují druhou methylovou skupinu na tentýž atom dusíku, čímž vzniká asymetrického dimethylargininu. Enzymy typu II (PRMT 5, 9) přidávají druhou methylovou skupinu na druhý koncový atom dusíku, čímž vzniká symetrický dimethylarginin. PRMT enzymy typu III (např. PRMT 7) katalyzují pouze tvorbu MMA. PRMT enzymy typu IV (doposud popsány pouze u kvasinek) se rovněž podílí na tvorbě MMA, přičemž methylová skupina se váže na vnitřní dusík. [18, 19]

Na obrázku 3 jsou znázorněny různé typy enzymů PRMT a jejich produkty vznikající metylací argininu – MMA, ADMA a SDMA.



Obrázek 3: Posttranslační úpravy argininu (upraveno); MMA – monomethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin, ADMA – asymetrický dimethylarginin [17]

Volné formy MMA, SDMA ADMA se uvolňují do oběhu nebo jsou přijímány do jiných buněk prostřednictvím transportérů kationtových aminokyselin (CAT), které jsou rovněž zodpovědné za transport L-argininu. L-arginin může být dále transportován přes buněčné membrány prostřednictvím sodíkem spřaženého citrátového transportéru (NaCT/Nact), který je vysoce exprimován v jaterních a mozkových buňkách. [13]

1.2.1 Syntéza ADMA a SDMA

Jak už bylo zmíněno ADMA vzniká metylací z argininu za přítomnosti enzymu PRMT typu I. Uvolňování ADMA z endoteliálních buněk se zvyšuje při působení nativního nebo oxidovaného lipoproteinu s nízkou hustotou (LDL), pravděpodobně prostřednictvím regulace methylace závislé na S-adenosylmethioninu, který slouží jako donor methylové skupiny pro PRMT. Nedávné studie navíc naznačují, že plicní tkáň zřejmě obsahuje značné množství bílkovinně vázaného ADMA, což je připisováno vysoké expresi různých PRMT v plicích. [4, 6, 20]

Cirkulující ADMA je aktivně transportována do hlavních orgánů, jako jsou ledviny, mozek a játra, prostřednictvím CAT. [21]

Aktivita PRMT I bývá obecně vyšší než aktivita PRMT II, což se projeví na poměru produktů. Většina methylovaných argininových zbytků v proteinech je přeměňován na ADMA,

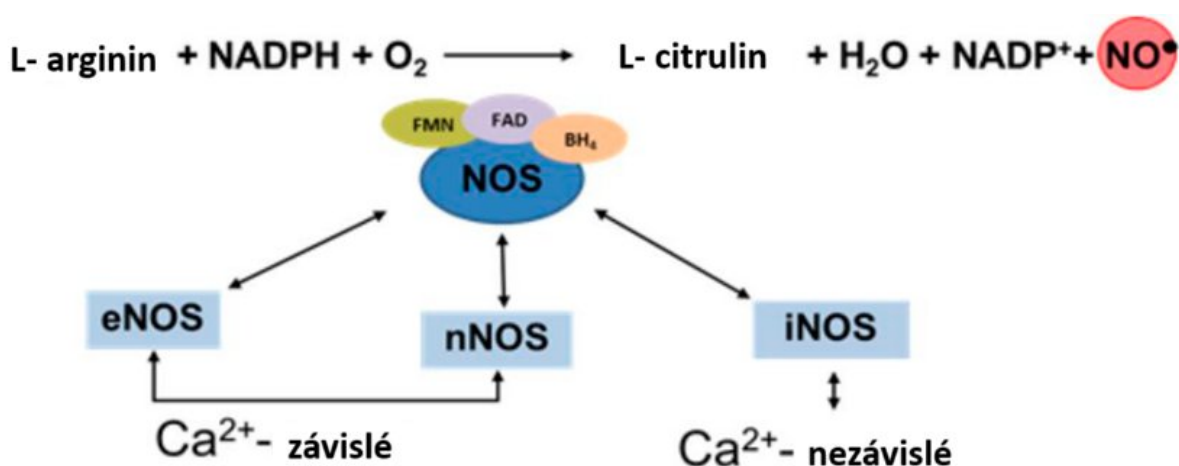
čímž dochází k tomu, že ADMA je 4-5x více než SDMA. Přesný poměr těchto dvou metabolitů se může lišit v závislosti na typu buňky a jejich metabolickém stavu. [4]

1.2.2 Metabolismus a eliminace oxidu dusnatého

Oxid dusnatý je molekula, která hraje klíčovou roli v udržování cévní homeostázy, regulaci imunitní odpovědi a neurotransmisi. Mezi jeho hlavní funkce patří regulace průtoku krve, potlačování zánětlivých procesů a podpora obranyschopnost organismu proti infekcím a nádorovým buňkám. [3, 19, 22]

NO^{\bullet} je syntetizován z L-argininu za přítomnosti molekulárního kyslíku a NADPH (nikotinamidadenindinukleotidfosfát) prostřednictvím tří izoform enzymu syntázy oxidu dusnatého: neuronální NOS (nNOS), endotelové NOS (eNOS) a indukovatelné NOS (iNOS). Aktivita těchto enzymů, konkrétně eNOS a nNOS, je úzce závislá na intracelulární koncentraci vápenatých iontů (Ca^{2+}). Tyto izoformy jsou kalmodulin-dependentní, což znamená, že po navázání Ca^{2+} na kalmodulin dochází k aktivaci eNOS/nNOS a následné produkci NO^{\bullet} . Naopak iNOS je aktivován převážně transkripčně jako odpověď na zánětlivé podněty a její činnost je na koncentraci Ca^{2+} nezávislá. Míra produkce NO^{\bullet} je úzce závislá na dostupnosti argininu, který je jedním z limitujících faktorů syntézy. Citrulin, který vzniká jako vedlejší produkt reakce NOS, může být recyklován zpět na arginin postupným působením enzymů argininosukcinát syntetázy a argininosukcinát lyázy. [14, 19, 23, 24]

Na obrázku č. 4 je možné vidět zjednodušené schéma syntézy oxidu dusnatého.



Obrázek 4: Syntéza oxidu dusnatého (upraveno); FMN – flavinmononukleotid, NADPH – redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu, FAD – flavinadenindinukleotid, BH_4 – tetrahydrobiopterin, NADP^{++} – nikotinamidadenindinukleotidfosfát, eNOS – endotelová syntáza oxidu dusnatého, nNOS – neuronální syntáza oxidu dusnatého, iNOS – indukovatelná syntáza oxidu dusnatého, NO^{\bullet} – oxid dusnatý [24]

Naopak enzym argináza může nepřímo snižovat produkci oxidu dusnatého tím, že snižuje intracelulární koncentraci argininu. V průběhu posledních let bylo vynaloženo značné

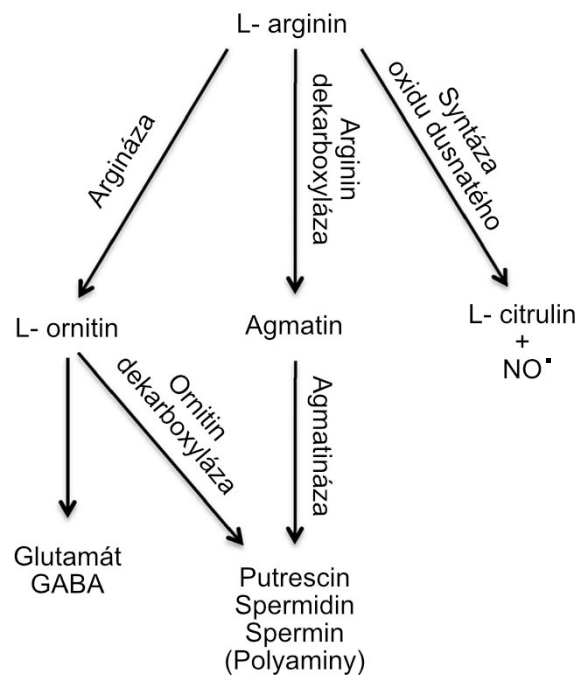
úsilí na zkoumání patogenní role ADMA, který inhibuje syntézu NO^* a tím přispívá k rozvoji a progresi kardiovaskulárních onemocnění. [19, 23]

1.3 Degradace a eliminace

Arginin může být získáván buď příjmem ze stravy, nebo jako produkt některých buněk prostřednictvím úplného či částečného močovinnového cyklu. V tomto cyklu je arginin přeměňován enzymem arginázou typu I (ARG1) na ornitin a močovinu, což umožňuje efektivní vylučování přebytečného dusíku z organismu. [25, 26]

Na metabolismu a eliminaci argininu se podílí několik klíčových enzymů, včetně argininosukcinát syntetázy, dvou izoform arginázy (ARG 1 a 2), tří izoform syntázy oxidu dusnatého (iNOS, nNOS, eNOS) a arginindekarboxyláza. [15]

Na obrázku č.5 je znázorněno, jaké metabolity vznikají z L-argininu působením jednotlivých zmíněných enzymů.



Obrázek 5: Degradace L-argininu (upraveno); GABA – kyselina γ -aminomáselná, NO^* – oxid dusnatý [27]

V přirozeném stavu organismu se všechny aminokyseliny přeměňují na jiné metabolity, které se z lidského těla vylučují. V případě metabolické poruchy dochází k vylučování argininu do moči. [26]

1.3.1 Degradace a eliminace ADMA

Koncentrace ADMA je fyziologicky regulována dvěma hlavními mechanismy – vylučováním ledvinami a enzymatickou degradací. Na degradaci ADMA se podílejí enzymy dimethylarginin-dimethylaminohydroláza (DDAH) a alaninglyoxylát-aminotransferáza 2 (AGXT2). [14, 21]

DDAH je specifický enzym, který katalyzuje degradaci výhradně ADMA, nikoli jeho symetrické formy SDMA. Enzymatická aktivita DDAH byla prokázána v ledvinách, slinivce břišní, játrech, mozku a aortě. DDAH přeměňuje ADMA na citrulin a dimethylamin. Dosud byly identifikovány dvě izoformy DDAH (DDAH1 a DDAH2). DDAH1 je hlavním enzymem zodpovědným za metabolismus ADMA, přičemž je exprimován v tkáních produkujících neuronální NOS. Naproti tomu DDAH2 se vyskytuje zejména v tkáních s přítomností endotelové izoformy NOS. Aktivita DDAH může být negativně ovlivněna zvýšenou hladinou glukózy, oxidovaného LDL a homocysteinu, což vede ke zvýšení koncentrace ADMA v plazmě. [13, 20, 28]

U zdravého dospělého jedince je denně produkováno přibližně 300 μmol ADMA (cca 60 mg). Z tohoto množství je přibližně 80 % ADMA metabolizováno pomocí DDAH1, zatímco zbylých 20 % je vylučováno ledvinami močí. [6, 13, 20, 21]

Intracelulární ADMA může inhibovat aktivitu CAT, čímž nejenže brání aktivitě NOS, ale také snižuje intracelulární přísun L-argininu. Tím přispívá ke zvýšení oxidačního stresu a k dalšímu omezení biogeneze NO^{\bullet} . [15, 29]

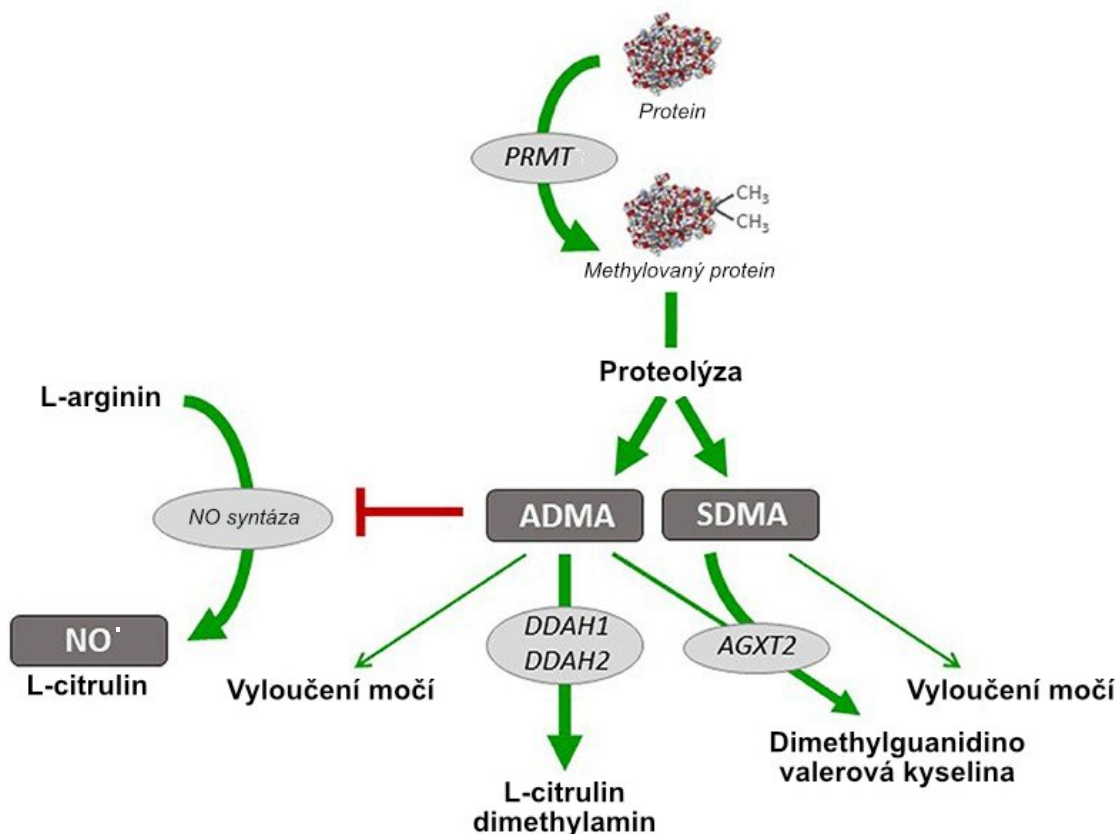
Další cestou degradace ADMA je pomocí enzymu AGXT2, mitochondriální aminotransferázou exprimovanou převážně v ledvinách. Tato reakce vede ke vzniku α -keto- δ -(N(G), N(G)-dimethylguanidino) kyseliny valerové (DMGV). [13, 21]

1.3.2 Degradace a eliminace SDMA

SDMA je z organismu odstraňován převážně močí (>90 %). Jak už bylo zmíněno výše, enzym DDAH se nepodílí na degradaci SDMA. Na jeho metabolismu se však může podílet enzym AGXT2, který je exprimován zejména v ledvinách. Tato schopnost AGXT2 metabolizovat SDMA by mohla částečně vysvětlovat, proč je považován za citlivější biomarker než výpočtové rovnice, jako jsou CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) a MDRD (Modification of Diet in Renal Disease), založené na odhadované glomerulární filtraci. Eliminace SDMA a ADMA není výlučně závislá na ledvinné funkci.

Studie naznačují, že i játra se podílejí na odstraňování těchto molekul z organismu, čímž přispívají k jejich celkové homeostáze. [13, 30]

Na obrázku č. 6 je možné vidět syntézu ADMA a SDMA pomocí enzymů PRMT a také degradaci pomocí enzymů DDAH a AGXT2.



Obrázek 6: Metabolická dráha ADMA a SDMA (upraveno); NO[•] – oxid dusnatý, PRMT – protein arginin methyltransferáza, DDAH1 a DDAH2 – dimethylarginin-dimethylaminohydroláza, AGXT2 – alaninglyoxylát-aminotransferáza 2, ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin, NO[•] – oxid dusnatý [31]

1.4 Klinický význam argininu a dimethylargininů

Řada klinických studií prokázala zvýšené hladiny ADMA a SDMA u širokého spektra onemocnění. Jak již bylo zmíněno, obě tyto látky jsou uremické toxiny. Patofyziologický význam těchto aminokyselin byl zkoumán u chronického onemocnění ledvin a konečného stádia onemocnění ledvin. Ačkoli většina studií uvádí zvýšené koncentrace ADMA u pacientů s CKD, a to dokonce ještě před poklesem glomerulární filtrace, proto nelze ADMA jednoznačně považovat jako prediktivní biomarker u pacientů s onemocněním ledvin. [6]

Fyziologické koncentrace ADMA u zdravého dospělého člověka se pohybují v rozmezí 0,4 a 0,6 μmol/l. [6]

Hladiny SDMA u zdravého jedince se pohybují mezi 0,4-0,7 $\mu\text{mol/l}$. Hodnoty SDMA se v různých publikacích liší, a to mimo jiné z důvodů, že rutinní stanovení SDMA v klinické praxi u lidí není běžné. Naproti tomu v oblasti veterinární medicíny, zejména u psů a koček, je laboratorní měření SDMA již poměrně rozšířenou metodou monitorování renálních funkcí. [32]

1.4.1 Arginin

Astma je běžné onemocnění charakterizované přetrvávajícím zánětem dýchacích cest a reverzibilní obstrukcí dýchacích cest. Přerušovaná obstrukce je důsledkem infiltrace zánětlivých buněk, zvýšené sekrece hlenu, edému a zúžení hladkého svalstva dýchacích cest. [16]

Současné metody diagnostiky astmatu a hodnocení účinnosti léčby jsou stále nepřesné, a to především kvůli omezením spirometrie, která měří plicní funkce, a neinvasivním biomarkerům, jako je analýza vydechaného vzduchu a vzorku sputa. Jedním z biomarkeru, který je přítomen ve vyšších koncentracích ve vydechaném vzduchu u astmatiků, je NO^* . [16]

Oxid dusnatý, který je produkován především z metabolismu L-argininu za účasti enzymů NO syntáz, je nezbytný pro správnou funkci plic. Produkce NO^* může být při zánětu výrazně zvýšená, avšak při nedostatku aktivního enzymu může být produkce NO^* snížena. [16]

1.4.2 ADMA

Zvýšené koncentrace ADMA byly popsány v krevním oběhu u různých onemocnění napříč věkovými a pohlavními skupinami. Rozdíly v koncentracích ADMA mezi pohlavími jsou relativně malé, zatímco rozdíly mezi jednotlivými věkovými skupinami jsou výraznější. U novorozenců je hladina ADMA výrazně zvýšená (zhruba 1,06 $\mu\text{mol/l}$), přičemž postupně klesá na hodnoty blízké těm u dospělých. U dětí je hladina vyšší než u dospělých a hladina klesá zhruba do věku 25 let. [6]

Kromě onemocnění ledvin, kde jsou zvýšené hladiny ADMA běžně pozorovány, jsou vysoké koncentrace tohoto biomarkeru také spojeny s řadou dalších onemocnění, včetně hypertenze, hypercholesterolemie, diabetes mellitus, cévní mozkové příhody, obezity, ischemické choroby srdeční, syndromu polycystických vaječníků a srpkovité anémie. Mnoho z těchto onemocnění postihuje jak ženy, tak muže. Nicméně některé nemoci častěji se vyskytující u žen například systémový lupus erythematodes, nebo postihující výhradně ženy, jako je preeklampsie či syndrom polycystických vaječníků, jsou spojeny se zvýšenými

koncentracemi ADMA. Některá dětská onemocnění, jako je nedonošenost nebo vrozené defekty enzymů močovinového cyklu, jsou rovněž spojena se zvýšenými hodnotami ADMA v krvi. [6, 11]

Chronické onemocnění ledvin (CKD) bude podrobněji rozebráno v následující kapitole 1.4.3 o SDMA. Zvýšené hladiny ADMA pozorované u CKD jsou přičítány především snížené aktivitě enzymů, které metabolizují ADMA, spíše než sníženému přímému vylučování ADMA močí. [10, 30]

Urémie je závažnou komplikací CKD a je definována jako hromadění rozpuštěných látek, které jsou za normálních okolností vylučovány ledvinami. V případě pokročilé urémie se může jednat o život ohrožující stav. Ačkoliv dialýza významně prodlužuje život pacientů s konečným stádiem ledvinového onemocnění, není schopna zcela eliminovat uremický syndrom. I přes pravidelnou dialýzu nedochází k úplnému odstraňování některých organických odpadních látek. Tyto tzv. uremické toxiny hrají zásadní roli nejen v progresi CKD, ale také v rozvoji kardiovaskulárních onemocnění. [10]

Endotel, vnitřní výstelka cév, hraje klíčovou roli při udržování cévní tenze a struktury. Je známo, že endoteliální dysfunkce představuje raný a důležitý krok v patogenezi koronárních onemocnění. Oxid dusnatý je jednou z hlavních vazoaktivních látek produkovaných endotelem, která je nezbytná pro zachování vaskulární homeostázy. Snížená produkce NO[•] je spojena se zhoršenou funkcí endotelu. Zvýšené koncentrace ADMA inhibují syntézu NO[•] tím, že kompetitivně blokují enzym NOS. Tímto způsobem ADMA přispívá k endoteliální dysfunkci a podporuje vznik a progresi **aterosklerózy**. Zvýšené hladiny ADMA byly popsány u pacientů s hypercholesterolemií, aterosklerózou, hypertenzí, chronickým srdečním selháním a cukrovkou. [13, 20]

Ve vztahu k arteriální hypertenzí bylo prokázáno, že NO[•] hraje zásadní roli v regulaci cévního tonu a krevního tlaku. [30]

1.4.3 SDMA

Studie prokázaly, že hladiny SDMA úzce korelují s funkcí ledvin. SDMA je navíc považován za potenciální biomarker akutního poškození ledvin. Většina patologických stavů spojených se zvýšenou hladinou SDMA je obdobná těm, které byly uvedeny výše v souvislosti s ADMA (viz kapitole 1.4.2). [6, 30]

Chronické onemocnění ledvin je progresivní a nevratná ztráta funkce ledvin. CKD je definováno jako strukturální nebo funkční poškození ledvin trvajících déle než tři měsíce.

Odhaduje se, že celosvětově postihuje 8-16 % populace, přičemž prevalence stoupá s věkem. V konečném stádiu onemocnění ledvin je nutné zahájit náhradní léčbu – dialýzu nebo transplantaci ledvin. [10, 21]

Progresivní pokles funkce ledvin vede k hromadění toxinů, které jsou za normálních podmínek vylučovány ledvinami, což následně vede k rozvoji urémie. Uremické toxiny se klasifikují do tří kategorií: ve vodě volně rozpustné nízkomolekulární látky; látky vázané na bílkoviny a středně velké molekuly. Pacienti s CKD jsou vystaveny zvýšenému riziku kardiovaskulárních onemocnění, a to v důsledku celé řady rizikových faktorů specifických pro toto onemocnění. [10]

Jedna z klinických studií uvádí souvislost mezi zvýšenými hladinami SDMA v plazmě nebo mozkomíšním moku u pacientů po ischemické či hemoragické cévní mozkové příhodě. Zmíněná studie rovněž uvádí, že hromadění SDMA v HDL může narušit jejich protizánětlivé účinky a přeměnit je na dysfunkční lipoproteiny. Tyto změněné HDL mohou následně vyvolat zánět, oxidační stres či dysfunkci endoteliálních buněk. [13]

1.5 Genová exprese L-argininu a využití v protinádorové léčbě

Aminokyseliny představují základní stavební kameny pro syntézu bílkovin a plní řadu dalších nezbytných funkcí v rámci fyziologických procesů. Nádorové buňky často vykazují zvýšenou závislost na určitých aminokyselinách, a proto se terapie zaměřená na jejich deprivaci stala slibnou strategií v protinádorové léčbě. Tento přístup spočívá v cíleném omezení přísunu specifických aminokyselin do nádorových buněk, čímž dochází k inhibici jejich růstu a proliferaci. [1]

V kapitole 1.2. (viz obrázek 2) byl popsán metabolismus argininu, který je rovněž úzce propojen s nádorovou biologií.

Katabolismus argininu může ovlivňovat progresi nádorových onemocnění prostřednictvím tří drah. **(1) Dráha syntézy polyaminů.** Arginin je hydrolyzován na močovinu a ornitin. Ornitin je následně přeměněn pomocí ornitindekarboxyláza (ODC) a dalšími enzymy (spermidin a spermin syntázou) na 3 polyaminy – putrescin, spermidin a spermin. Tato dráha je u většiny nádorů aktivnější a vyšší koncentrace polyaminů mohou podporovat nádorovou progresi. **(2) Dráha syntézy NO[•].** NO[•] vzniká z argininu pomocí NOS syntáz (nNOS, eNOS, iNOS). Bylo prokázáno, NO[•] může mít dvojitý účinek – NO[•] produkovaný imunitními buňkami může aktivovat protinádorovou imunitu, zatímco NO[•] produkovaný samotnými nádorovými buňkami naopak podporuje jejich růst a metastázování. **(3) Ornitinový cyklus.** Ornitin je

přeměňován na citrulin a následně za působení argininosukcinát syntetázy na argininosukcinát. Ten je dále štěpen na arginin a fumarát. Arginin je posléze hydrolyzován arginázou zpět na ornitin a močovinu. Zvýšená exprese argininosukcinát syntetázy je nezbytná pro proliferaci a metastazování nádorových buněk. [3, 33]

Deprivace argininu se stala slibnou terapeutickou strategií v léčbě nádorových onemocnění. Tento přístup selektivně cílí na nádorové buňky s tzv. argininovou auxotrofií, které vykazují sníženou expresi enzymu ASS1 (enzym, omezující rychlost močovinového cyklu, který syntetizuje arginin z citrulinu). Jeho nedostatek činí nádorové buňky závislými na vnějším příjmu argininu pro zajištění růstu a proliferace. Tento terapeutický přístup lze realizovat pomocí různých látek, zejména enzymů, které rozkládají arginin a tím brání růstu nádorových buněk. Mezi tyto enzymy patří arginin deimináza (ADI), argináza a arginindekarboxyláza (ADC). Tímto způsobem jsou nádorové buňky zbaveny klíčové aminokyseliny, což omezuje jejich schopnost růst a přežít. [1, 3]

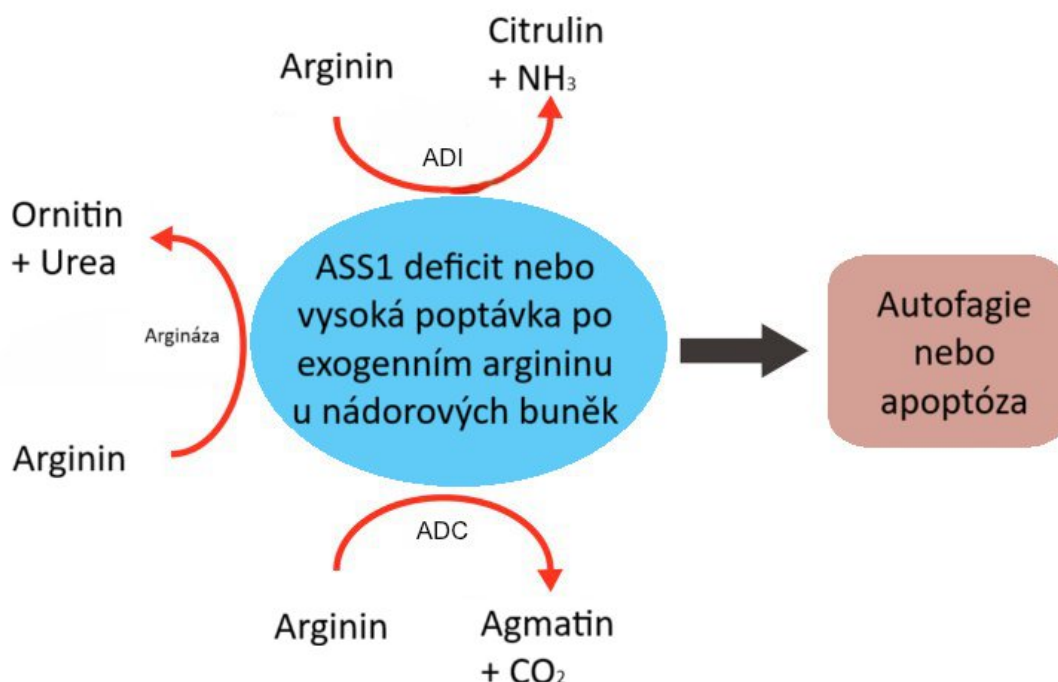
Již v roce 1986 byly zahájeny výzkumy zaměřené na využití deprivace argininu jako terapeutické strategie v léčbě nádorových onemocnění, například s využitím látky L-kanavanin. V rámci dalších studií byl identifikován enzym karboxypeptidáza-D, který dokáže rozkládat arginin. Hlavní pozornost se však soustředí na enzym ADI, který vykazuje značný terapeutický potenciál. Jeho klinické využití je však limitováno vysokou antigennicitou a rychlým odbouráváním v organismu. Vědci proto modifikovali ADI polyethylenglykolem (PEG), čímž došlo k prodloužení jeho biologického poločasu a snížení antigenní odezvy organismu. [3]

Další inovativní metodou je zapouzdření ADI do speciálních pH-citlivých mikročastic na bázi biopolymerů, které umožňují jeho cílené uvolnění v kyselém nádorovém prostředí. Tento způsob ukázal schopnost zpomalit růst nádorových buněk. [3]

Kromě enzymu ADI se využívá také enzym argináza, rovněž modifikována PEG. Tato úprava přispívá k prodloužení jejího účinku. Rekombinantní lidská argináza (rhArg), produkovaná pomocí bakterií a upravená PEGylací, dokáže dlouhodobě snižovat hladinu argininu v těle – až na tři dny. Verze enzymu s obsahem kobaltu (Co^{2+}) navíc zlepšila její enzymatickou účinnost a stabilitu. [3]

PEGylovaná forma arginázy známá jako BCT-100 ukázala protinádorové účinky u různých typů rakoviny (např. u melanomu, jaterních a krevních nádorů). Novější enzym NEI-01, který se specificky váže na sérový albumin, také slibně působí proti nádorům v předklinických testech. [3]

Obrázek 7 znázorňuje degradaci argininu v nádorových buňkách s deficitem ASS1 nebo s vysokou spotřebou exogenního argininu.



Obrázek 7: Degradace argininu v nádorových buňkách s deficitem ASS1 nebo s vysokou spotřebou exogenního argininu (upraveno); ADI – arginin deimináza, ADC – arginindekarboxyláza, ASS1 – argininosukcinát syntetáza 1, NH_3 – amoniak, CO_2 – oxid uhličitý [1]

1.6 L-arginin jako doplněk stravy

Endogenní látky související s metabolismem NO^\bullet , mezi které patří zejména arginin, mohou pozitivně ovlivnit sportovní výkon člověka zlepšením fyziologických a metabolických procesů. Výsledky studií se však liší, což může být způsobeno rozdíly ve fyziologických požadavcích mezi anaerobními a aerobními disciplínami. [26, 34]

Nejvýznamnější přínos argininu spočívá v jeho roli prekurzoru NO^\bullet , jenž funguje jako důležitá signální molekula. Bylo prokázáno, že NO^\bullet zvyšuje průtok krve, zlepšuje svalové kontrakce a usnadňuje výměnu plynů. Arginin navíc stimuluje sekreci růstového hormonu (somatotropinu), který podporuje růst buněk a reguluje metabolismus živin, což přispívá k nárůstu svalové hmoty a hypertrofii. Arginin jako doplněk stravy navíc vedl ke snížení hladiny amoniaku, laktátu, mastných kyselin a oxidaci tuků po fyzické zátěži. Kromě toho bylo zaznamenáno zvýšení glycerolu po cvičení, přičemž se zlepšila oxidace sacharidů a účinnost kyslíku s ohledem na vytrvalost při sportovním výkonu. [34]

Kromě užívání argininu jako doplněk stravy pro lepší sportovní výkony může také sloužit k prevenci některých zdravotních problémů, jako například poranění způsobená tlakem.

Ty se velmi často vyskytují u pacientů, kteří jsou hospitalizováni v nemocnicích či osob dlouhodobé péči. Toto poranění postihují kůže a podkožní měkké tkáně. Poranění způsobená tlakem významně zvyšují riziko onemocnění, infekcím a zhoršují celkový zdravotní stav pacienta. [35, 36]

1.7 Příprava biologických vzorků pro stanovení dimethylovaných argininů

Před chromatografickou analýzou je často nezbytné provést vhodnou přípravu vzorku, která umožní efektivní separaci cílových analytů od přítomných proteinů a dalších interferujících látek v biologických matricích, například v plazmě. Mezi nejčastější používané techniky přípravy vzorku patří precipitace proteinů, extrakce na pevné fázi (SPE) a extrakce kapalina-kapalina. [36]

V přehledové studii od tureckého autora Ali Unlu a kolektivu z roku 2021 byly shrnuty různé analytické postupy ke stanovení dimethylargininu v různých lidských biologických vzorcích jako je sérum, plazma, moč či erytrocyty. Přehled rovněž zahrnoval studie pracující se živočišnými vzorky, zejména potkanů. Jednotlivé studie se od sebe lišily nejen použitým biologickým materiálem, ale také zvolenými činidly (např. deproteinačními činidly), použitými standardy, stanovovanými látkami (včetně dalších aminokyselin) a aplikovanými metodami (nejčastěji je používána kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí). [38]

V této části se budu věnovat pouze přípravě vzorků, u kterých byla použita právě kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí, ionizací elektrosprejem a separací na koloně C₁₈ a HILIC. Níže jsou tak popsány různé přípravy vzorků z článků k jejichž prostudování bylo inspirací již zmíněné turecké review. Také jsou zde popsány metody přípravy, které byly sepsány po vydání tureckého review.

Po popisu jednotlivých postupů přípravy vzorků následuje tabulka, která přehledně uvádí podmínky chromatografických analýz, které byly použity při analýze takto připravených vzorků. Tabulka obsahuje informace o použitých mobilních fázích, typech kolon, průtocích mobilní fáze, teplotách kolon a objemu dávkování vzorku.

Rozdělení podle typu kolony:

1. HILIC

Rozdělení podle typu biologického materiálu:

A. Stanovení v lidských erythrocytech:

- V této studii jako deproteinační činidlo byla použita směs acetonitrilu a methanolu v poměru (1:1) a následně provedena pouze centrifugace k oddělení sražených bílkovin od supernatantu. Následně tak nebyla potřeba jiná úprava vzorku či extrakce pomocí SPE.
- Výzkum se zaměřil na erythrocyty z důvodů, že hrají velmi důležitou roli v metabolismu oxidu dusnatého. Ze závěru článku vyplývá, že u výsledků měření byla dobrá opakovatelnost a tím lze říct, že byla metoda úspěšná. [39]

B. Stanovení v lidské plazmě:

- Vědci v této studii jako deproteinační činidlo použili směs acetonitrilu a methanolu v poměru (3:1). Po smíchání vzorku s deproteinačním činidlem byla směs pouze centrifugována a nebylo použito jiné úpravy.

Výhodou u této metody byla vysoká přesnost, rychlost (doba analýzy kratší než 5 minut), použití menšího objemu vzorku a velmi dobré oddělení ADMA a SDMA. [40]

- V další studii ke vzorku přidali kyselinu mravenčí, následně odebrali část vzorku a přidali acetonitril. Tuto směs centrifugovali a bez dalších úprav analyzovali. Tato metoda prokázala vysokou přesnost a robustnost. Také zjistili, že analyty zůstávají stabilní až týden po oddělení od červených krvinek, přičemž extrahované vzorky vykazovaly jen mírně sníženou stabilitu. [41]
- Při této analýze byl vzorek smíchán s vnitřním standardem. Proteiny ve vzorku byly vysráženy pomocí acetonitrilu a pufru složeného z kyseliny mravenčí a mravenčanu amonného. Vzorek byl vortexován a odstředěn. Metoda byla považována jako úspěšná z důvodů vysoké přesnosti, rychlosti, bez nutnosti derivatizace, použití stabilních izotopových vnitřních standardů. [42]

C. Stanovení v moči

- V této studii byl stanovován pouze homocystein a ADMA. Zředěný vzorek moči (1:9 s deionizovanou vodou) byl smíchán s vnitřním standardem cystamin dihydrochloriduchloridem a NaOH, který byl použit na úpravu pH. K připravenému vzorku bylo přidáno DTT (dithiotreitol), následně se směs vortexovala a nechala několik minut při pokojové teplotě. Po uplynutém čase byla přidána kyselina mravenčí v methanolu a došlo k precipitaci proteinů. Směs byla vortexována, centrifugována a připravena na analýzu. Analýza probíhala bez derivatizace. Metoda tak byla rychlá, efektivní, měla vysokou citlivost a přesnost. [43]

2. C₁₈

Rozdělení podle typu biologického materiálu:

A. Stanovení v plazmě

1. ODPAŘENÍ DUSÍKEM A DERIVATIZACE POMOCÍ BUTANOLU A ACETYLCHLORIDU

- Vnitřní standard v methanolu přidali autoři ke vzorku plazmy. Vzorek byl odstředěn a supernatant byl odebrán a vysušen pod proudem dusíku. Následně byl proveden derivatizační krok a to tím, že vysušený extrakt byl rozpuštěn v roztoku butanolu obsahující acetylchlorid. Rozpouštědlo bylo odpařeno pod proudem dusíku. Derivatizované vzorky byly rozpuštěny ve směsi vody a methanolu (90:10) obsahující kyselinu mravenčí, následně byl vzorek analyzován.
- Metoda stanovení byla hodnocena jako úspěšná. Bylo umožněno detekovat velmi nízké koncentrace ADMA, SDMA a jiných metabolitů. Byla potvrzena vysoká přesnost měření, rychlost a účinnost metody.
- Vzorek byl po derivatizaci odpařen z důvodů odstranění přebytečných těkavých složek, které by mohly negativně ovlivnit analýzu. Odpařením se zajišťuje vyšší čistota vzorku, což vede k lepší citlivosti a přesnosti měření. Kromě odpařování použili i derivatizaci pomocí acetylchloridu, aby zvýšili citlivost a selektivitu detekce. Také došlo ke zlepšení chromatografického rozdělení a zlepšila se stabilita a opakovatelnost měření. [44]

2. ODPAŘENÍ DUSÍKEM A DERIVATIZACE S OPA

- Ke vzorku plazmy byl přidán vnitřní standard a acetonitril, který slouží jako deproteinační činidlo. Vzorek byl odstředěn a čirý supernatant odpařen ve vakuu. Po odpaření byl vzorek rozpuštěn ve vodě a přenesen do autosampleru, kde proběhla automatická derivatizace.
- V této studii jako derivatizační činidlo použili OPA (o-ftalaldehyd), 2-merkптоethanol, methanol a kyselinu boritou. V autosampleru bylo toto derivatizační činidlo smícháno se vzorkem. Použité derivatizační činidlo byla OPA z důvodů, zvýšení citlivost a selektivnosti při detekci, je kompatibilní s vodnými maticemi jako jsou plazma a moč.
- Citlivost a selektivita u této metody byla vysoká. Byla také velmi přesná a rychlá. Jako deproteinační činidlo použili acetonitril, který efektivně odstraňuje proteiny je také velmi kompatibilní s LC-MS/MS, jelikož se může používat i jako mobilní fáze. [45]

3. ODPAŘENÍ DUSÍKEM A DERIVATIZACE S HCL A N-BUTANOLEM

- Ke vzorku byl přidán vnitřní standard a acetonitril. Vysrážený protein byl odstraněn a organická fáze odebrána a odpařena pomocí dusíku. K vysušenému vzorku byla přidána směs HCl/n-butanol. Směs byla odstředěna a část převedena do ependorfy a vysušena dusíkem. Vysušený vzorek byl následně rozpuštěn v mobilní fázi a analyzován.
- Autoři vyvinuli jednoduchou, citlivou a přesnou metodu. Příprava vzorku byla rovněž úspěšná. Metoda umožnila efektivní extrakci a analýzu cílových látek v plazmě. [46]

4. ODPAŘENÍ, DUSÍKEM

- Deproteinace vzorku byla provedena pomocí methanolu. Následně byly supernatanty odebrány, odpařeny a rozpuštěny v roztoku kyseliny mravenčí ve vodě.
- Metoda byla hodnocena jako velmi úspěšná. Výhodou této metody bylo, že nebyla použita derivatizace a byla minimální příprava vzorku. Byla vysoká přesnost a citlivost této metody. Byl i stanoven nízký limit detekce pro všechny analyty, což umožňuje detekci i nízkých koncentrací. [47]

5. FILTRY

- V ependorfce byl smíchán vnitřní standard se vzorkem a vodou. Výsledná směs byla nalita na filtry Amicon Ultra s limitem 10 000 nominálních molekulových hmotností. Nádobka s filtrem byla odstředěna a přefiltrovaný roztok převeden do vialky.
- Výsledky této metody byly vysoká přesnost, dobrá opakovatelnost a nízké limity detekce. Příprava vzorků byla jednoduchá a využití filtrů jim umožnilo odstranění proteinů bez použití kyselin či organických rozpouštědel. [48]

6. ODPAŘENÍ DUSÍKEM A FILTRY

- Vzorek, vnitřní standard a acetonitril byly smíchány a odstředěny. Následně byl supernatant odebrán a odpařen proudem dusíku. Odparek byl rozpuštěn ve vodě a přefiltrován přes mikrospinnový centrifugační filtr a odstředěn. Odebraný supernatant byl analyzován.
- Metoda byla rychlá a spolehlivá bez nutnosti derivatizace nebo použití organických rozpouštědel kromě acetonitrilu. [49]

7. SPE KOLONKY, ODPAŘENÍ A DERIVATIZACE S HCL V 1-BUTANOLU

- Vzorek plazmy byl smíchán s vnitřním standardem a Na_2HPO_4 . Aminokyseliny byly extrahovány pomocí extrakčních kazet Oasis MCX na pevné fázi. Vzorky, prošlé přes SPE byly shromážděny do skleněných vialek a odpařeny pod dusíkem. K vysušeným vzorkům byla následně přidána směs HCl v 1-butanolu. Vialky byly promíchány, odpařeny a rozpuštěny v mobilní fázi.
- Autoři článku vyvinuli a validovali metodu s ředěním stabilními izotopy v plazmě, buňkách a tkáních. Metoda byla velmi přesná, citlivá pro všechny analyty a úspěšná při aplikaci na různé biologické matrice. [50]

B. Stanovení v moči

- V již už zmíněné studii v 2.A.ii. se kromě stanovení ADMA a SDMA v plazmě pokusili stanovovat tyto analyty i v moči.
Ke vzorku moči přidali roztok vnitřního standardu a pufr kyseliny borité. Takto připravené vzorky byly vloženy do autosampleru, kde byla provedena i derivatizace, stejná jak u vzorků plazmy.
Analýza v moči byla stejně úspěšná jako analýza v plazmě. [45]

ČLÁNEK	KOLONA	MOBILNÍ FÁZE	PRŮTOK (ml/min)	TEPLOTA KOLONY(°C)	DÁVKOVÁNÍ (μl)
1.A. [39]	Luna HILIC (50 × 2 mm, 3 μm; Phenomenex, USA)	A – 1,5 mM mravenčan amonný ve vodě B – 1,5 mM mravenčan v ACN/vodě (95,5:0,5)	0,25	30	10
1.B. [40]	Luna silica (100 × 2 mm, 3 μm; Phenomenex, USA)	A – ACN, TFA, kys. octová (1000:0,25:10) B – voda, TFA, kys. octová (1000:0,25:10)	0,4	21–23	15
1.B. [41]	Waters BEH Amide (150 × 2,1 mm, 1,7 μm; Waters, AU)	A – 0,01 M kys. mravenčí a 0,01 M mravenčan amonný v 90 % ACN B – 0,05 mM mravenčan amonný v 50 % ACN	0,5	40	30
1.B. [42]	Atlantis HILIC (150 × 2 mm, 5 μm; Waters, Německo)	A – 0,025% TFA a 1% kys. propionová ve vodě B – ACN	0,25	30	10
1.C. [43]	Atlantis HILIC (100 × 2,1 mm, 5 μm; Waters, USA)	A – voda/ACN/methanol (35/30/35) a 0,2% kys. mravenčí	0,2	Pokojová teplota	20
2.A.1. [44]	UPLC BEH C ₁₈ (50 × 2,1 mm, 1,7 μm; Waters, USA)	A – 0,1% kys. mravenčí ve vodě B – 0,1% kys. mravenčí v methanolu	0,6	Není uvedeno	6
2.A.2. [45]	Superspher 100 RP 18 (250 × 4 mm, 4 μm; Merck, Německo)	A – 0,1% kys. mravenčí a mravenčan amonný ve vodě B – methanol	0,5	40	50
2.A.3. [46]	HyPURITY C ₁₈ (150 × 2,1 mm, 5 μm; Thermo Fisher Scientific, USA)	A – 0,25 M octan amonný a methanol (93:7)	0,2	40	10
2.A.4. [47]	Supercosil LC-Si (33 × 4,6 mm, 3 μm; Supelco)	A – 0,1% kys. mravenčí ve vodě B – 100 mM mravenčan ve vodě	0,1	Není uvedeno	20
2.A.5. [48]	Nucleosil C ₁₈ (150 × 4 mm, 5 μm; Teknokroma, Španělsko)	A – 0,2% TFA ve vodě	0,4	20	10
2.A.6. [49]	Atlantis dC ₁₈ (100 × 4,6 mm, 3 μm; Waters, USA)	A – 0,03% TFA ve vodě	0,6	Pokojová teplota	5
2.A.7. [50]	XTerra MS C ₁₈ (100 × 3,9 mm, 3,5 μm; Waters, USA)	A – mravenčan amonný ve vodě/acetonitrilu (95,5:4,5) s 0,1% kys. mravenčí	0,8	20	10
2.B. [45]	Superspher 100 RP18 (250 × 4 mm, 4 μm; Merck, Německo)	A – 0,1% kys. mravenčí a mravenčan amonný ve vodě B – methanol	0,5	40	50

1.8 Stanovení ADMA a SDMA pomocí kapalinové chromatografie

Vzhledem k úzkému rozmezí fyziologických koncentrací ADMA a SDMA je nezbytné použití přesných analytických metod pro spolehlivé odlišení normálních a lehce zvýšených hodnot. [6]

Vzhledem k tomu, že ADMA a SDMA jsou vzájemnými strukturními izomery s identickou molekulovou hmotností 202, 25, je nutná chromatografická separace. Pro kvantifikaci hladin ADMA a SDMA se zatím nejvíce využívají vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou a fluorescenční detekcí (HPLC – ED a FD), plynová chromatografie (GC) – hmotnostní spektrometrie (MS), vysokoúčinná kapalinová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí (HPLC-MS a HPLC-MS/MS), ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (UPLC) – MS/MS a z imunochemických metod se používá ELISA. [2, 6]

Ve své diplomové práci se věnuji separaci a následnému stanovení dimethylargininů pomocí kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Následující dvě kapitoly 1.8.1 a 1.8.2 budu věnovat analytickým technikám jež jsem použila.

1.8.1 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

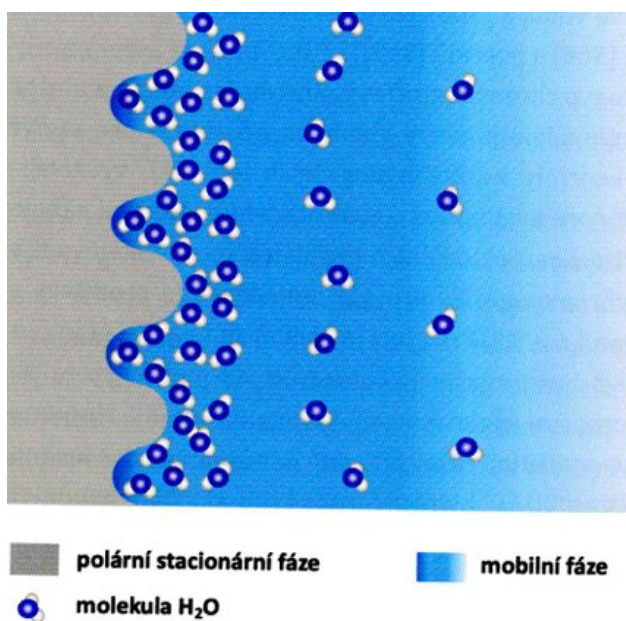
Kapalinová chromatografie je jedna z technik, která se používá k separaci a purifikaci v různých oblastech, včetně farmaceutického, biotechnologického, environmentálního a potravinářského průmyslu. HPLC se v posledních deseti letech stala metodou vhodnou pro analýzu široké škály sloučenin. Jednou z hlavních výhod oproti GC je skutečnost, že není nutné, aby analyzované látky byly těkavé. HPLC můžeme klasifikovat do pěti skupin podle fází: obrácená (neboli reverzní), normální, iontově výměnná, HILIC a chirální. [51]

Ve své diplomové práci se budu věnovat separaci dimethylargininů na koloně HILIC a na upravené koloně C18 s polárním endcappingem.

HILIC neboli hydrofilní interakční chromatografie, je specifický typ kapalinové chromatografie, při němž analyt interaguje s hydrofilní stacionární fází. Použitá mobilní fáze je obvykle binární směs obsahující organické rozpouštědlo (např. acetonitril) s přídavkem vody, která působí jako silné eluční činidlo. Voda je nejsilnějším eluentem, kdy jen malé zvýšení koncentrace vody vede ke snížení retence. [52]

Mechanismus separace v HILIC není dosud zcela objasněn, avšak mezi nejčastěji navrhované principy patří rozdělování analytu mezi hydrofobní část mobilní fáze a vrstvu vody,

která se pevně váže na povrch polární stacionární fáze. Na těchto polárních místech dochází k preferenční adsorpci vody, což vede k vytvoření difúzní vrstvy směrem do mobilní fáze, jak znázorňuje obr. 8. [52, 53]



Obrázek 8: Vrstva vody na povrchu HILIC stacionární fáze [52]

Při separaci na HILIC je stacionární fáze polární a je tak používán např. silikagel nebo polární funkční skupiny navázané na silikagelový či jiný materiál. Stacionární fáze používané pro HILIC je možné rozdělit do tří skupin podle přítomnosti elektrostatických interakcí a to na: neutrální (amidové, kyanové), nabitě (kladně – aminové a negativně – karboxylové kyseliny) a zwitterionty (fosfátové, peptidové). Nejpoužívanější stacionární fází v HILIC jsou silikagely nebo hybridní silikagel. [52, 53]

Mobilní fáze v HILIC se skládá z vysokého podílu organické složky, jako například acetonitrilu. Vodnou část tvoří malé množství vody a malé množství pufru. Obsah vodné složky v mobilní fázi musí být alespoň 2-3 % a naopak použití vysokého procenta vody v mobilní fázi (20-50 %) minimalizuje separaci a mění se pouze retence. Eluce polárních látek je umožněna pomocí zvyšování polaritý mobilní fáze, jinak tedy zvyšováním obsahu vodné složky. V HILIC jsou nejčastěji používány izokratické a gradientové eluce. Eluční síla organických rozpouštědel obecně roste s jejich polaritou a schopností účastnit se interakcí mezi protonovými donory a akceptory. [52, 53]

Do mobilní fáze se přidávají soli (pufry) pro ovlivnění elektrostatických interakcí mezi analyty a stacionární fází. Tyto soli upravují pH, iontovou sílu a ionizaci analytu. Nejčastěji se používají organické pufrý, jako jsou mravenčan a octan amonný. Jejich koncentrace se pohybují

v rozmezí 5–100 mM. Zvýšením koncentrace soli v mobilní fázi má za následek snížit nebo až omezit elektrostatické interakce mezi nabitými analyty a nabitou stacionární fází. Lze využít i roztoky kyselin nebo bází (cca 0,1 %) či samotnou vodu. [52, 53]

HILIC tak umožňuje jedinečnou selektivitu pro separaci polárních sloučenin, protože kombinuje charakteristické vlastnosti chromatografie s normální fází (kde je polární stacionární fáze), reverzní fází (kde je polární mobilní fáze) a iontově výměnnou chromatografií (možnost iontově výměnných interakcí). [53]

Nejrozšířenější technikou chromatografie je separace na **obrácené (reverzní) fázi**, použitelná pro širokou škálu sloučenin a matric vzorků. Mezi nejpoužívanější fáze v chromatografii s obrácenou fází patří oktadecylové fáze na bázi oxidu křemičitého (silikagelu). K nejnovějším stacionárním fázím, které získávají na popularitě patří: stacionární fáze s polární vestavbou (polar-embedded) nebo stacionární fáze s polárním koncem (polar-endcapped). Tyto fáze jsou modifikací klasické C_{18} a polární funkční skupiny, jako je amidová, aminová, etherová či karbamátová skupina. Obecně se tvrdí, že tyto polární fáze nabízejí lepší výhody, jako je stabilita ve vysoce vodném prostředí, lepší tvar píků a lepší selektivita. [52, 54]

Použitím vodných mobilních fází poskytují fáze s polární vestavbou účinnější chromatografii pro analýzu bází. Předpokládá se, že tyto fáze s polární vestavbou vytvářejí na povrchu oxidu křemičitého „štít“ a zabraňují přístupu bází ke zbytkovým silanolovým místům. To napomáhá eliminovat shlukování a „chvostování“ píků u bazických roztoků. Polární fáze s koncovou i vestavěnou skupinou sice obsahují polární funkční skupiny, ale většinou vykazují selektivitu typickou pro reverzně-fázovou chromatografii – polární látky eluují dříve, nepolární jsou zadržovány déle (při izokratických podmínkách). Fáze s vestavěnou polární skupinou navíc často více zadržují kyseliny tvořící vodíkové vazby, díky interakci se zásaditými polárními skupinami. [52, 55]

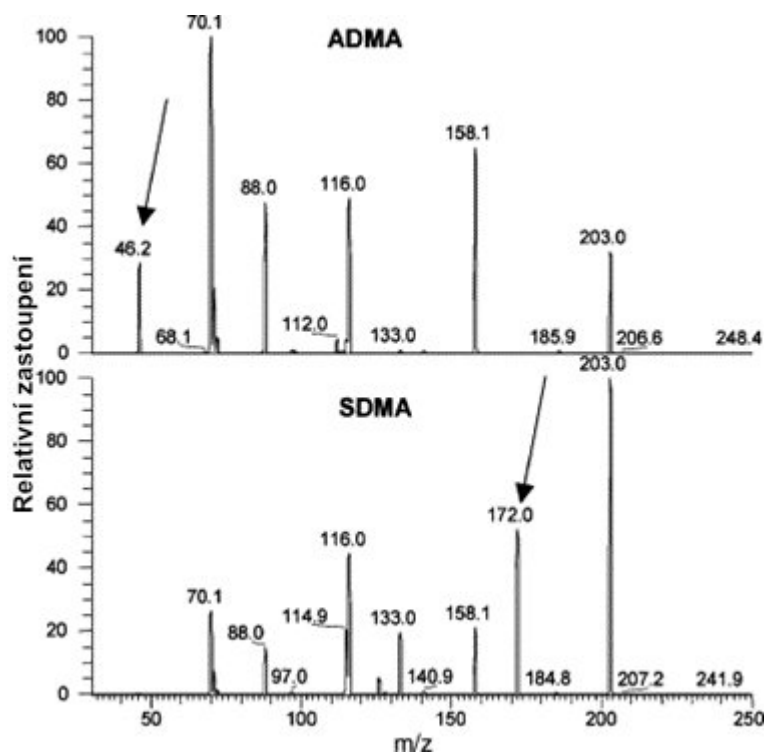
1.8.2 Hmotnostní spektrometrie

Separace ADMA a jeho izomeru, SDMA, pomocí kapalinové chromatografie je poměrně náročná kvůli jejich téměř identické struktuře. Z toho důvodu je při jejich kvantifikaci upřednostňována tandemová hmotnostní spektrometrie (HPLC-MS/MS), která umožňuje selektivní detekci na základě rozdílných produktových iontů. [49, 56]

Obě látky mají identický prekurzorový iont s hodnotou m/z 203,2, který při fragmentaci produkuje převládající produktový iont m/z 70,2. Tento produktový iont je však pozorován u obou dimethylargininů, a proto je potřeba vybrat specifické m/z pro každou látku. Pozorované

hodnoty m/z fragmentových iontů byly m/z 203→46 pro ADMA a m/z 203→172 pro SDMA. Fragmentový iont m/z 46 souvisel s tvorbou dimethylamoniového iontu, což je část, která je nalezena pouze v ADMA a nikoli v SDMA, zatímco fragmentový iont m/z 172 souvisel s neutrální ztrátou methylaminu, což je část, která byla nalezena pouze v SDMA a nikoli v ADMA. [4, 28, 48]

Na obrázku níže je možné vidět MS/MS fragmentaci pro ADMA a SDMA. Jsou zde vyznačené výše uvedené fragmentové ionty.



Obrázek 9: MS/MS fragmentace dimethylargininů (upraveno); ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin [4]

Při kvantitativní analýze využívající HPLC-MS, zejména při použití elektrosprejové ionizace, se často setkáváme s matricovými efekty, které představují jednu z hlavních komplikací této analytické metody. Projevují se jako rozdíl v intenzitě detekovaného signálu mezi standardním roztokem a reálným biologickým vzorkem, což může vést k potlačení či naopak zesílení signálu analytu. [4, 57]

Matricové efekty mohou být způsobeny přítomností endogenních složek biologického materiálu, které nebyly zcela odstraněny během přípravy vzorku, případně vznikají v důsledku kontaminace během samotného analytického procesu. Mezi nejčastější endogenní interferující látky patří soli, elektrolyty a různé polární sloučeniny, jako jsou fenoly, aminy, močovina či cukry. Významný vliv mohou mít také lipidy, zejména fosfolipidy, které se běžně vyskytují v plazmě. Kromě těchto složek mohou matricové efekty vyvolat i neznámé metabolity nebo

látky silně zadržované na koloně, které mohou eluovat až při následujících analýzách. Během extrakce se vzorek může kontaminovat látkami použitými jako extrakční činidlo. Mezi problematická extrakční činidla z hlediska HPLC-MS analýzy patří například soli nebo organické látky jako je TFA (kyselina trifluoroctová) nebo TEA (trimethylamin). [57]

Existují tři metody pro ověření přítomnosti matricových efektů:

1. Post-kolonového přídavku – k mobilní fázi se přidá roztok standardů. Do mobilní fáze se nadávkuje čistá mobilní fáze nebo rozpouštědlo vzorku a následně extrakt blanku biologického materiálu (tj. extrakt matrice biologického materiálu bez analytu).
2. Výpočet matricových efektů – ze zjištěné koncentrace analytu v extraktu, ke kterému byl přidán standardní roztok až po extrakci.
3. Porovnání směrnic kalibračních křivek – křivky jsou získány měřením standardních roztoků analytů a kalibračních křivek získaných pomocí metody standardního přídavku do měřených vzorků. [57]

Přítomnost matricových efektů závisí na celé řadě faktorů, mezi které patří chemické vlastnosti analytu, typ ionizační techniky, způsob přípravy vzorku, typ hmotnostního spektrometru a typ matrice. Tyto faktory mohou mít kumulativní účinek, což znamená, že jejich vzájemná interakce může zhoršit kvalitu analýzy. Pro snížení vlivu matricových efektů lze aplikovat několik přístupů v jednotlivých krocích analytické metody. V přípravě vzorků se například používá SPE technika, avšak může zde dojít ke zvýšení koncentrace interferujících látek, což může mít za následek zesílení matricového efektu, který by následně byl problém pro analýzu. Při chromatografii je účinným řešením použitím dvourozměrné chromatografie (2D LC), která umožňuje lepší separaci analytu od interferujících složek a tím snižuje vliv matricových efektů. V hmotnostní spektrometrii lze snížit vliv matricových efektů volbou vhodné ionizační techniky, jako jsou APPI (fotoionizace za atmosférického tlaku), APCI (chemická ionizace za atmosférického tlaku) nebo EI (elektronová ionizace). [57]

Vliv matricového efektu je možné vypočítat podle vzorce, který vypadá následovně:

$$ME = \frac{A_{SS}}{A_{MFS}} \times 100, \text{ kde } A_{SP} \text{ je plocha píku vzorku s přídavkem standardu (spiked sample)}$$

a A_{MFS} je plocha píku standardu v mobilní fázi. [49]

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo vypracovat a optimalizovat metodu HPLC-MS pro stanovení symetrického a asymetrického dimethylargininu v lidské plazmě. Práce se zaměřuje na testování dvou různých chromatografických kolon, a to modifikované C₁₈ kolony (Arion Polar C₁₈) a HILIC kolony (Ascentis Express HILIC), přičemž pro každou z nich optimalizovat podmínky separace. Následně zhodnotit získané výsledky vzhledem k výsledkům publikovaných v literatuře.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Chemikálie, přístroje a pomůcky

3.1.1 Chemikálie a plyny

- Acetonitril pro LC-MS ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Kyselina mravenčí pro LC-MS ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Mravenčan amonný pro LC-MS ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Methanol LiChrosolv $\geq 99,8$ % (Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- Stlačený plynný dusík (Linde, Dublin, Irsko)
- Stlačený plynný argon 5.0 (Linde, Dublin, Irsko)
- Stlačený plynný vzduch
- Ultračistá voda
- $N^G, N^{G'}$ -dimethyl-L-arginin dihydrochlorid (di(p-hydroxyazobenzen-p'-sulfonát) (SDMA), ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
- N^G, N^G -dimethyl-L-arginin dihydrochlorid (ADMA), ≥ 98 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

3.1.2 Přístroje a software

- Kapalinový chromatograf LC-40B x3 (Shimadzu, Japonsko)
- Hmotnostní spektrofotometr LCMS-8045 (Shimadzu, Japonsko)
- Software Labsolution (Shimadzu, Japonsko)
- Systém pro přípravu ultračisté vody model MicroPure UV (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
- Vortex (Heidolph, Schwabach, Německo)
- Ultrazvuková vodní lázeň K12 (Kraintech, Podhajska, Slovensko)
- Centrifuga 5417R (Eppendorf, Hamburk, Německou)
- Centrifuga Sorvall TC-6 (Sorvall, Newtown, CT, USA)
- Termovap, zařízení pro odpaření rozpouštědla (Ecom, České Meziříčí, Česká republika)
- Předvážky (KERN, Frankfurt, Německo)
- Přenosný pH/mV/°C metr model HI 8314 (HANNA instruments, Woonsocket, Rhode Island, USA)

3.1.3 Pomůcky

- Chromatografická kolona Ascentis Express HILIC, 15 cm × 2,1 mm, 5 μm
- Chromatografická kolona ARION® Polar C₁₈, 15 cm × 4,6 mm, 3,0 μm (Chromservis, Praha, Česká republika)
- Automatické pipety: 10 μl, 100 μl, 1000 μl (BioHit, Finsko)
- Mikrozkušavky Eppendorf: 1500 μl
- Plastové extrakční zkumavky 15 ml
- Skleněné vialky
- Plastová stříčka (Fisher Scientific, ČR)
- Laboratorní sklo

3.2 Biologické vzorky

Plná krev byla odebrána do vakuovaných EDTA (kyselina ethylendiaminotetraoctová) zkumavek v odběrovém centru MeDiLa v Polabinách. Krev byla stáčená při 3000 rpm po dobu 10 minut. Vzorky plazmy byly do analýzy uchovány v chladu při -80 °C.

Vzorky plazmy byly získány od 3 různých jedinců (dobrovolných dárců) a následně byly smíchány do jednoho homogenního směšného vzorku. Tento vzorek byl rozdělen na alikvoty.

Za účelem odstranění proteinů bylo ke každé mikrozkušavce (po 100 μl) přidán 1 ml předchlazeného acetonitrilu. Po smíchání byla směs krátce vortexována a 10 minut uchována v chladu. Poté byly vzorky centrifugovány při 11 000 otáčkách za minutu po dobu 10 minut a při teplotě 4 °C. Po centrifugaci bylo odebráno 350 μl organické vrstvy bez narušení sedimentované fáze obsahující vysrážené proteiny. Supernatant byl následně odpařen pod proudem dusíku při 60 °C. Poté byly odparky rozpuštěny v 150 μl ultračisté vodě.

Pro testování matricových efektů bylo do jedné mikrozkušavky (po 190 μl extraktu) přidáno po 10 μl ultračisté vody, zatímco do druhé mikrozkušavky (po 190 μl extraktu) bylo přidáno 10 μl připraveného směšného standardu o koncentraci 5 μM.

3.3 Roztoky

3.3.1 Příprava standardů

Zásobní roztok ADMA byl připraven o koncentraci 1817 μmol/l do vialky o objemu 1ml. Zásobní roztok SDMA byl připraven o koncentraci 331 μmol/l do vialky o objemu. Takto připravené vialky byly následně uchovány při -80°C.

Roztoky jednotlivých standardů byly připraveny o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ naředěním připravených zásobních roztoků ultračistou vodou. Směsný standard byl vytvořen smícháním obou roztoků v poměru 1:1 a výsledný roztok měl koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$.

Abychom snížili zátěž kolony a intenzitu signálu vycházející z MS byl směsný roztok zředěn 50krát ultračistou vodou.

3.3.2 Mobilní fáze

Mobilní fáze A až H byly připraveny pro separaci na koloně HILIC. Mobilní fáze I byla poté použita pouze na koloně C_{18} . Kromě mobilních fází A až I byla jako mobilní fáze použitý i čistý acetonitril.

Mobilní fáze A byla složena z 0,05% kyseliny mravenčí a mravenčanu amonného o koncentraci 3,8 mmol/l ve vodě. Mobilní fáze byla připravena rozpuštěním 0,072 g mravenčanu amonného a přidáním 150 μl kyseliny mravenčí do 300 ml ultračisté vody. Následně byla mobilní fáze odplyněna v ultrazvukové lázni na 15 minut.

Mobilní fáze B se skládala z 0,05% kyseliny mravenčí a mravenčanu amonného o koncentraci 6 mmol/l v ultračisté vodě. Na přípravu bylo naváženo 0,114 g mravenčanu amonného a přidáno 150 μl kyseliny močové do 300 ml ultračisté vody. Poté byla takhle připravená mobilní fáze odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 15 minut.

Mobilní fáze C byla vytvořena z 0,1% kyseliny mravenčí a mravenčanu amonného o koncentraci 6 mmol/l v ultračisté vodě. Mobilní fáze byla připravena rozpuštěním 0,114 g mravenčanu amonného a přidáním 300 μl kyseliny mravenčí a doplněno ultračistou vodou do 300 ml. Takto připravená mobilní fáze byla po dobu 15 minut odvzdušněna.

Mobilní fáze D byla složena z 3,8 mmol/l mravenčanu amonného a ultračisté vody. 0,072 g mravenčanu amonného bylo rozpuštěno v 300 ml ultračisté vody. Mobilní fáze byla následně odvzdušněna po dobu 15 minut.

Mobilní fáze E byla připravena z 150 μl 0,05% kyseliny mravenčí a rozpuštění 0,189 g (10 mmol/l) mravenčanu amonného v ultračisté vodě. Takto připravená mobilní fáze byla odvzdušněna na ultrazvukové lázni po dobu 15 minut.

Mobilní fáze F byla vytvořena z 0,1% kyseliny mravenčí a mravenčanu amonného o koncentraci 10 mmol/l. 0,189 g mravenčanu amonného bylo rozpuštěno ve 300 ml acetonitrilu a bylo přidáno 300 μl kyseliny mravenčí. Mobilní fáze byla poté 15 minut odvzdušňována.

Mobilní fáze G byla připravena pro gradientní eluci. Mobilní fázi tvořila 0,01% kyselina mravenčí a mravenčan amonný o koncentraci 1,2 mmol/l. Bylo smícháno 30 μ l kyseliny mravenčí a naváženo 0,023 g mravenčanu amonného do 300 ml acetonitrilu. Mobilní fázi jsme následně odvzdušňovali po dobu 15 minut.

Mobilní fáze H byla připravena stejně jako mobilní fáze G, ale tato mobilní fáze byla připravena do ultračisté vody. Následně byla po dobu 15 minut odvzdušněna na ultrazvukové lázni. Byla použita jak pro gradientovou eluci, tak i pro izokratickou eluci.

Kromě výše zmíněných připravených mobilních fází byla použita i mobilní fáze čistého acetonitrilu, která byla právě s těmito mobilními fázemi míchána v různých poměrech.

Mobilní fáze I byla připravena z 0,1% kyseliny mravenčí a mravenčanu amonného o koncentraci 20 mmol/l ve vodě. Mravenčan amonný o navážce 0,378 g byl rozpuštěn s 300 μ l kyseliny mravenčí a 300 ml ultračisté vody. Takto připravená mobilní fáze byla po dobu 15 minut odvzdušněna na ultrazvukové lázni.

3.4 Stanovení dimethylargininů pomocí LC-MS/MS

Stanovení asymetrického a symetrického dimethylargininu bylo pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí.

3.4.1 Chromatografická separace

Chromatografická separace probíhala na kapalinovém chromatografu Shimadzu LC-40B. Nejdříve pro separaci standardů byla využita kolona Ascentis Express HILIC o délce 15 cm, průměru 2,1 mm a velikosti částic 5 μ m. Následně byla použita kolona ARION® Polar C₁₈ o délce 15 cm, průměru 4,6 mm a velikosti částic 3,0 μ m na separaci standardů a poté i vzorků plazmy.

Izokratická eluce spočívala v míchání jednotlivých mobilních fází v různých poměrech. Po každé změně poměru mezi mobilními fázemi následovalo 10ti až 15ti minutové ekvilibrování kolony. Toto platilo pouze pro kolonu C₁₈, u kolony HILIC to bylo 30 až 45 minut. Analýzy byly prováděny za různých teplot kolony, průtoku mobilní fáze a jiného množství dávkování vzorku/standardu pro zjištění nejlepších optimálních podmínek pro separaci. Gradientová eluce byla vytvořena mobilní fází H v kombinaci buď s acetonitrem nebo mobilní fází G. Tuto eluci jsme použili pouze na koloně HILIC.

3.4.2 Hmotnostní detekce

Hmotnostní detekce byla prováděna pomocí přístroje LC-MS 8045 (Shimadzu) vybaveného trojitým kvadrupólem a elektrosprejovou ionizací (ESI). Analyty byly ionizovány za vzniku protonovaných iontů $[M+H]^+$.

K ionizaci a odpařování sloužil dusík jako nebulizační (3 L/min) a sušící plyn (10 L/min), přičemž sušící plyn (v našem případě vzduch) měl teplotu 400 °C. Interfacer byl zahřátý na 300 °C. Měření probíhalo v pozitivním ionizačním režimu při napětí 4 kV na vstupu do kapiláry.

Přístroj pracoval v režimu MRM (monitorování více reakcí), což umožnilo selektivní detekci fragmentačních iontů vzniklých z jednoho či více prekurzorových iontů. Ty byly nejprve vybrány v prvním kvadrupólu, následně rozštěpeny ve druhém kvadrupólu pomocí argonu jako kolizního plynu (CID – kolizí indukovaná disociace) a výsledné fragmenty byly analyzovány ve třetím kvadrupólu. Pro ADMA byl zvolen fragment s hodnotou m/z 46,2, zatím co pro SDMA byl sledován produktový iont m/z je 71,15.

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci této diplomové práce bylo cílem vyvinout a optimalizovat metodu kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí pro stanovení asymetrického a symetrického dimethylargininu v lidské plazmě. Pro separaci byly testovány dva typy kolon – modifikovaná kolona Arion Polar C₁₈ a kolona Ascentis Express HILIC – s cílem porovnat jejich separační schopnosti, citlivost detekce a vliv biologické matrice na výsledky měření.

Jelikož jsme při analýze pomocí kolony C₁₈ s polárním endcappingem měli mobilní fázi pouze vodnou, z toho důvodu jsme chtěli vyzkoušet analýzu na koloně HILIC. Vybrali jsme typ klasický – silikagel a délkou srovnatelný s použitou C₁₈ kolonou. Testované mobilní fáze jsme připravovali tak, aby neobsahovaly TFA a aby obsah mravenčanu amonného, vzhledem k vysokému obsahu ACN nebyl příliš vysoký. Cílem bylo, aby analýza nebyla příliš dlouhá a byla tak, do budoucna používána rutinně. [58]

ADMA a SDMA byly separovány na koloně HILIC za izokratických a gradientových podmínek a na koloně C₁₈ pouze za izokratických. Byly testovány i různé teploty kolony, různé průtoky a různé objemy dávkování, tak aby byly vybrány nejvhodnější podmínky pro separaci. Pro detekci byl použit trojitý kvadrupól s iontovým zdrojem ESI. Analyty byly ionizovány za vzniku [M+H]⁺ iontů, které byly následně fragmentovány. Pro sledování všech analytů byla použita metoda MRM.

Nejprve byly změřeny specifické hmotnosti jednotlivých látek, po čemž následovalo stanovení retenčních časů samostatných standardů obou analytů. Pro ADMA i SDMA byl prekurzorový iont identický, s hmotou m/z 202,25, což vedlo ke vzniku téměř shodných fragmentových iontů. Tyto se lišily pouze ve dvou charakteristických fragmentech – specifický fragment s m/z 46 byl typický pro ADMA, zatímco fragment s m/z 71,15 byl specifický pro SDMA. Z tohoto důvodu byl ve většině případů prezentován totální iontový proud (TIC), který zobrazoval průběh signálů pro ADMA, SDMA a odpovídající fragmenty m/z 46 a m/z 71,15. [58]

Chromatogramy obou izomerů jsou zobrazeny níže na obrázcích 10 až 46.

SEPARACE NA KOLONĚ ASCENTIS EXPRESS HILIC

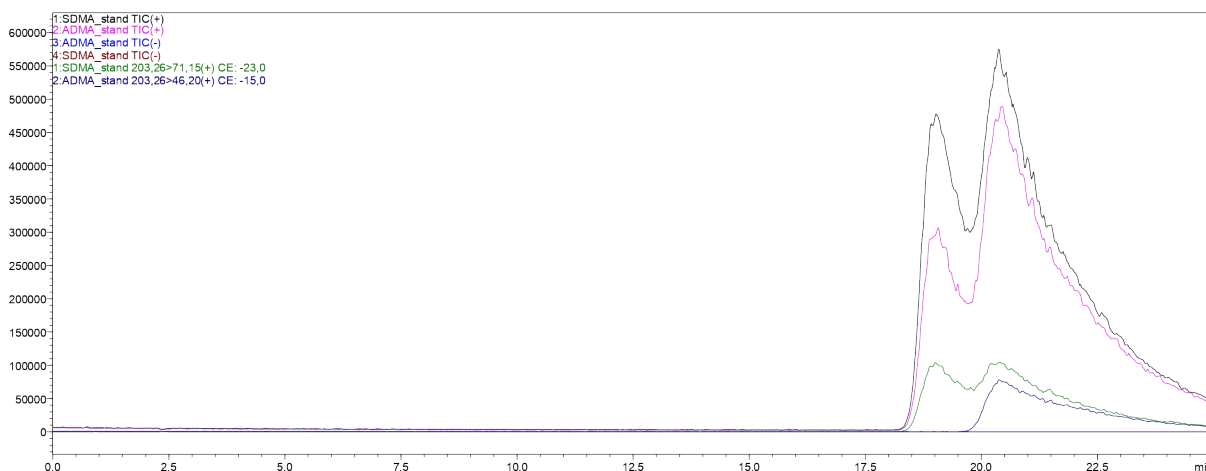
IZOKRATICKÁ ELUCE

Rozdělení podle poměrů ACN a MF:

1. 85 % ACN a 15 % MF

Rozdělení podle MF:

- a. MF A - 0,05 % kyselina mravenčí a 3,8 mM mravenčan amonný; průtok 0,5 ml/min; dávkování 0,2 μ l; teplota kolony 30 °C



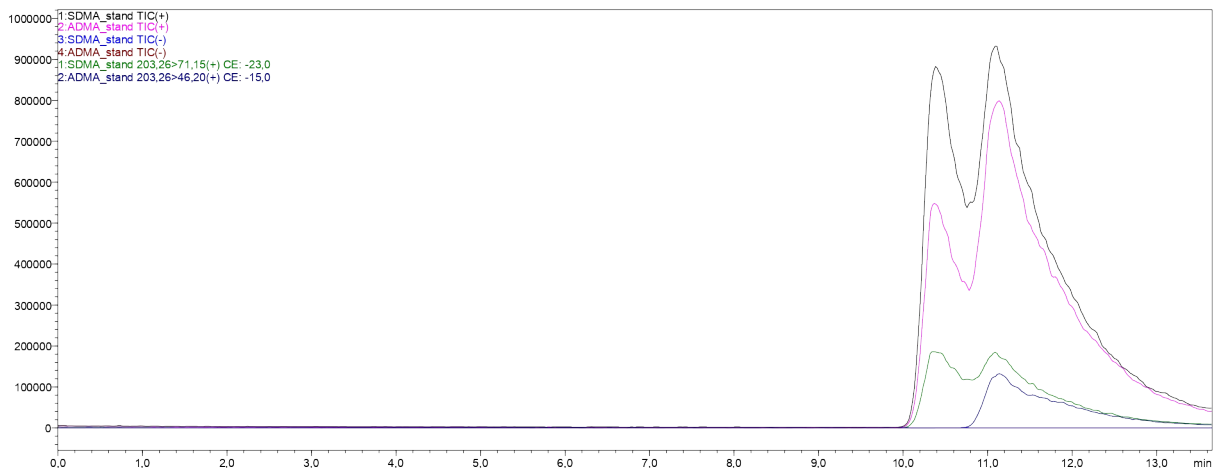
Obrázek 10: Retenční časy ADMA a SDMA při 85 % ACN a 15 % MF A (0,05% kys. mravenčí; 3,8 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C

Jelikož analýza při 85 % ACN probíhala přes 20 minut, píky byly roztřepené, docházelo ke „chvostování“ a separace nebyla ani moc úspěšná, tak jsme chtěli vyzkoušet chování kolony při snížení ACN na 82 % s postupnou úpravou koncentrací mravenčanu amonného a kyseliny mravenčí.

2. 82 % ACN a 18 % MF

Rozdělení podle MF:

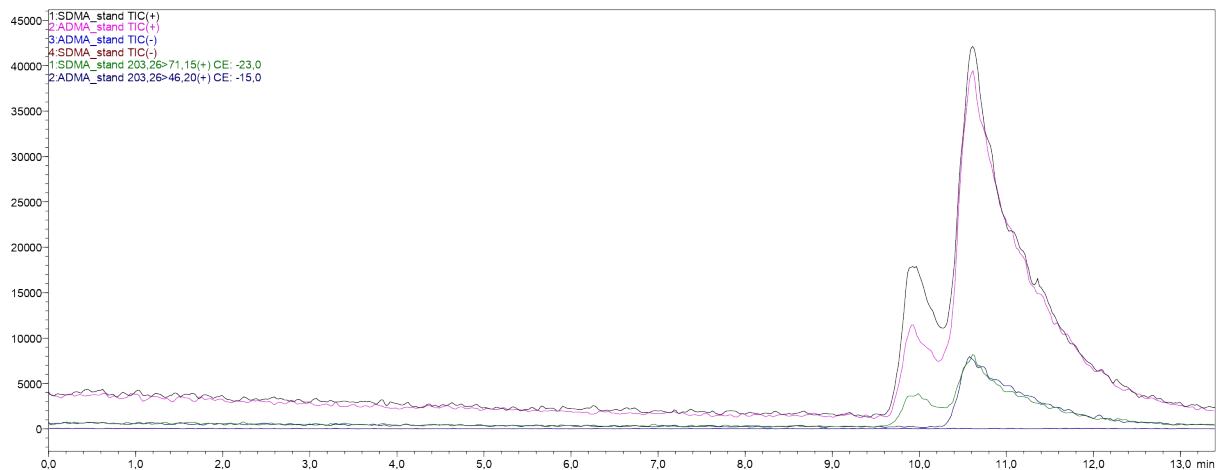
- a. MF B - 0,05 % kyselina mravenčí a 6,0 mM mravenčan amonný; průtok 0,5 ml/min; dávkování 0,2 µl; teplota kolony 30 °C



Obrázek 11: Retenční časy ADMA a SDMA při 82 % ACN a 18 % MF B (0,05% kys. mravenčí; 6 mM mravenčan amonný); průtok 0,05 ml/min; teplota kolony 30 °C

Z obrázku 11 je možné vidět, že došlo ke snížení retenčního času oproti obrázku 10, přestože jsme snížili pouze 3 % ACN. Také došlo k menšímu zlepšení separace a píky nebyly už moc roztřepené, jak na předchozím záznamu. „Chvostování“ zůstalo, proto jsme vyzkoušeli přidat trochu kyseliny mravenčí, která by měla pomoci s rozmyváním.

- b. MF C - 0,1 % kyselina mravenčí a 6,0 mM mravenčan amonný; průtok 0,5 ml/min; dávkování 0,2 µl; teplota kolony 30 °C; standard naředěn ultračistou vodou 50x



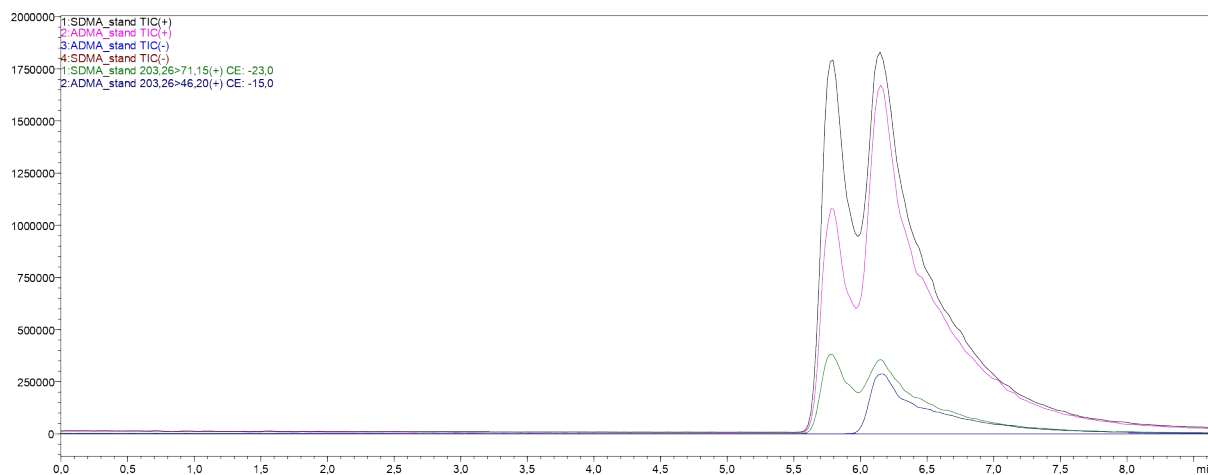
Obrázek 12: Retenční časy ADMA a SDMA při 82 % ACN a 18 % MF B (0,1% kys. mravenčí; 6 mM mravenčan amonný); průtok 0,05 ml/min; teplota kolony 30 °C

Přidání menšího množství kyseliny mravenčí do mobilní fáze částečně pomohlo od „chvostování“, ale zhoršilo to separaci. U tohoto pokusu byl také vzorek standardu naředěn ultračistou vodou 50x, abychom snížili odezvu na detektoru.

3. 80 % ACN a 20 % MF

Rozdělení podle MF:

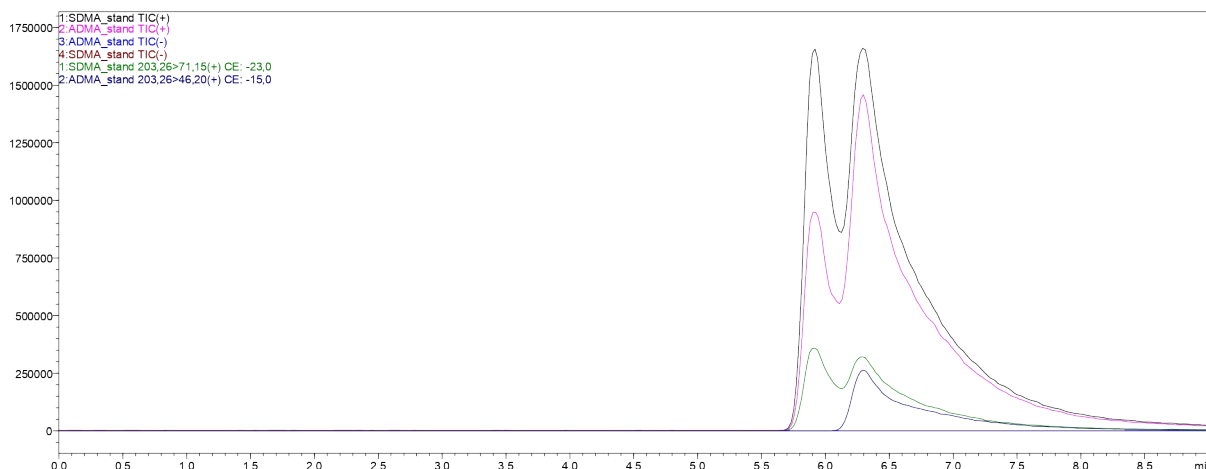
- a. MF A - 0,05% kyselina mravenčí a 3,8 mM mravenčan amonný; průtok 0,5 ml/min; dávkování 0,2 μ l; teplota kolony 30 °C



Obrázek 13: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF A (0,05 % kys. mravenčí; 3,8 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C

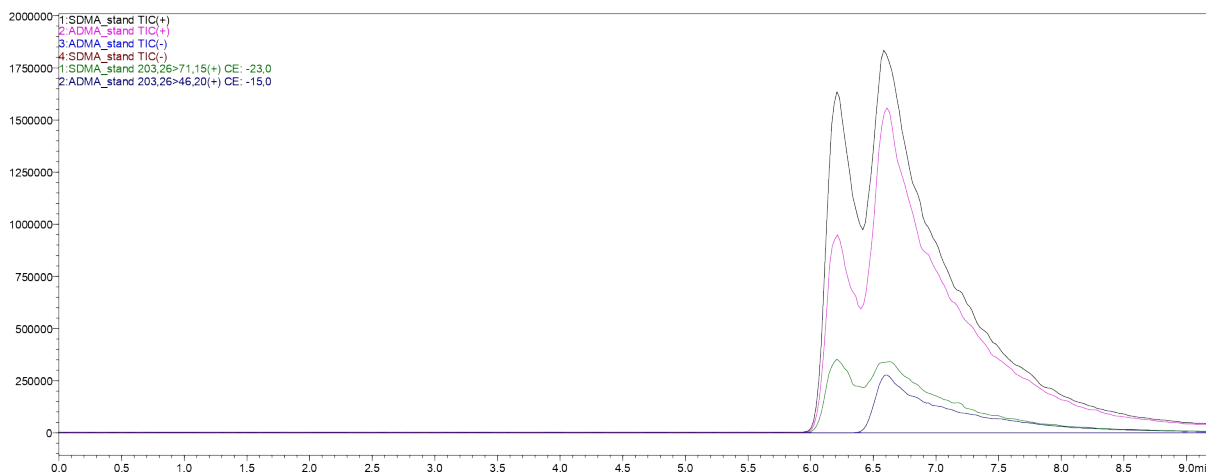
Analýza ukázala, že tento poměr mobilních fází je zatím nejlepší, proto jsme při těchto podmínkách vyzkoušeli, jak velkou roli bude mít na separaci teplota kolony. Obrázky 14 a 15 jsou záznamy při stejném poměru, stejné mobilní fázi A a průtoku jako u obrázku 13, liší se pouze teplotou kolony. Vyzkoušeli jsme teplotu analýzy snížit na 25 °C a zvýšit na teplotu 37 °C.

- MF A - 0,05% kyselina mravenčí a 3,8 mM mravenčan amonný; průtok 0,5 ml/min; dávkování 0,2 µl; teplota kolony 25 °C



Obrázek 14: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF A (0,05% kys. mravenčí; 3,8 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 25 °C

- MF A - 0,05% kyselina mravenčí a 3,8 mM mravenčan amonný; průtok 0,5 ml/min; dávkování 0,2 µl; teplota kolony 37 °C

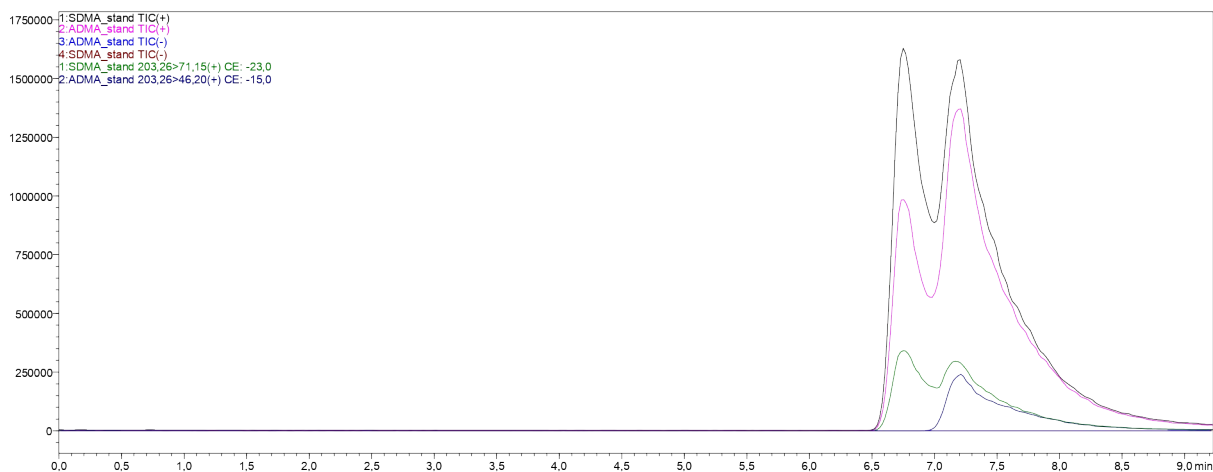


Obrázek 15: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF A (0,05% kys. mravenčí; 3,8 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 37 °C

Zjistili jsme, že teplota nemá velkou roli na separaci. Záznamy při 30 a 25 °C byly téměř identické. U teploty 37 °C se pouze změnil čas retence. Takže nebylo potřeba pro další analýzy měnit teplotu, nechali jsme ji na původních 30 °C.

V následných analýzách jsme tak upravovali mobilní fáze buď zvýšením nebo snížením koncentrace mravenčanu amonného či procent kyseliny mravenčí.

- b.** MF B - 0,05% kyselina mravenčí a 6,0 mM mravenčan amonný; průtok 0,5 ml/min; dávkování 0,2 µl; teplota kolony 30 °C

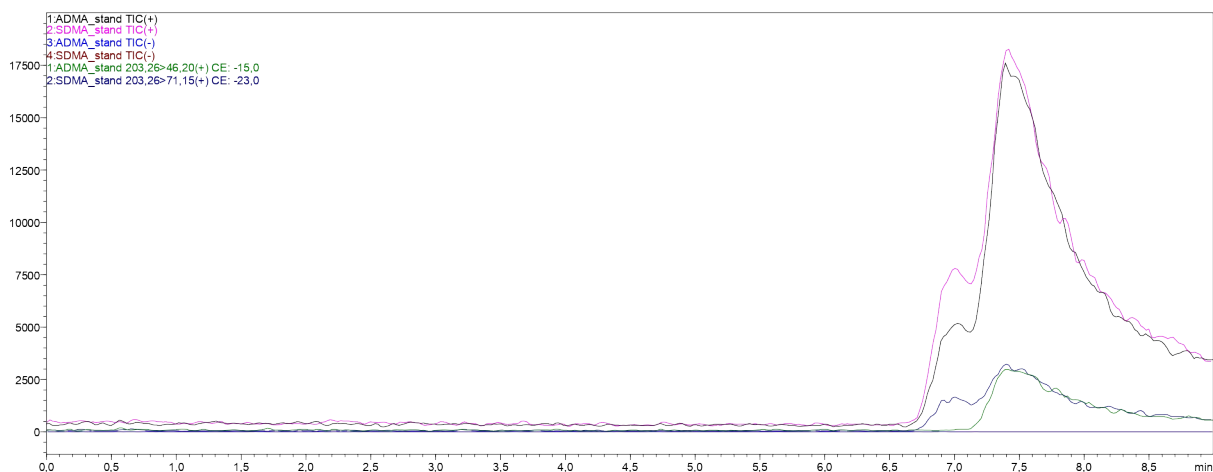


Obrázek 16: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF B (0,05% kys. mravenčí; 6,0 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C

Přidání o 2,2 mM mravenčanu amonného posunulo retenční čas o pár minut a „chvostování“ se po přidavku zmenšilo.

Při následném zředění standardu s ultračistou vodou, a to 50x se změnila intenzita signálu a plochy píků, i přesto, že podmínky byly úplně stejné, jak u obrázku 16.

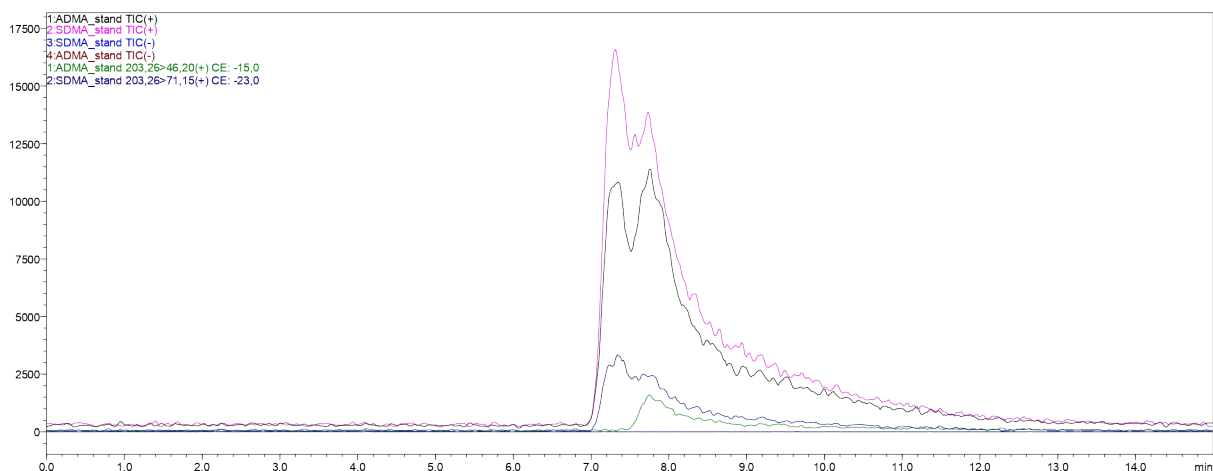
- Standard ředěn ultračistou vodou 50x



Obrázek 17: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF B (0,05% kys. mravenčí; 6,0 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; ředěný standard 50x

Při tomto poměru a mobilní fázi jsme standard ředili kromě vodou, tak i směsí acetonitril/voda (80:20), abychom se tak co nejvíce přizpůsobili podmínkám v mobilní fázi.

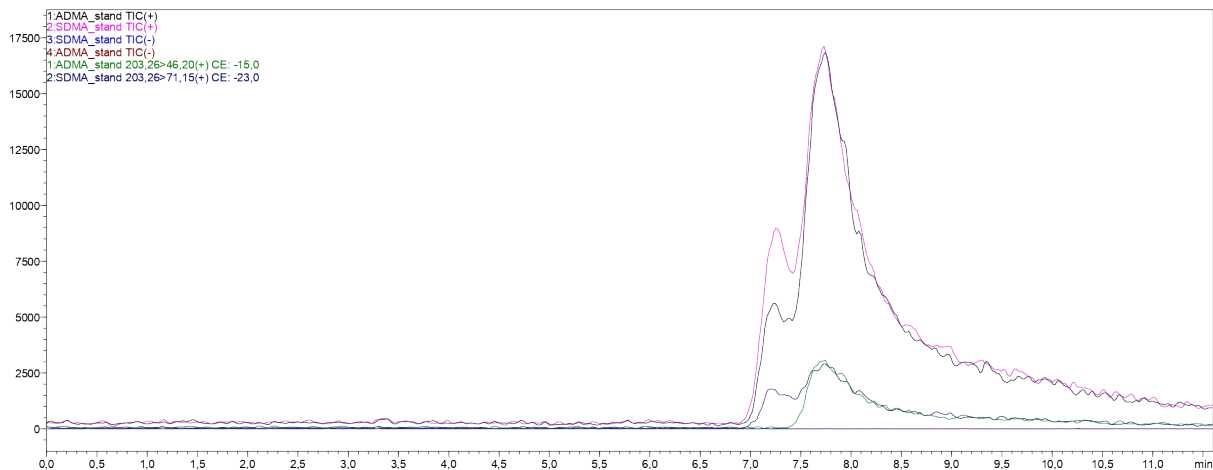
- Standard naředěn ultračistou vodou 50x



Obrázek 18: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF B (0,05% kys. mravenčí; 6,0 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard s vodou

Analýza na obrázku 18 probíhala za stejných podmínek jako analýza na obrázku 17, lišila se pouze dnem provedení. Přestože příprava vzorku i nastavení přístroje zůstaly beze změny, záznam na obrázku 18 vykazuje odlišnosti oproti obrázku 17. Tyto rozdíly naznačují, že měření není zcela opakovatelné.

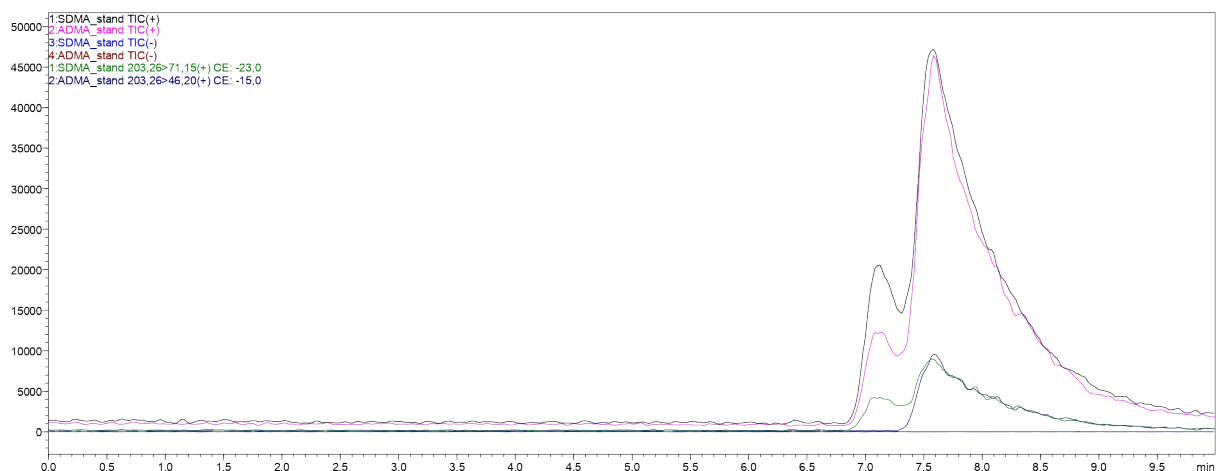
- Standard naředěn směsí acetonitrilu/vody (80:20) 50x



Obrázek 19: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF B (0,05% kys. mravenčí; 6,0 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard s acetonitril/voda (80:20)

Tento způsob přípravy standardu se lépe projeví až u poměru mobilních fází 75:25 na obrázku 29.

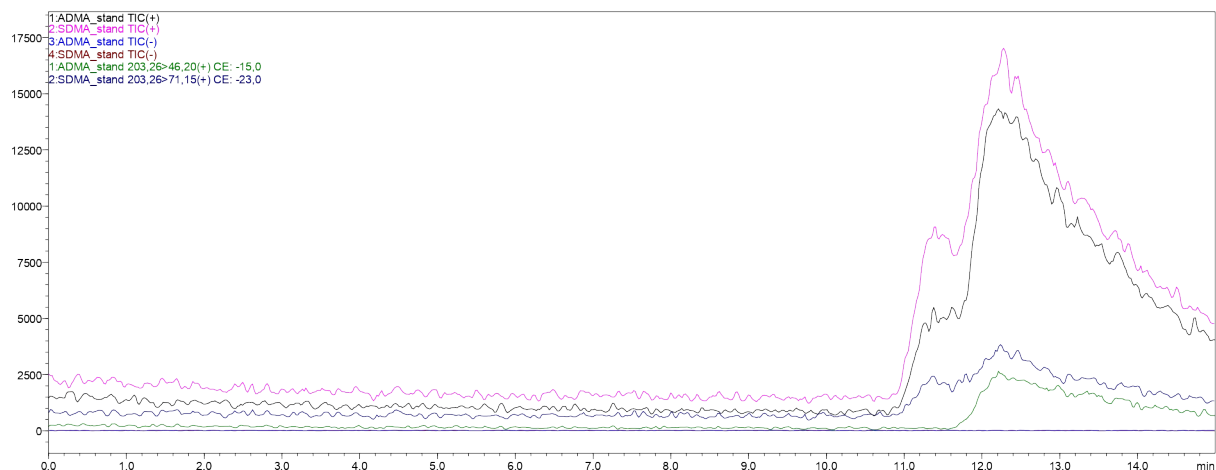
- c. MF C - 0,1% kyselina mravenčí a 6 mM mravenčan amonný; průtok 0,5 ml/min; dávkování 0,2 µl; teplota kolony 30 °C
- Standard naředěn ultračistou vodou 50x



Obrázek 20: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF C (0,1% kys. mravenčí; 6,0 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard naředěn 50x

Po přidání malého objemu kyseliny mravenčí se oproti záznamu na obrázku 17 mírně zlepšil. Ale velký vliv přidání kyseliny na separaci nemělo.

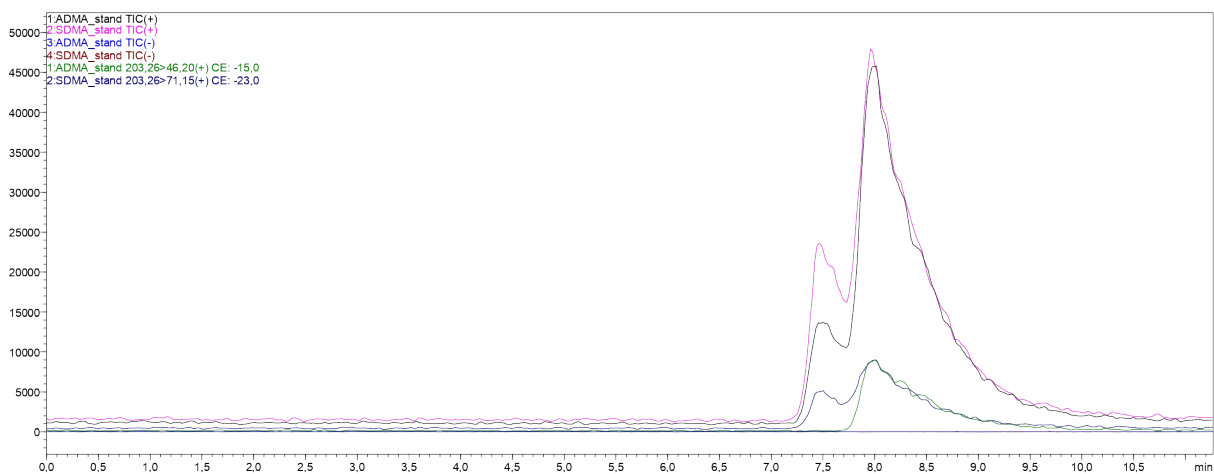
- d. MF D - 3,8 mM mravenčan amonný; průtok 0,5 ml/min; dávkování 0,2 µl; teplota kolony 30 °C
- Standard naředěn ultračistou vodou 50x



Obrázek 21: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF D (3,8 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard naředěn 50x

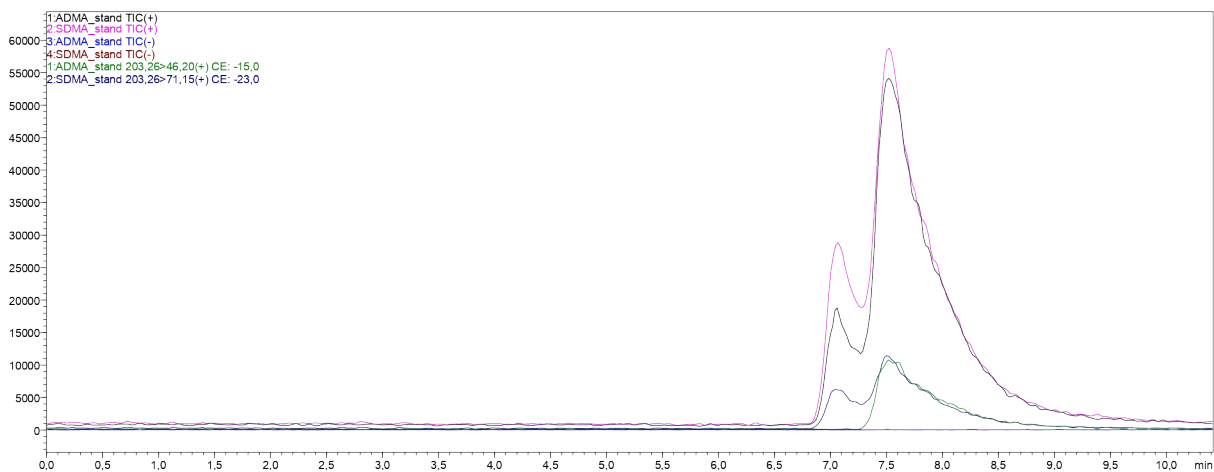
Bez přidavku kyseliny mravenčí v mobilní fázi došlo k roztřepení celého záznamu a prodloužení analýzy. Separace také nebyla optimální.

- e. MF E - 0,05% kyselina mravenčí a 10 mM mravenčan amonný; průtok 0,5 ml/min;
dávkování 0,2 µl; teplota kolony 30 °C
- Standard naředěn ultračistou vodou 50x



Obrázek 22: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF D (0,05% kys. mravenčí; 10 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard naředěn 50x

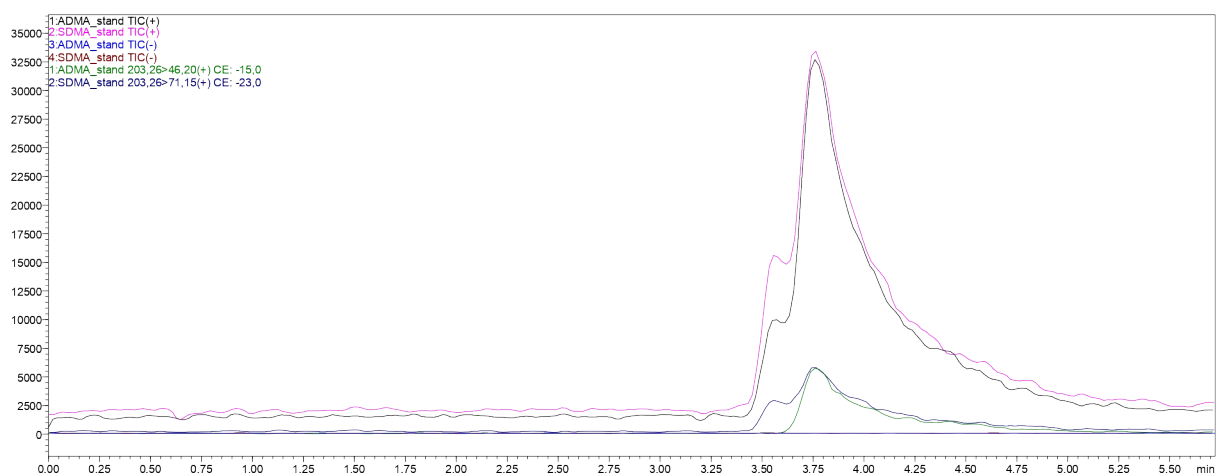
- f. MF F - 0,1% kyselina mravenčí a 10 mM mravenčan amonný; průtok 0,5 ml/min;
dávkování 0,2 µl; teplota kolony 30 °C
- Standard naředěn ultračistou vodou 50x



Obrázek 23: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF F (0,1% kys. mravenčí; 10 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard naředěn 50x

Zvýšením mravenčanu amonného až na 10 mM nemělo vliv na záznamy, a tak tyto záznamy byly velmi podobné záznamům při koncentraci 6 mM.

- g.** MF G - 0,01% kyselina mravenčí a 1,2 mM mravenčan amonný; průtok 0,5 ml/min;
dávkování 0,2 µl; teplota kolony 30 °C
- Standard naředěn ultračistou vodou 50x



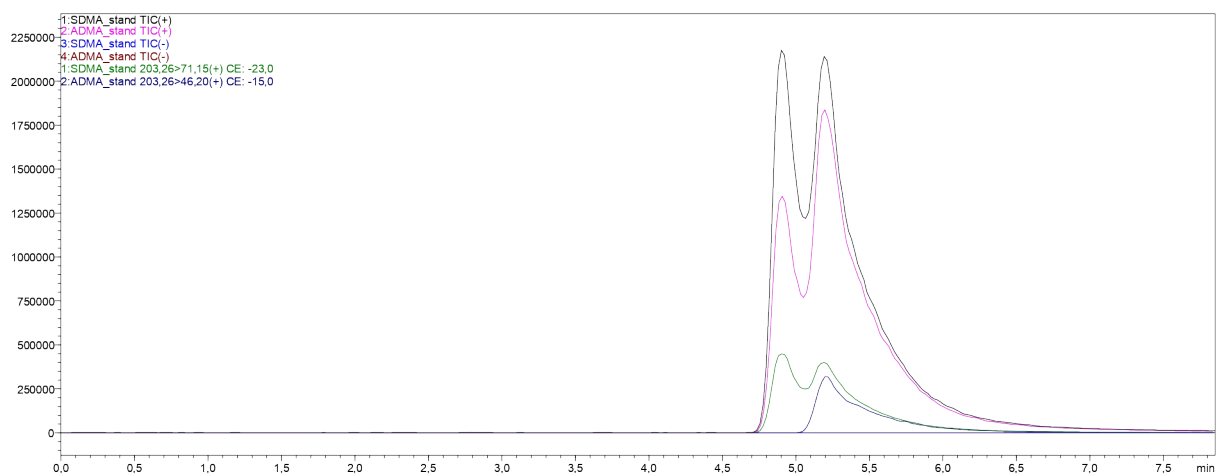
Obrázek 24: Retenční časy ADMA a SDMA při 80 % ACN a 20 % MF G (0,01% kys. mravenčí; 1,2 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard naředěn 50x

Ani snížení kyseliny mravenčí a mravenčanu amonného nebylo pro separaci ideální. A proto nejideálnějšími podmínky při tomto poměru 80:20 byly pravděpodobně 0,1% kyseliny mravenčí a 6 mM mravenčanu amonného.

Pozorovali jsme, že po naředění vzorku 50x ať už ultračistou vodou či směsí acetonitril/voda u obrázků 19 až 24 se nám dva píky spojily téměř do jednoho píku.

4. 78 % ACN a 22 % MF

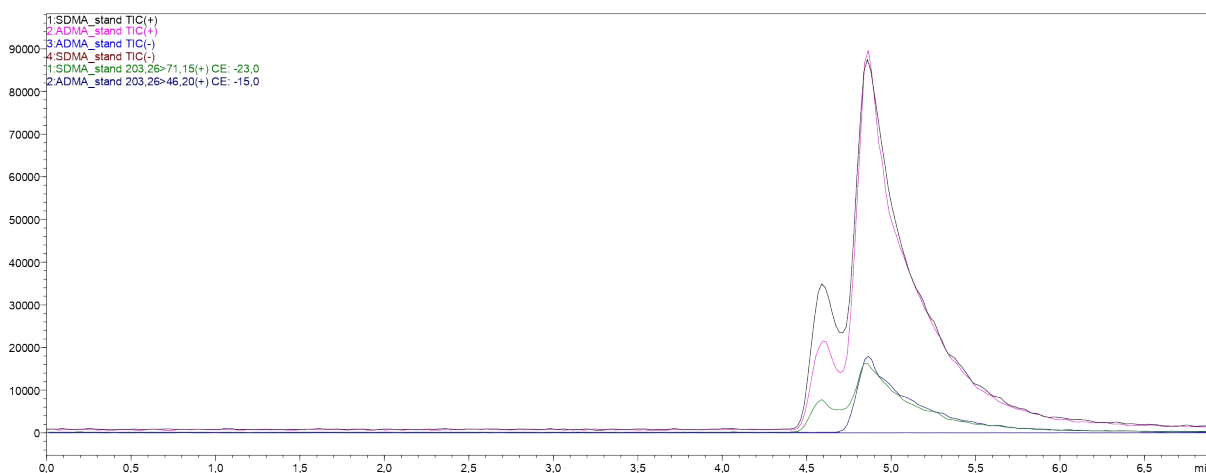
- a.** MF B - 0,05% kyselina mravenčí a 6 mM mravenčan amonný; průtok 0,5 ml/min;
dávkování 0,2 µl; teplota kolony 30 °C



Obrázek 25: Retenční časy ADMA a SDMA při 78 % ACN a 22 % MF B (0,05% kys. mravenčí; 6 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C

Záznam na obrázku 25 byl velmi podobný záznamu 16, za stejných podmínek jen při jiném poměru 80:20. Rozdíl mezi nimi je, že doba analýzy se zkrátila, ale separace se mírně zhoršila při poměru 78:12.

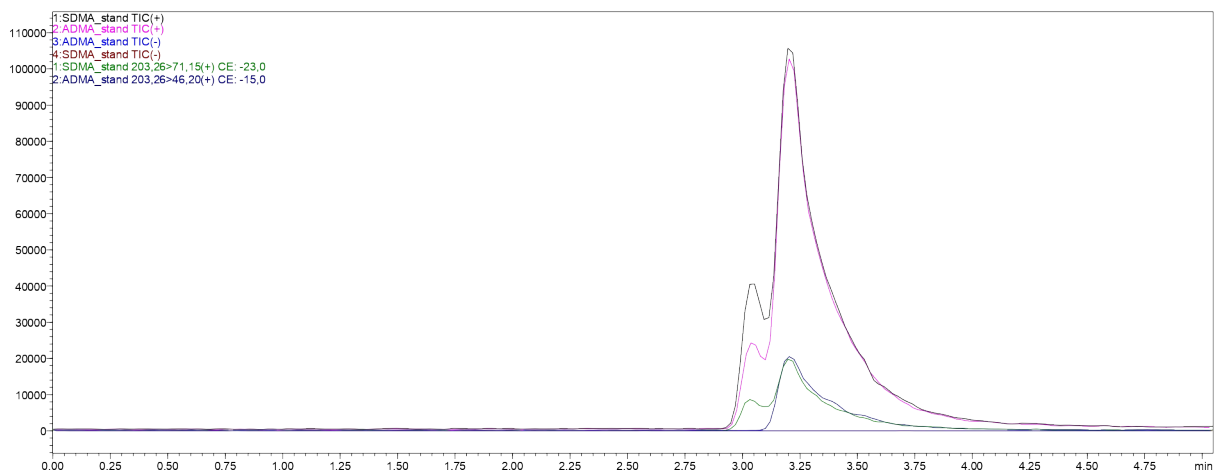
- b.** MF C - 0,1% kyselina mravenčí a 6 mM mravenčan amonný; průtok 0,5 ml/min; dávkování 0,2 µl; teplota kolony 30 °C
- Standard naředěn ultračistou vodou 50x



Obrázek 26: Retenční časy ADMA a SDMA při 78 % ACN a 22 % MF B (0,1% kys. mravenčí; 6 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard naředěn 50x

75 % ACN a 25 % MF

- a.** MF C - 0,1% kyselina mravenčí a 6 mM mravenčan amonný; průtok 0,5 ml/min; dávkování 0,2 µl; teplota kolony 30 °C
- Standard naředěn ultračistou vodou 50x

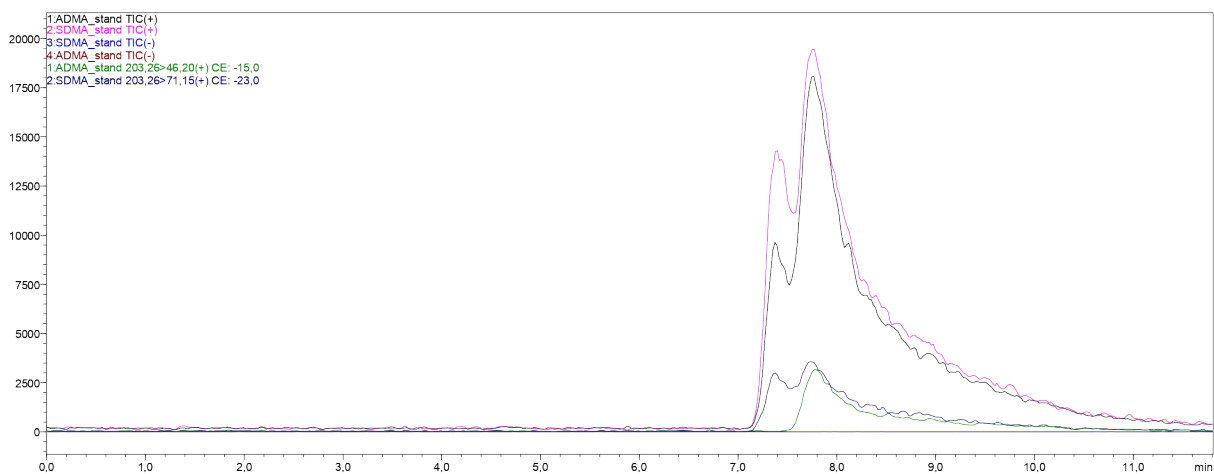


Obrázek 27: Retenční časy ADMA a SDMA při 75 % ACN a 25 % MF B (0,1% kys. mravenčí; 6 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard naředěn 50x

Snížením poměru na 75 % ACN došlo ke snížení času analýzy skoro o polovinu oproti 80 % ACN.

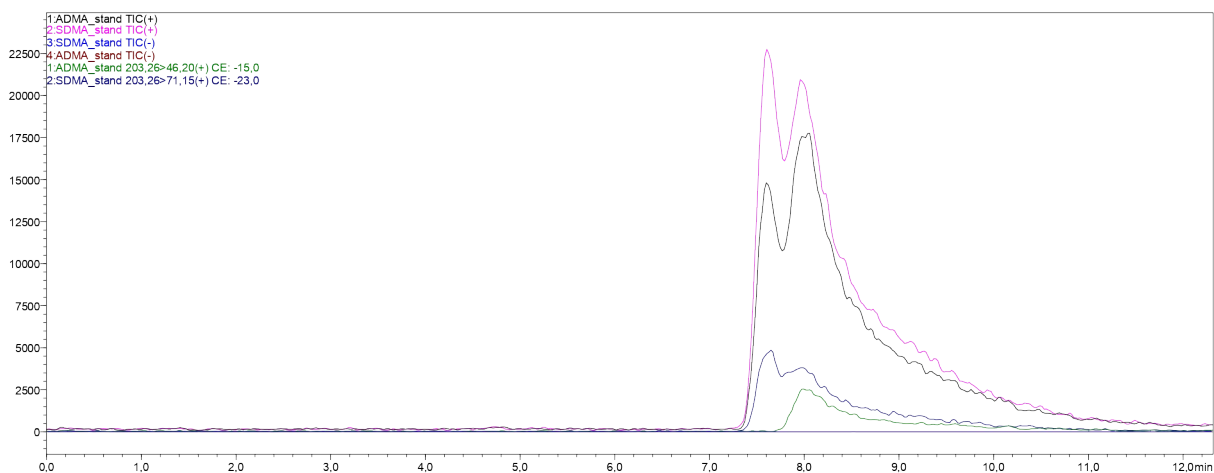
b. MF B – 0,05% kyselina mravenčí a 6 mM mravenčan amonný; průtok 0,5 ml/min;
dávkování 0,2 µl; teplota kolony 30 °C

- Standard naředěn ultračistou vodou 50x



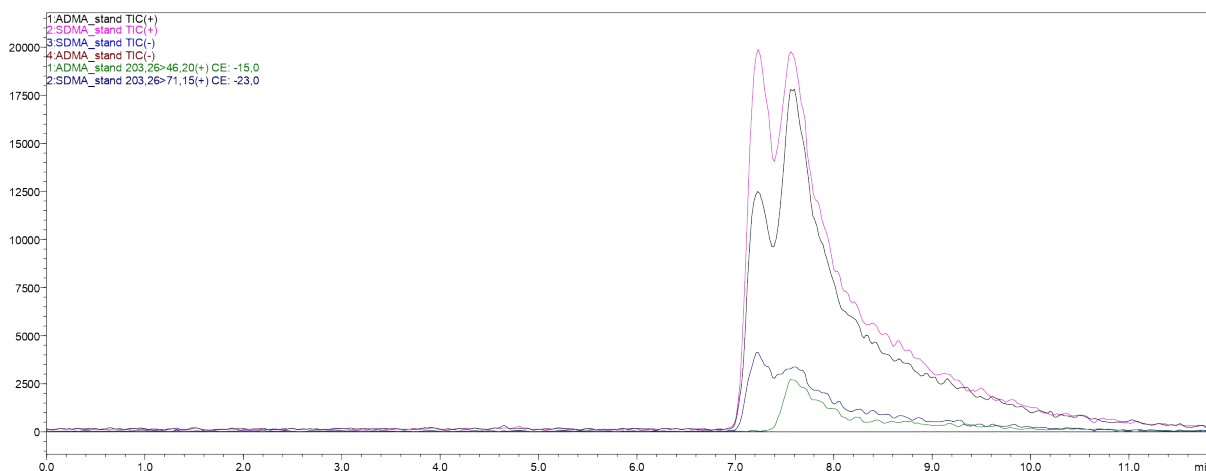
Obrázek 28: Retenční časy ADMA a SDMA při 75 % ACN a 25 % MF B (0,05% kys. mravenčí; 6,0 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard s vodou

- Standard naředěn směsí acetonitrilu/vody (80:20) 50x



Obrázek 29: Retenční časy ADMA a SDMA při 75 % ACN a 25 % MF B (0,05% kys. mravenčí; 6,0 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard s acetonitril/voda (80:20)

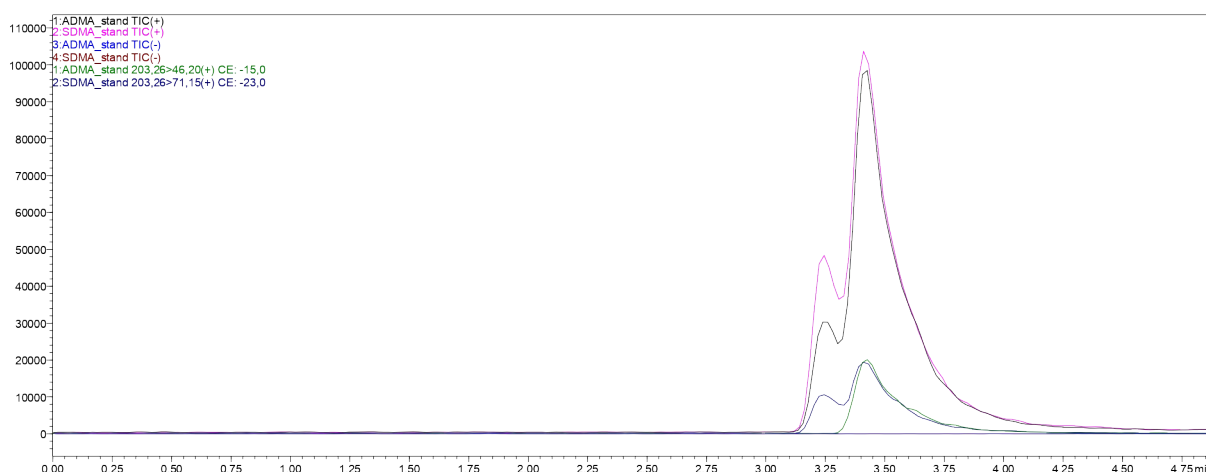
- Standard naředěn směsí acetonitrilu/vody (50:50) 50X



Obrázek 30: Retenční časy ADMA a SDMA při 75 % ACN a 25 % MF B (0,05% kys. mravenčí; 6,0 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard s acetonitril/voda (50:50)

- c. MF F – 0,1% kyselina mravenčí a 10 mM mravenčan amonný; průtok 0,5 ml/min; dávkování 0,2 µl; teplota kolony 30 °C

- Standard naředěn ultračistou vodou 50x



Obrázek 31: Retenční časy ADMA a SDMA při 75 % ACN a 25 % MF B (0,1% kys. mravenčí; 10 mM mravenčan amonný); průtok 0,5 ml/min; teplota kolony 30 °C; standard naředěn 50x

Izokratická separace standardů se nám nezdařila, přestože jsme vyzkoušeli různé poměry acetonitrilu a vodné fáze, různé koncentrace mravenčanu amonného i koncentrace kyseliny mravenčí. Bylo zřejmé, že k separaci by došlo až při velmi dlouhé analýze.

Zjistili jsme, že teplota kolony separaci ovlivňovala minimálně, za to velký vliv mělo ředění standardů. Konkrétně složení roztoků, kterými jsme standardy ředili – vodou a směsí acetonitril/voda v různých poměrech, což se u separace na HILIC se projevuje výrazněji, což zmiňují i v publikaci Nováková a kolektiv. U standardů ředěných směsí acetonitril/voda, bylo pozorována lepší separace než při ředění vodou. [52]

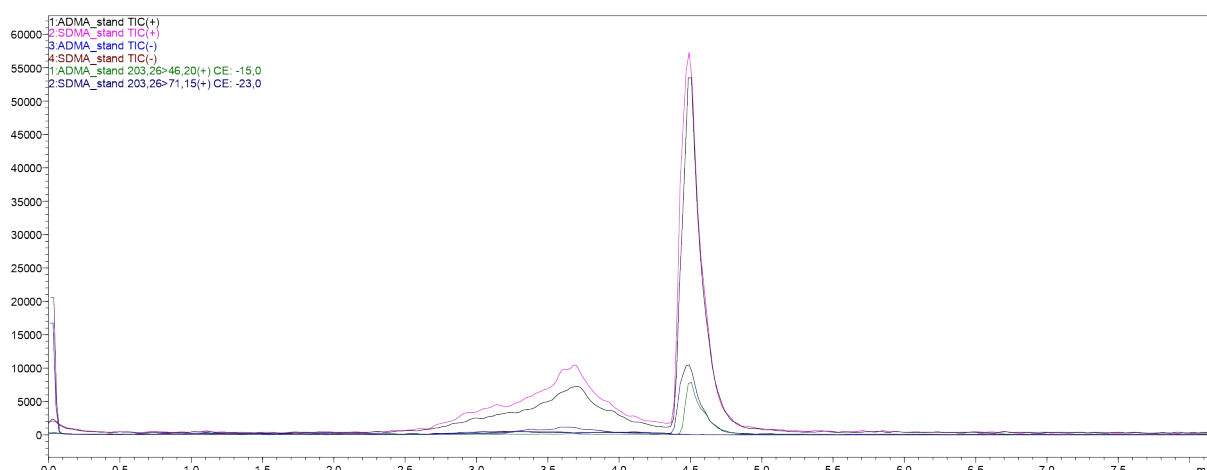
Když se nám podařilo získat podmínky, při kterých už byla naznačena začínající separace píků, nepodařilo se nám tento výsledek zopakovat. Problémem byly také proplachy. Před začátkem měření první směsi standardů byl nutný dlouhý proplach, aby byl záznam reprodukovatelný, a také byl potřeba dlouhý proplach i mezi analýzami, což byl rozdíl oproti kolony C₁₈, kde byl proplach kratší. Proplach u první analýzy dne byl zhruba 45 minut dlouhý, mezi jednotlivými analýzami trval proplach zhruba 15-30 minut, což je typické pro HILIC.

Prokázalo se, že výhodou této metody bylo, že se jevila jako vysoce citlivá.

GRADIENTOVÁ ELUCE

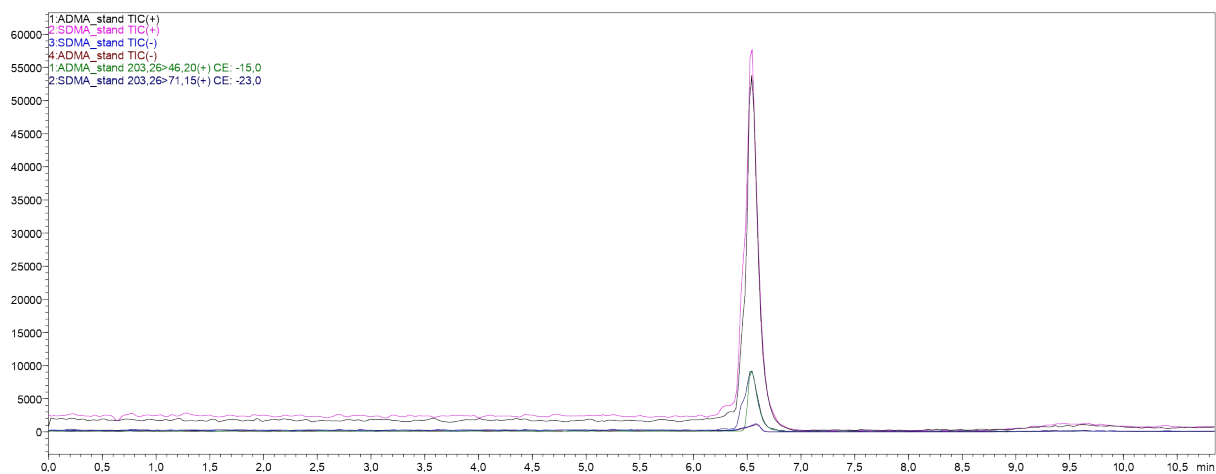
Gradientové eluce byly prováděny mobilní fází H v kombinaci buď s acetonitrilem, nebo s mobilní fází G. U všech gradientových elucí byl průtok 0,5 ml/min a dávkování 0,2 µl. Teplota kolony byla 30 °C u všech analýz. Standard byl naředěn ultračistou vodou 50x.

- **Gradient 1** probíhal následovně: na počátku bylo 90 % MF G a během 7 minut kleslo na 30 %; následně během 2 minut na 5,5 %, při tomto poměru se to drželo 1 minutu a během 2 minut dostalo zpět na 90 % MF G



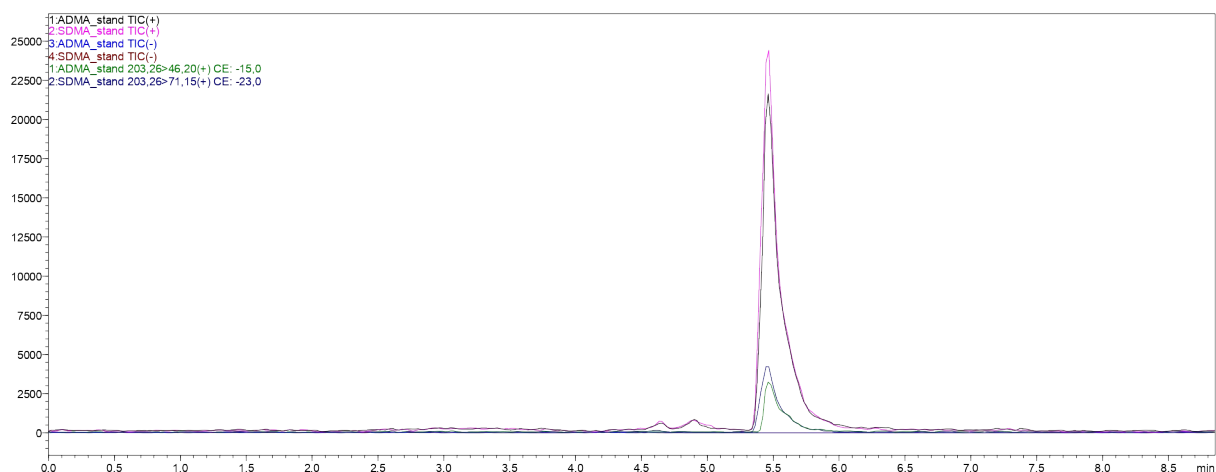
Obrázek 32: Gradientová eluce 1 (1,2 mM mravenčan amonný, 0,01% kys. mravenčí ve vodě a v acetonitrilu)

- **Gradient 2** probíhal následovně: na počátku bylo 85 % ACN (15 % MF H) a během 5 minut kleslo na 10 %, na tomto poměru se to drželo 2 minutu a během 2 minut dostalo zpět na 85 % ACN



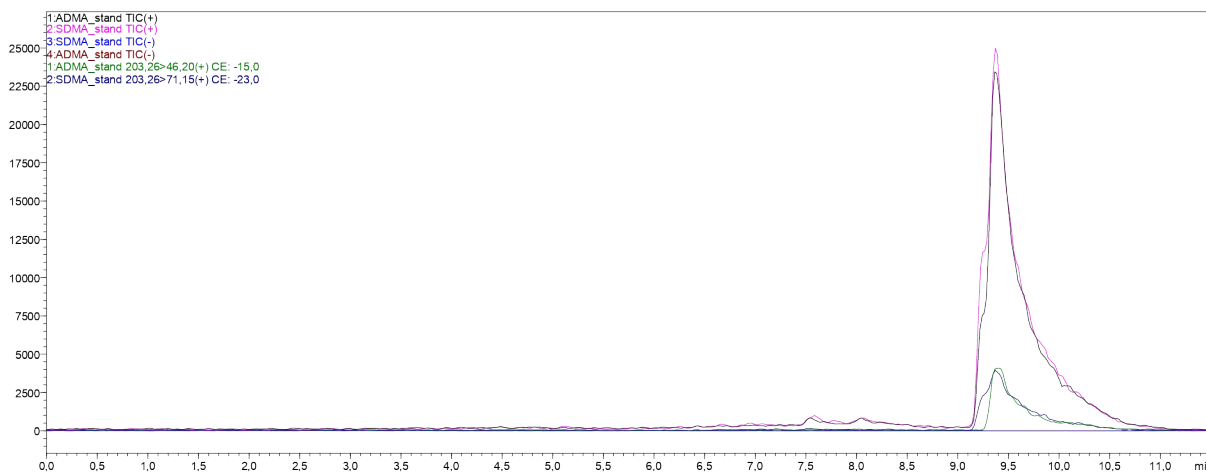
Obrázek 33: Gradientová eluce 2 (1,2 mM mravenčan amonný, 0,01% kyselina mravenčí ve vodě; acetonitril)

- **Gradient 3** probíhal následovně: na počátku bylo 95 % ACN a během 5 minut kleslo na 50 %; během 0,5 minuty se ACN dostal zpět na 95 %



Obrázek 34: Gradientová eluce 3 (1,2 mM mravenčan amonný, 0,01% kyselina mravenčí ve vodě; acetonitril)

- **Gradient 4** probíhal následovně: na počátku bylo 95 % ACN a během 5 minut kleslo na 80 %; během 2 minut se ACN dostal na 70 % a následně během 2 minut zpět na 95 % ACN



Obrázek 35: Gradientová eluce 4 (1,2 mM mravenčan amonný, 0,01% kyselina mravenčí ve vodě; acetonitril)

Vyzkoušeli jsme různé typy gradientů mezi, než patřil i typický gradient pro HILIC. Dále jsme vyzkoušeli i „agresivnější“ metody, kdy docházelo k velkému snížení a opětovnému zvýšení procent ACN. K úspěšné separaci nedošlo ani během „mírnější“ změny procent ACN.

Protože separace nebyla dobrá v případě izokratické ani gradientové eluce a jelikož se analýzy zdály dlouhé, pro další pokusy jsme upřednostnili analýzu na C₁₈ s tím, že do budoucna si tedy kolona HILIC žádá podrobnější optimalizaci a hlubší pochopení retenčních mechanismů.

Porovnání s jinými publikacemi je složitější z důvodu, že autoři často používali TFA, které jsme se chtěli vyhnout pro její možné snižování signálu.

SEPARACE NA KOLONĚ ARION® Polar C₁₈

IZOKRATICKÁ ELUCE

Chromatografické podmínky na této koloně pro standardy byly zjištěny již v diplomové práci Dominika Nováka, proto jsme se věnovali reálným vzorkům.

Podmínky určené v předchozí diplomové práci byly za použití mobilní fáze I (ultračistá voda s 20 mM mravenčanem amonným a 0,1% kyselina mravenčí), teploty kolony 25 °C. Upravili jsme pouze průtok na 0,25 ml/min, abychom vylepšili opakovatelnost metody při přípravě nové mobilní fáze. Vyzkoušeli jsme také jaký vliv bude mít na analýzu objem dávkování. [58]

Do systému byl zařazen přepínací ventil, který umožnil oddělit část eluátu přicházejícího z chromatografické kolony před vstupem do detektoru. Tento krok měl klíčový význam pro ochranu hmotnostního spektrometru před kontaminací nechtěnými složkami

vzorku, zejména v počáteční fázi eluce, kdy z kolony vychází vysoká koncentrace solí, aditiv nebo nerozpuštěných zbytků z matrice. Z praktického hlediska tedy přepínací ventil přispěl ke zvýšení životnosti přístroje, zajištění vyšší stability signálu a snížení potřeby údržby.

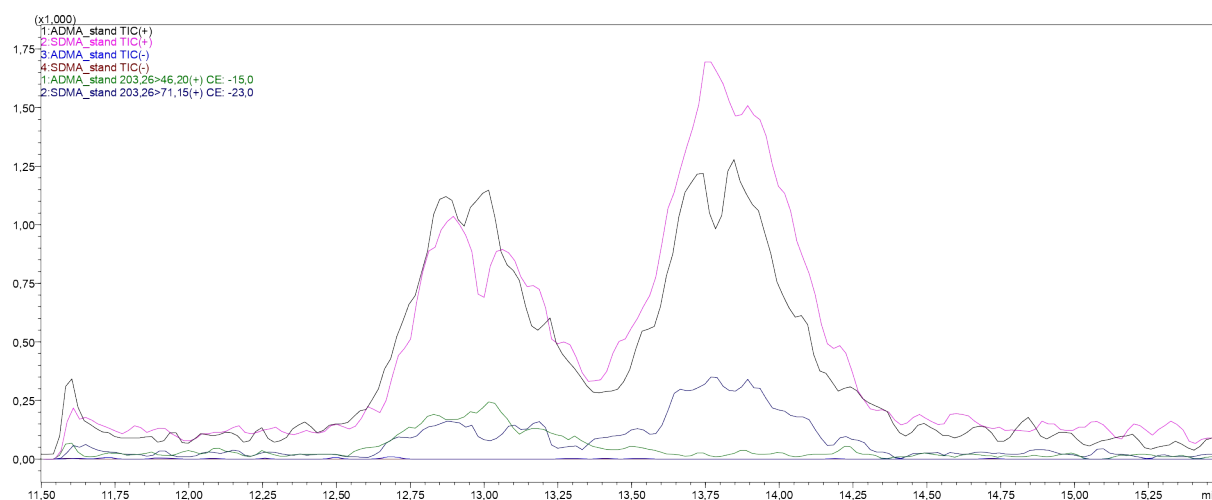
Po zjištění retenčních časů pro ADMA a SDMA, jsme nastavili časy pro přepínání ventilů. Prvních 11,5 minut šel eluát do odpadu, následně došlo k přepnutí ventilu a eluát tak šel na kolonu. Když bylo možné analýzu vypnout, šla mobilní fáze i se zbytky z kolony do odpadu.

Jelikož jsme nechtěli přehlcovat kolonu, kladli jsme velký důraz na deproteinaci. Nakonec jsme se rozhodli pro přípravu vzorku s velkým nadbytkem deproteinačního činidla – ACN. Odebraný objem, který jsme odpařili nebyl tak velký, aby při postupu došlo k velkému zakoncentrování vzorku (nabrání minima proteinů), ale chtěli jsme dávkovat odparek po rozpuštění ve vodě, vzhledem ke složení mobilní fáze.

1. STANDARDY

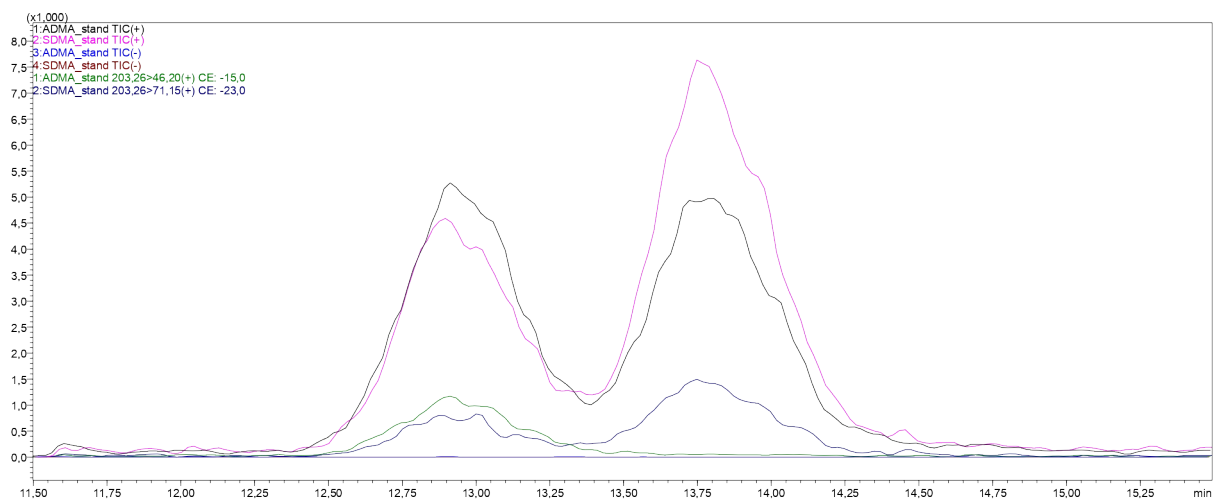
Rozdělení podle dávkování:

- a. dávkování 0,2 μ l; - MF I; průtok 0,25 ml/min; teplota kolony 25 °C; ředěno ultračistou vodou 50x



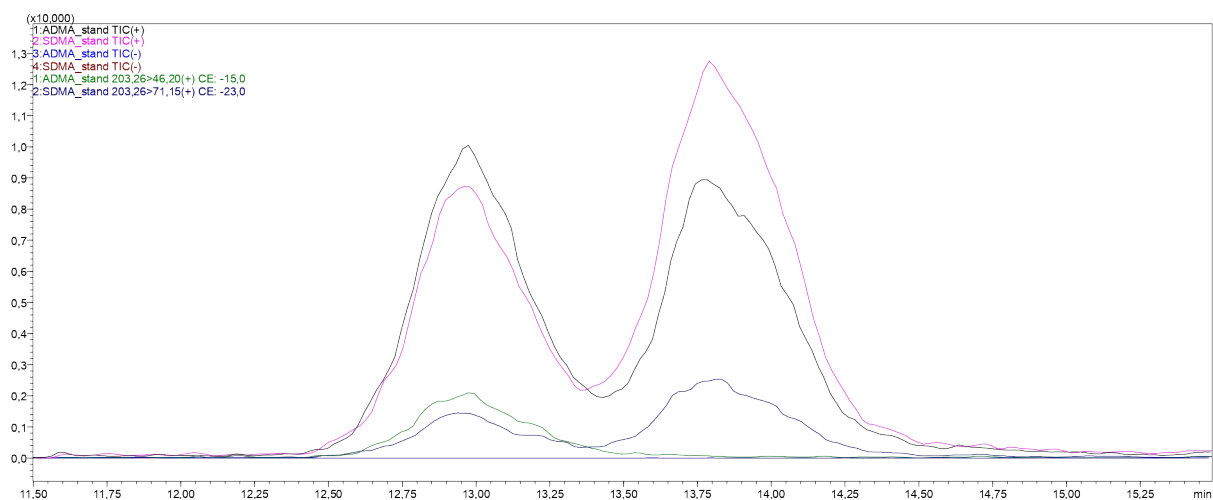
Obrázek 36: Retenční časy ADMA a SDMA ve standardu (dávkování 0,2 μ l)

b. dávkování 1 μl ; - MF I; průtok 0,25 ml/min; teplota kolony 25 °C; ředěno ultračistou vodou 50x



Obrázek 37: Retenční časy ADMA a SDMA ve standardu (dávkování 1 μl)

c. dávkování 2 μl ; - MF I; průtok 0,25 ml/min; teplota kolony 25 °C; ředěno ultračistou vodou 50x



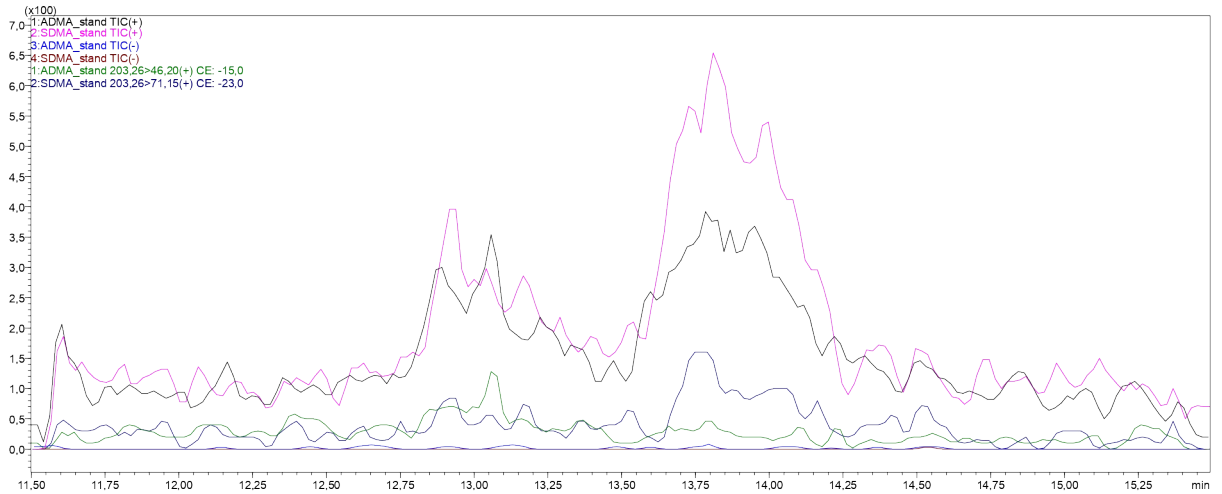
Obrázek 38: Retenční časy ADMA a SDMA ve standardu (dávkování 2 μl)

Rozdělení podle přidavku:

2. VZOREK BEZ PŘÍDAVKU STANDARDU

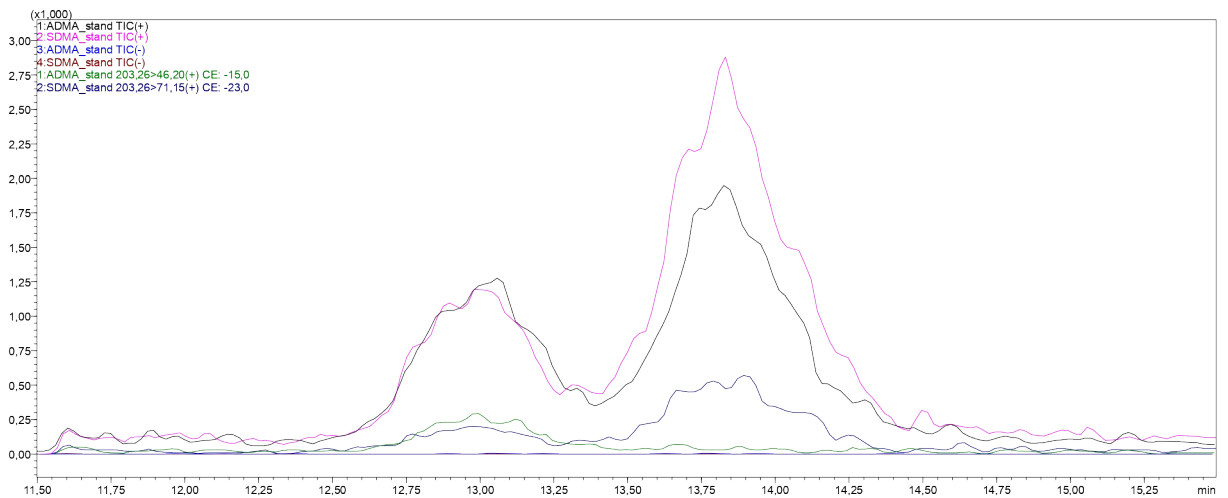
Rozdělení podle dávkování:

a. dávkování 0,2 μ l; - MF I; průtok 0,25 ml/min; teplota kolony 25 °C



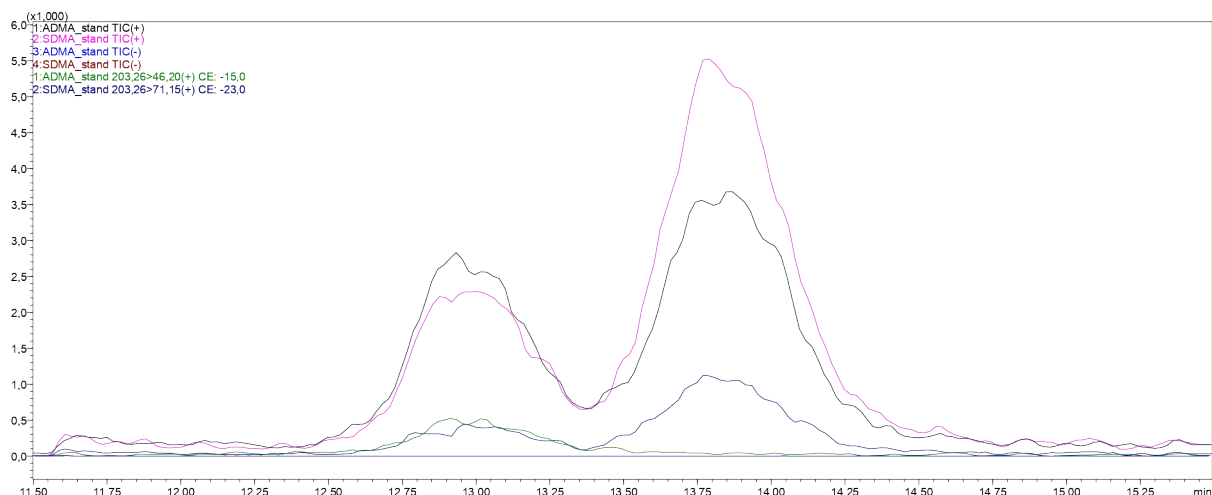
Obrázek 39: Retenční časy ADMA a SDMA ve vzorku (dávkování 0,2 μ l)

b. dávkování 1 μ l; - MF I; průtok 0,25 ml/min; teplota kolony 25 °C



Obrázek 40: Retenční časy ADMA a SDMA ve vzorku (dávkování 1 μ l)

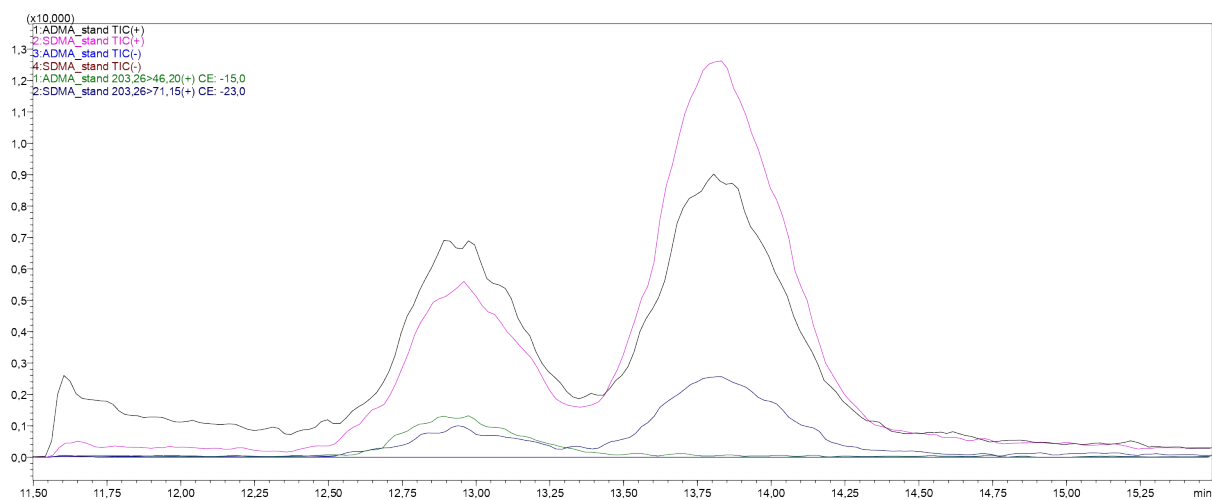
c. dávkování 2 μ l; - MF I; průtok 0,25 ml/min; teplota kolony 25 °C



Obrázek 41: Retenční časy ADMA a SDMA ve vzorku (dávkování 2 μ l)

U analýzy standardů byla zjištěna neoptimálnější objem dávkování a to bylo 2 μ l. Ale jelikož odezva ve vzorku byla při stejném dávkovaném množství nižší vyzkoušeli jsme tak i dávkování 5 μ l. Porovnání mezi záznamy standardu a vzorku je ale možné jen částečně, protože standardy byly pouze naředěny, zatímco u vzorků došlo k úplné úpravě.

d. dávkování 5 μ l; - MF I; průtok 0,25 ml/min; teplota kolony 25 °C

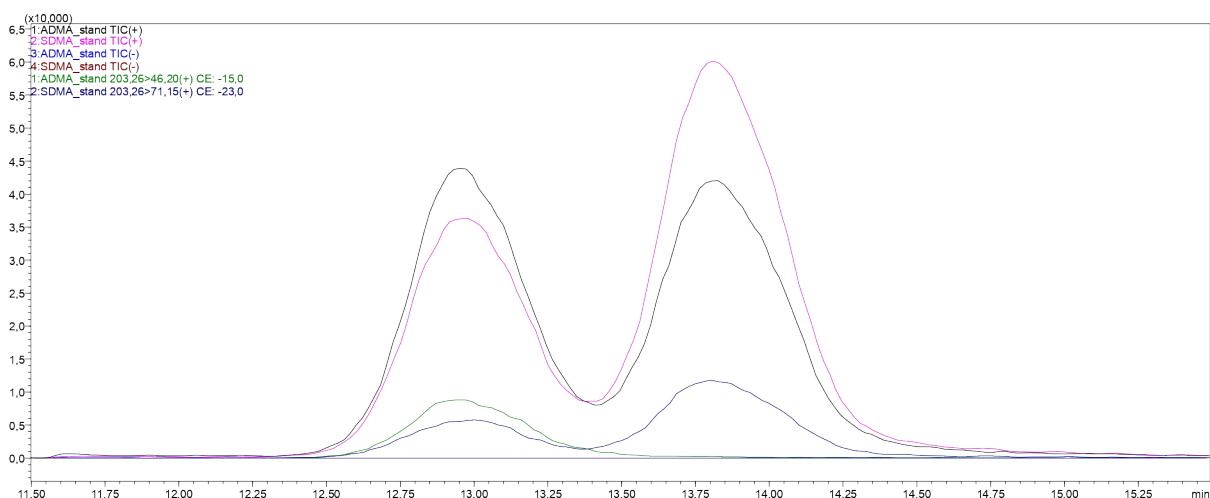


Obrázek 42: Retenční časy ADMA a SDMA ve vzorku (dávkování 5 μ l)

3. VZOREK S PŘÍDAVKEM STANDARDU

Rozdělení podle dávkování:

a. dávkování 2 μ l; - MF I; průtok 0,25 ml/min; teplota kolony 25 °C



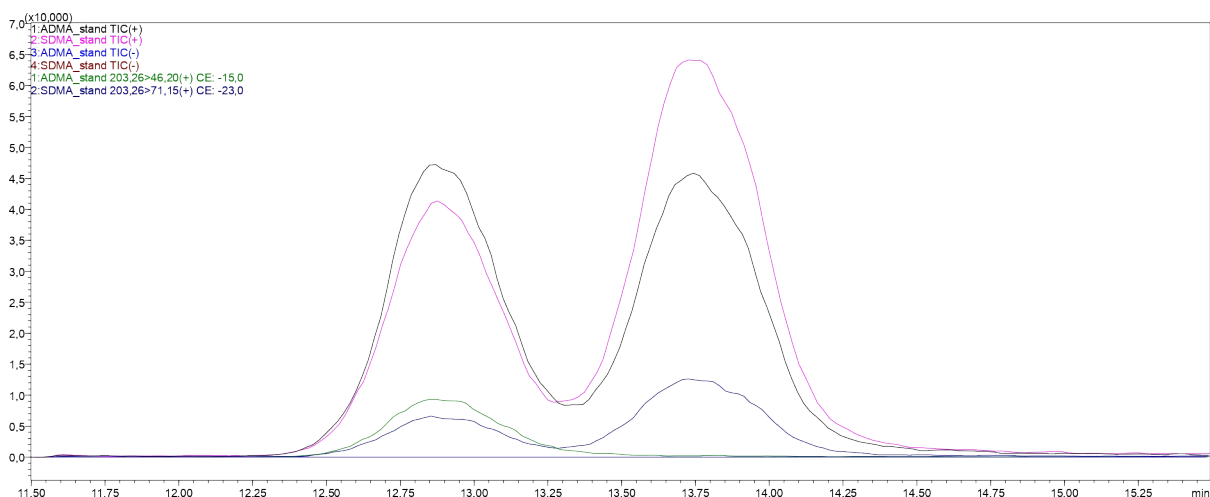
Obrázek 43: Retenční časy ADMA a SDMA ve vzorku s přídatkem (dávkování 2 μ l)

MATRICOVÉ EFEKTY

U směsi vzorků od 3 různých jedinců jsme vypočítali vliv maticových efektů. Byly připraveny 3 vialky: 1. mobilní fáze a přídatkem; 2. směs vzorků s vodou a 3. směs vzorků s přídatkem

Byla použita mobilní fáze MF I; dávkování bylo 2 μ l; průtok 0,25 ml/min; teplota kolony byla 25 °C.

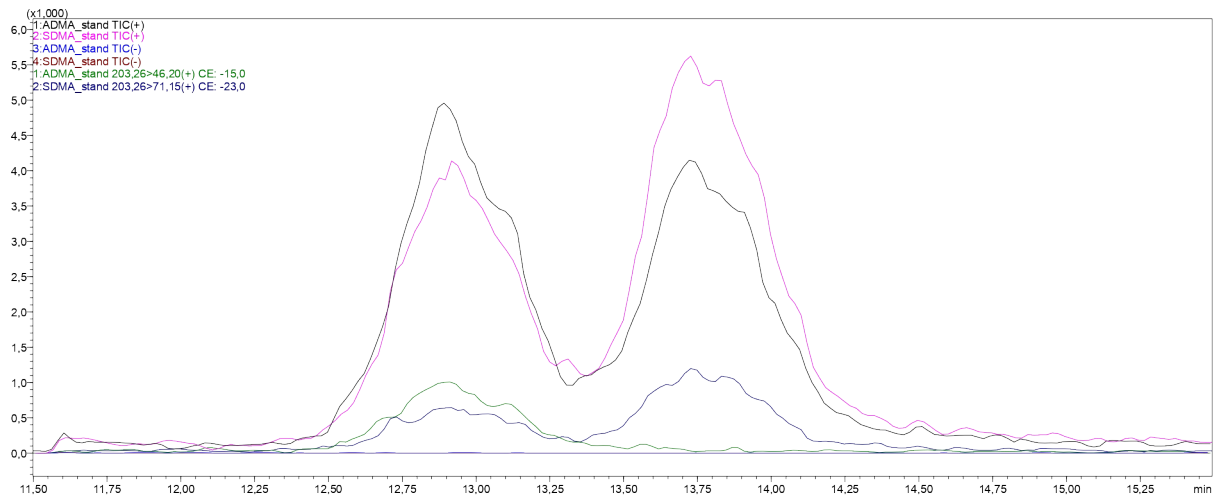
1. Mobilní fáze a přídatkem standardu



Obrázek 44: Retenční časy ADMA a SDMA v mobilní fázi s přídatkem

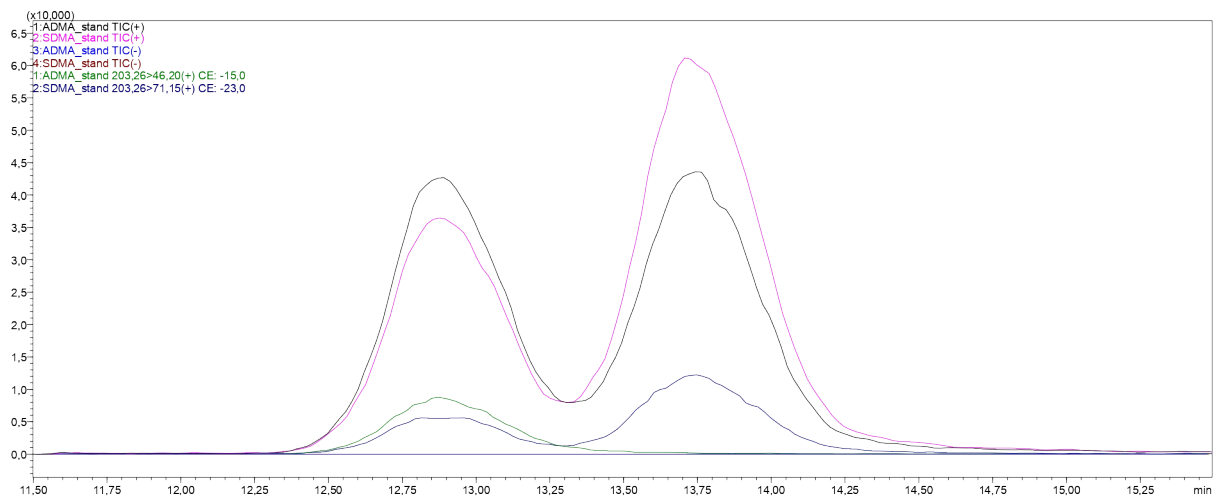
Zjištěné plochy píků v MF s přídatkem byly pro ADMA – 2027102 a pro SDMA – 1850678.

2. Extrakt vzorku s vodou



Obrázek 45: Retenční časy ADMA a SDMA ve vzorku s vodou

3. Extrakt vzorku s přidavkem standardu



Obrázek 46: Retenční časy ADMA a SDMA ve vzorku se standardem

Zjištěné plochy píků ve vzorku s přidavkem byly pro ADMA – 1870670 a pro SDMA – 1678248.

VÝPOČET MATRICOVÝCH EFEKTŮ

Výpočet maticových efektů bylo podle vzorečku: $ME = \frac{A_{SS}}{A_{MFS}} \times 100$.

Výpočet pro ADMA: $ME = \frac{18700670}{2027102} \times 100$ $ME = 92,28 \%$

Výpočet pro SDMA: $ME = \frac{1678248}{1850678} \times 100$ $ME = 90,68 \%$

Pro orientační určení matricových efektů jsme měli jen tři dobrovolné dárce, pro zopakování by bylo potřeba mít ve směsi vzorků vyšší počet jedinců a určitě i pro plánovaný okruh pacientů, např. kardiaky. Vypočtené hodnoty matricového efektu (ME) byly vyšší než 90 %. Tento výsledek naznačuje, že přítomnost složek biologické matrice (např. fosfolipidů, solí, metabolitů) neměla výrazný vliv na ionizaci analytu během hmotnostně spektrometrické analýzy. Hodnoty matricového efektu nad 90 % obecně indikují, že potlačení či zvýraznění signálu způsobené interferencemi z matrice je minimální, což svědčí o dobré selektivitě a vhodnosti zvoleného analytického postupu pro stanovení. [55]

Na dosaženou nízkou míru matricového efektu měla zásadní vliv jednoduchá, ale velmi účinná metoda přípravy vzorků. Ta spočívala v deproteinaci pomocí acetonitrilu a následované centrifugací. Tento přístup umožnil rychlé odstranění většiny interferujících látek bez nutnosti složitějších extrakčních postupů, jako je SPE, a ukázal se být nejen časově úsporný, ale i dostatečně selektivní pro účely stanovení ADMA a SDMA. Dále bylo možné separovat vzorky bez použití derivatizace, což bylo pro nás velmi důležité.

Přestože potlačení signálu při testování matricových efektů nebylo vysoké, mělo by do budoucna dojít ke zlepšení použitím značených vnitřních standardů, které jsou momentálně hůře dostupné, proto nebylo možné je použít v této diplomové práci.

Metoda využívající modifikovanou C₁₈ kolonu vykazovala v průběhu experimentu lepší separační účinnost než analýza na HILIC koloně. I přesto má HILIC chromatografie potenciál do budoucna, zejména pokud se podaří optimalizovat podmínky mobilní fáze a popřípadě nastavení gradientu. Za předpokladu dosažení těchto podmínek, může být separace na HILIC v budoucnosti srovnatelná nebo dokonce účinnější než separace na reverzní fázi.

ZÁVĚR

V rámci této diplomové práce bylo pokračováno ve vývoji a optimalizaci metody LC-MS/MS pro stanovení asymetrického a symetrického dimethylargininu v lidské plazmě s využitím dvou odlišných chromatografických kolon – modifikované C₁₈ kolony a HILIC kolony. Separace na HILIC koloně nebyla úspěšná. Optimalizované podmínky přípravy vzorku umožnily pokračovat v přípravě metody na koloně C18 s polárním endcappingem. Je velká pravděpodobnost, že po použití značeného vnitřního standardu by metoda mohla být úspěšně zvalidována.

Vypočtené matricové efekty dosahovaly u směsi vzorku od tří osob hodnoty ME vyšší než 90 %, což svědčí o minimálním vlivu složité matrice plazmy na ionizační účinnost v hmotnostním spektrometru. Tento výsledek potvrzuje vysokou robustnost a vhodnost zvolené metodiky pro analýzu biologických vzorků.

Pro ochranu hmotnostního detektoru a prodloužení jeho životnosti byl do systému zařazen přepínací ventil, který umožnil řízené oddělení nepotřebných složek eluátu a zabránil tak jejich přímému vstupu do detektoru. Tím bylo minimalizováno riziko kontaminace zdroje iontů a zároveň zvýšena stabilita a reprodukovatelnost výsledků měření.

Zvolený postup přípravy vzorků, založený na jednoduché proteinové precipitaci pomocí organického rozpouštědla, se ukázal být nejen časově nenáročný, ale i vysoce účinný. Úspěšně odstranil většinu interferujících složek a přispěl tak ke zvýšení citlivosti a spolehlivosti analytické metody bez nutnosti složitějších a nákladnějších purifikačních kroků.

POUŽITÁ LITERATURA

- [1] CHU, Yu-De; LAI, Ming-Wei a YEH, Chau-Ting. Unlocking the Potential of Arginine Deprivation Therapy: Recent Breakthroughs and Promising Future for Cancer Treatment. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023, roč. 24, č. 13. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms241310668>. [cit. 2024-09-11].
- [2] HAO, Xuanqi; ZHANG, Xiao; WANG, Jianrong; LIU, Chenchen; LI, Chuanhao et al. Carbon dots with high brightness and stability towards efficient Cr(VI) and l-arginine sensors. Online. *Microchemical Journal*. 2024, roč. 207. ISSN 0026265X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2024.112092>. [cit. 2024-11-06].
- [3] FENG, Tiejun; XIE, Fuda; LYU, Yang; YU, Peiyao; CHEN, Bonan et al. The arginine metabolism and its deprivation in cancer therapy. Online. *Cancer Letters*. 2025, roč. 620. ISSN 03043835. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2025.217680>. [cit. 2025-04-19].
- [4] MARTENS-LOBENHOFFER, Jens a BODE-BÖGER, Stefanie M. Chromatographic-mass spectrometric methods for the quantification of l-arginine and its methylated metabolites in biological fluids. Online. *Journal of Chromatography B*. 2007, roč. 851, č. 1-2, s. 30-41. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.038>. [cit. 2025-04-20].
- [5] MANGONI, Arduino A.; ZINELLU, Angelo; SOTGIA, Salvatore; ROWLAND, Andrew a CARRU, Ciriaco. Methylated Arginines as Biomarkers in Renal Disease. Online. In: PATEL, Vinood B. a PREEDY, Victor R. (ed.). *Biomarkers in Kidney Disease*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016, s. 397-426. ISBN 978-94-007-7698-2. Dostupné z: https://doi.org/10.1007/978-94-007-7699-9_19. [cit. 2025-04-18].
- [6] TAIN, You-Lin a HSU, Chien-Ning. Toxic Dimethylarginines: Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Symmetric Dimethylarginine (SDMA). Online. *Toxins*. 2017, roč. 9, č. 3. ISSN 2072-6651. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/toxins9030092>. [cit. 2024-09-13].
- [7] MAY, James M. How does ascorbic acid prevent endothelial dysfunction? Online. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000, roč. 28, č. 9, s. 1421-1429. ISSN 08915849. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00269-0](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00269-0). [cit. 2024-09-14].

- [8] DARVALL, K.A.L.; SAM, R.C.; SILVERMAN, S.H.; BRADBURY, A.W. a ADAM, D.J. Obesity and Thrombosis. Online. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2007, roč. 33, č. 2, s. 223-233. ISSN 10785884. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejvs.2006.10.006>. [cit. 2024-09-14].
- [9] GLICK, Danielle; BARTH, Sandra a MACLEOD, Kay F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. Online. *The Journal of Pathology*. 2010, roč. 221, č. 1, s. 3-12. ISSN 0022-3417. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/path.2697>. [cit. 2024-09-14].
- [10] LIM, Yong Jin; SIDOR, Nicole A.; TONIAL, Nicholas C.; CHE, Adrian a URQUHART, Bradley L. Uremic Toxins in the Progression of Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease: Mechanisms and Therapeutic Targets. Online. *Toxins*. 2021, roč. 13, č. 2. ISSN 2072-6651. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/toxins13020142>. [cit. 2024-10-07].
- [11] BÖGER, Rainer H. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and cardiovascular disease: insights from prospective clinical trials. Online. *Vascular Medicine*. 2005, roč. 10, č. 1_suppl, s. S19-S25. ISSN 1358-863X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1177/1358836X0501000104>. [cit. 2025-04-17].
- [12] PATEL, Liyona; KILBRIDE, Hannah S; STEVENS, Paul E; EAGLESTONE, Gillian; KNIGHT, Sarah 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. 2025-04-17].
- [13] RIDDELL, Alexandra; FLYNN, Arun; BERGUGNAT, Hugo; DOWSETT, Laura B. a MILLER, Alyson A. SDMA as a marker and mediator in cerebrovascular disease. Online. *Clinical Science*. 2024, roč. 138, č. 20, s. 1305-1323. ISSN 0143-5221. Dostupné z: <https://doi.org/10.1042/CS20241021>. [cit. 2025-04-17].
- [14] LIU, Xiaohong; XU, Xin; SHANG, Ruru a CHEN, Yingjie. Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as an important risk factor for the increased cardiovascular diseases and heart failure in chronic kidney disease. Online. *Nitric Oxide*. 2018, roč. 78, s. 113-120. ISSN 10898603. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.niox.2018.06.004>. [cit. 2025-04-05].

- [15] WU, Guoyao a MORRIS, Sidney M. Arginine metabolism: nitric oxide and beyond. Online. *Biochemical Journal*. 1998, roč. 336, č. 1, s. 1–17. ISSN 0264-6021. Dostupné z: <https://doi.org/10.1042/bj3360001>. [cit. 2025-04-05].
- [16] BRATT, Jennifer M.; ZEKI, Amir A.; LAST, Jerold A. a KENYON, Nicholas J. Competitive metabolism of L-arginine: arginase as a therapeutic target in asthma. Online. *Journal of Biomedical Research*. 2011, roč. 25, č. 5, s. 299-308. ISSN 16748301. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1674-8301\(11\)60041-9](https://doi.org/10.1016/S1674-8301(11)60041-9). [cit. 2024-09-12].
- [17] RAPOSO, Anita E. a PILLER, Sabine C. Protein arginine methylation: an emerging regulator of the cell cycle. Online. *Cell Division*. 2018, roč. 13, č. 1. ISSN 1747-1028. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13008-018-0036-2>. [cit. 2024-09-13].
- [18] HUANG, Jie-Zuo; QIAO, Bei-Ning; LI, Dang-Chi; WEI, Qiu-Rong a ZHANG, Zi-Jian. Arginine methylation modification in the malignant progression of benign and malignant liver diseases. Online. *ILIVER*. 2024, roč. 3, č. 4. ISSN 27729478. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.iliver.2024.100124>. [cit. 2024-11-09].
- [19] MORI, Masataka a GOTOH, Tomomi. Arginine metabolic enzymes, nitric oxide and infection. Online. *The Journal of Nutrition*. 2004, roč. 134, č. 10, s. 2820S–2825S. ISSN 00223166. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jn/134.10.2820S>. [cit. 2025-04-05].
- [20] SIBAL, Latika; C AGARWAL, Sharad; D HOME, Philip a H BOGER, Rainer. The Role of Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) in Endothelial Dysfunction and Cardiovascular Disease. Online. *Current Cardiology Reviews*. 2010, roč. 6, č. 2, s. 82-90. ISSN 1573403X. Dostupné z: <https://doi.org/10.2174/157340310791162659>. [cit. 2024-10-07].
- [21] ZHAO, Wei-Chen; LI, Ge; HUANG, Chu-Yi a JIANG, Jun-LIN. Asymmetric dimethylarginine: An crucial regulator in tissue fibrosis. Online. *European Journal of Pharmacology*. 2019, roč. 858, s. 54-61. ISSN 00142999. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2019.03.055>. [cit. 2025-04-13].
- [22] ANDRABI, Syed M.; SHARMA, Navatha S.; KARAN, Anik; SHAHRIAR, S. M. Shatil; CORDON, Brent et al. Nitric Oxide: Physiological Functions, Delivery, and Biomedical Applications. Online. *Advanced Science*. 2023, roč. 10, č. 30. ISSN 2198-3844. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/advs.202303259>. [cit. 2025-04-05].

- [23] LUNDBERG, Jon O. a WEITZBERG, Eddie. Nitric oxide signaling in health and disease. Online. *Cell*. 2022, roč. 185, č. 16, s. 2853–2878. ISSN 00928674. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.010>. [cit. 2025-04-05].
- [24] ABÁN, Cyntia E.; ACCIALINI, Paula L.; ETCHEVERRY, Tomás; LEGUIZAMÓN, Gustavo F.; MARTINEZ, Nora A. et al. Crosstalk Between Nitric Oxide and Endocannabinoid Signaling Pathways in Normal and Pathological Placentation. Online. *Frontiers in Physiology*. 2018, roč. 9. ISSN 1664-042X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01699>. [cit. 2025-04-18].
- [25] GRIMES, Joseph M.; KHAN, Shaheer; BADEAUX, Mark; RAO, Ravi M.; ROWLINSON, Scott W. et al. Arginine depletion as a therapeutic approach for patients with COVID-19. Online. *International Journal of Infectious Diseases*. 2021, roč. 102, s. 566–570. ISSN 12019712. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.10.100>. [cit. 2025-04-05].
- [26] PEDRAZINI, Maria C.; MARTINEZ, Elizabeth F.; DOS SANTOS, Victor A. B. a GROppo, F. C. L-arginine: its role in human physiology, in some diseases and mainly in viral multiplication as a narrative literature review. Online. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2024, roč. 10, č. 1. ISSN 2314-7253. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s43094-024-00673-7>. [cit. 2025-04-17].
- [27] SMITH, Paul F. a ZHENG, Yiwen. Applications of Multivariate Statistical and Data Mining Analyses to the Search for Biomarkers of Sensorineural Hearing Loss, Tinnitus, and Vestibular Dysfunction. Online. *Frontiers in Neurology*. 2021, roč. 12. ISSN 1664-2295. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fneur.2021.627294>. [cit. 2025-04-19].
- [28] PARMAR, Dharmeshkumar; BHATTACHARYA, Nivedita; KANNAN, Shanthini; VADIVEL, Sangeetha; PANDEY, Gautam K. et al. Plausible diagnostic value of urinary isomeric dimethylarginine ratio for diabetic nephropathy. Online. *Scientific Reports*. 2020, roč. 10, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59897-1>. [cit. 2025-04-22].
- [29] TEERLINK, Tom; LUO, Zaiming; PALM, Frederik a WILCOX, Christopher S. 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. 2025-04-05].
- [30] OLIVA-DAMASO, Elena; OLIVA-DAMASO, Nestor; RODRIGUEZ-ESPARRAGON, Francisco; PAYAN, Juan; BAAMONDE-LABORDA, Eduardo

- 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. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms20153668>. [cit. 2025-04-13].
- [31] HANNEMANN, Juliane a BÖGER, Rainer. Dysregulation of the Nitric Oxide/Dimethylarginine Pathway in Hypoxic Pulmonary Vasoconstriction—Molecular Mechanisms and Clinical Significance. Online. *Frontiers in Medicine*. 2022, roč. 9. ISSN 2296-858X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.835481>. [cit. 2025-04-18].
- [32] 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. 2025-04-13]
- [33] XU, Siyang; ZHANG, Yuling; DING, Xiaoqi; YANG, Yijun; GAO, Jinge et al. Intestinal microbiota affects the progression of colorectal cancer by participating in the host intestinal arginine catabolism. Online. *Cell Reports*. 2025, roč. 44, č. 3. ISSN 22111247. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2025.115370>. [cit. 2025-04-21].
- [34] VIRIBAY, Aitor; BURGOS, José; FERNÁNDEZ-LANDA, Julen; SECCALVO, Jesús a MIELGO-AYUSO, Juan. Effects of Arginine Supplementation on Athletic Performance Based on Energy Metabolism: A Systematic Review and Meta-Analysis. Online. *Nutrients*. 2020, roč. 12, č. 5. ISSN 2072-6643. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/nu12051300>. [cit. 2024-11-18].
- [35] CHESHMEH, Sahar; HOJATI, Niloofar; MOHAMMADI, Arman; RAHMANI, Negin; MORADI, Shima et al. The use of oral and enteral tube-fed arginine supplementation in pressure injury care: A systematic review and meta-analysis. Online. *Nursing Open*. 2022, roč. 9, s. 2552–2561. ISSN 2054-1058. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/nop2.974>. [cit. 2025-04-21].
- [36] MERVIS, Joshua S. a PHILLIPS, Tania J. Pressure ulcers: Pathophysiology, epidemiology, risk factors, and presentation. Online. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2019, roč. 81, č. 4, s. 881-890. ISSN 01909622. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.12.069>. [cit. 2025-04-21].
- [37] SCHOU-PEDERSEN, Anne M. V. 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, s. 1-7. ISSN 2090-8865. Dostupné z: <https://doi.org/10.1155/2018/6148515>. [cit. 2025-04-21].
- [38] UNLU, Ali; ERYAVUZ ONMAZ, Duygu; ABUSOGLU, Sedat a ABUSOGLU, Gulsum. HPLC and LC-MS/MS measurement methods for the quantification of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and related metabolites. Online. *Turkish Journal of Biochemistry*. 2021, roč. 46, č. 4, s. 327-347. ISSN 1303-829X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1515/tjb-2020-0150>. [cit. 2025-04-21].
- [39] SQUELLERIO, Isabella; TREMOLI, Elena a CAVALCA, Viviana. Quantification of arginine and its metabolites in human erythrocytes using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Online. *Analytical Biochemistry*, 2011, roč. 412, č. 1, s.108-110. ISSN 00032697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2011.01.018>. [cit. 2025-04-21].
- [40] D'APOLITO, Oceania; PAGLIA, Giuseppe; TRICARICO, Filomena; GAROFALO, Daniela; PILOTTI, Alessandra et al. Development and validation of a fast quantitative method for plasma dimethylarginines analysis using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Online. *Clinical Biochemistry*. 2008, roč. 41, č. 16-17, s. 1391-1395. ISSN 0009-9120. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.08.075>. [cit. 2025-04-21].
- [41] BONNITCHA, Paul; SULLIVAN, David; FITZPATRICK, Michael; IRELAND, Andrea; NGUYEN, Van Long 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. 2025-04-21].
- [42] MARTENS-LOBENHOFFER, Jens a BODE-BÖGER, Stefanie M. Quantification of L-arginine, asymmetric dimethylarginine and symmetric dimethylarginine in human plasma: A step improvement in precision by stable isotope dilution mass spectrometry. Online. *Journal of Chromatography B*. 2012, roč. 904, s. 140-143. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.07.021> [cit. 2025-04-18].
- [43] GOPU, C. L.; HARI, P. R.; GEORGE, Reema; HARIKRISHNAN, S; SREENIVASAN, K. Simultaneous determination of homocysteine and asymmetric

- dimethylarginine in human urine by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. Online. *Journal of Chromatography B*. 2013, roč. 939, s. 32-37. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2013.09.010>. [cit. 2025-04-14].
- [44] DI GANGI, Iole M.; CHIANDETTI, Lino; GUCCIARDI, Antonina; MORET, Vittoria; NATURALE, Mauro et al. Simultaneous quantitative determination of NG,NG-dimethyl-L-arginine or asymmetric dimethylarginine and related pathway's metabolites in biological fluids by ultrahigh-performance liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry. Online. *Analytica Chimica Acta*. 2010, roč. 677, č. 2, s. 140-148. ISSN 00032670. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.08.011>. [cit. 2025-04-16].
- [45] MARTENS-LOBENHOFFER, Jens a BODE-BÖGER, Stefanie M. Simultaneous detection of arginine, asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine and citrulline in human plasma and urine applying liquid chromatography–mass spectrometry with very straightforward sample preparation. Online. *Journal of Chromatography B*. 2003, roč. 798, č. 2, s. 231-239. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2003.09.050>. [cit. 2025-04-16].
- [46] YI, Lunzhao; ZHANG, Pengfei; JI, Xiaoyan; LIANG, Yizeng; WANG, Yamin et al. Quantitation of L-Arginine and Asymmetric Dimethylarginine in Human Plasma by LC-Selective Ion Mode-MS for Type 2 Diabetes Mellitus Study. Online. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2011, roč. 59, č. 7, s. 839-843. ISSN 0009-2363. Dostupné z: <https://doi.org/10.1248/cpb.59.839>. [cit. 2025-04-16].
- [47] SERVILLO, Luigi; GIOVANE, Alfonso; D'ONOFRIO, Nunzia; CASALE, Rosario; CAUTELA, Domenico et al. Determination of Homoarginine, Arginine, NMMA, ADMA, and SDMA in Biological Samples by HPLC-ESI-Mass Spectrometry. Online. *International Journal of Molecular Sciences*. 2013, roč. 14, č. 10, s. 20131-20138. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms141020131>. [cit. 2025-04-16].
- [48] ANDRADE, Fernando; LLARENA, Marta; LAGE, Sergio a ALDÁMIZ-ECHEVARRÍA, Luis. Quantification of Arginine and its Methylated Derivatives in Healthy Children by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Online. *Journal of Chromatographic Science*. 2015, roč. 53, č. 5, s. 787-792. ISSN 1945-239X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/chromsci/bmu126>. [cit. 2025-04-16].

- [49] WANG, Hong-Yun; HU, Pei a JIANG, Ji. Rapid Determination of Underivatized Arginine, Ornithine, Citrulline and Symmetric/Asymmetric Dimethylarginine in Human Plasma by LC–MS. Online. *Chromatographia*. 2010, roč. 71, č. 9-10, s. 933-939. ISSN 0009-5893. Dostupné z: <https://doi.org/10.1365/s10337-010-1535-8>. [cit. 2025-04-16].
- [50] DAVIDS, Mariska; SWIERINGA, Eliane; PALM, Fredrik; SMITH, Desiree; SMULDERS, Yvo M. et al. Simultaneous determination of asymmetric and symmetric dimethylarginine, L-monomethylarginine, L-arginine, and L-homoarginine in biological samples using stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. Online. *Journal of Chromatography B*. 012, roč. 900, s. 38-47. ISSN 15700232. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.025>. [cit. 2025-04-16].
- [51] ABDU HUSSEN, Ali. High-Performance Liquid Chromatography (HPLC): A review. Online. *Annals of Advances in Chemistry*. 2022, roč. 6, č. 1, s. 010-020. ISSN 25763768. Dostupné z: <https://doi.org/10.29328/journal.aac.1001026>. [cit. 2025-02-22].
- [52] 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. [cit. 2025-03-16].
- [53] TENGATTINI, Sara; MASSOLINI, Gabriella; RINALDI, Francesca; CALLERI, Enrica a TEMPORINI, Caterina. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) for the analysis of intact proteins and glycoproteins. Online. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2024, roč. 174. ISSN 01659936. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2024.117702>. [cit. 2025-02-22].
- [54] LAYNE, J. Characterization and comparison of the chromatographic performance of conventional, polar-embedded, and polar-endcapped reversed-phase liquid chromatography stationary phases. Online. *Journal of Chromatography A*. 2002, roč. 957, č. 2, s. 149-164. ISSN 00219673. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(02\)00193-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(02)00193-0). [cit. 2025-04-18].
- [55] COYM, Jason W. Comparison of retention on traditional alkyl, polar endcapped, and polar embedded group stationary phases. Online. *Journal of Separation Science*. 2008, roč. 31, č. 10, s. 1712-1718. ISSN 1615-9306. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/jssc.200700483>. [cit. 2025-04-21].

- [56] HUI, Yu; WONG, Michael; KIM, Joo-oll; LOVE, Jennifer; ANSLEY, David M. et al. A new derivatization method coupled with LC - MS / MS to enable baseline separation and quantification of dimethylarginines in human plasma from patients to receive on-pump CABG surgery. Online. *ELECTROPHORESIS*. 2012, roč. 33, č. 12, s. 1911-1920. ISSN 0173-0835. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/elps.201100536>. [cit. 2025-04-22].
- [57] NOVÁKOVÁ, Lucie a DOUŠA, Michal. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. II. 2. upravené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8560-6. [cit. 2025-03-16].
- [58] NOVÁK, Dominik. *HPLC/MS stanovení symetrického a asymetrického dimethylargininu v lidské plazmě*. Online, diplomová práce. Univerzita Pardubice, 2024-09-10T06:41:47Z. Dostupné z: <https://hdl.handle.net/10195/84295>. [cit. 2025-05-01].