

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Katedra biologických a biochemických věd

**Sledování pochodů, spjatých se vznikem a metabolismem oxidu dusnatého,
homocysteinu, symetrického a asymetrického dimethylargininu s důrazem
na methylované deriváty glycinu**

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Vendula Sudová
Vedoucí práce: MUDr. Vladimíra Nováková Mužáková, Ph.D.
Konzultant: prof. MUDr. Jaroslav Racek, DrSc.

2018

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Vendula Sudová**
Osobní číslo: **C16463**
Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Bioanalytik**
Název tématu: **Sledování pochodů, spjatých se vznikem a metabolismem oxidu dusnatého, homocysteinu, symetrického a asymetrického dimethylargininu s důrazem na methylované deriváty glycinu**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Teoretická část:
 - a) Popis metabolismu jednoduhlíkatých zbytků a návaznost na další pochody
 - b) Betain - vznik, degradace a funkce v organismu
 - c) Dimethylglycin - vznik, degradace a funkce v organismu
 - d) Metody stanovení betainu a dimethylglycinu
 - e) Význam stanovení betainu a dimethylglycinu u jednotlivých skupin nemocných (diabetes mellitus, kardiovaskulární onemocnění, selhání ledvin, hyperlipidémie)
- 2) Praktická část:
 - a) Zavedení metody stanovení betainu a dimethylglycinu pomocí HPLC
 - b) Ověření analytických vlastností metody stanovení betainu a dimethylglycinu
 - c) Stanovení hladin betainu a dimethylglycinu u definovaných skupin nemocných (prediabetes, diabetes mellitus 1. a 2. typu, diabetes mellitus se selháním ledvin, selhání ledvin bez diabetu) a jejich zhodnocení.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího diplomové práce.

Vedoucí diplomové práce:

MUDr. Vladimíra Nováková Mužáková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Konzultant diplomové práce:

prof. MUDr. Jaroslav Racek, DrSc.

LF UK a FN Plzeň, Ústav klinické biochemie
a hematologie

Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2017**

Termín odevzdání diplomové práce: **11. května 2018**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2018

Prohlašuji:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, 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.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 11. 5. 2018.

Bc. Vendula Sudová

Na tomto místě bych ráda poděkovala vedoucí práce MUDr. Vladimíře Mužákové, Ph.D. za pomoc při vedení práce, svému konzultantovi prof. MUDr. Jaroslavu Rackovi za konzultace s cennými radami a odborné vedení práce a dále panu Ing. Ladislavu Trefilovi za vedení v rámci experimentální části. Také bych ráda poděkovala zdravotnickému pracovišti Ústavu klinické biochemie a hematologie ve Fakultní nemocnici v Plzni za umožnění realizace experimentální části a rodině za dlouhodobou podporu při mém studiu.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá zavedením metody HPLC s UV detekcí pro stanovení betainu a dimethylglycinu ve vzorcích lidské plazmy. Dále stanovením těchto analytů u různých skupin pacientů. Pouze u pacientů s metabolickým onemocněním a prediabetem byly zaznamenány srovnatelné výsledky, které jsou uváděny v odborných publikacích. U ostatních skupin pacientů, včetně závažných stavů jako selhání ledvin či infarkt myokardu, nebyly zaznamenány žádné výrazné změny od kontrolní skupiny.

KLÍČOVÁ SLOVA

betain, dimethylglycin, homocystein, metabolismus jednouhlíkatých zbytků, HPLC

TITLE

Monitoring of processes linked to metabolism of nitric oxide, homocysteine, symmetric and asymmetric arginine with stress to methyl derivatives of glycine

ANNOTATION

Thesis is focused on quantification of betaine and dimethylglycine by HPLC method with UV detection in human plasma as biological samples. Further quantification of these analytes in different patient groups. Only patients with metabolic syndrome and prediabetes had comparable results as in literature. In other patient groups including serious diseases such as renal failure or myocardial infarction no significant changes from control group were observed.

KEYWORDS

betaine, dimethylglycine, homocysteine, one carbon metabolism, HPLC

OBSAH

0	Úvod	15
1	Metabolismus jednouhlíkatých zbytků	16
1.1	Metabolismus aminokyseliny methionin	17
1.2	Metabolismus tetrahydrofolátu	18
1.3	Návaznost na další pochody v organismu	20
1.3.1	Homocystein	20
1.3.2	Metabolismus oxidu dusnatého, symetrický a asymetrický dimethylarginin	21
2	Betain	23
2.1	Cholin, tvorba a degradace betainu	23
2.2	Osmolytická funkce	24
2.3	Donor methylové skupiny	25
2.4	Lipotropní efekt	25
3	Dimethylglycin	26
3.1	Vznik a degradace dimethylglycinu	26
4	Metody stanovení betainu a dimethylglycinu	27
4.1	Kapalinová chromatografie s UV detekcí	28
4.2	Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií	29
4.3	Chromatografie hydrofobních interakcí (HILIC)	30
4.4	Kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií	30
5	Význam stanovení betainu a dimethylglycinu	30
5.1	Význam stanovení u zdravé populace	31
5.2	Význam stanovení u kardiovaskulárních onemocnění	31
5.3	Význam stanovení u diabetes mellitus	32
5.4	Význam stanovení u onemocnění ledvin	32
5.5	Význam stanovení u onemocnění s poruchou metabolismu lipidů	33
6	Cíl práce	34

7	Experimentální část	35
7.1	Materiál	35
7.1.1	Biologické vzorky	35
7.1.2	Chemikálie	36
7.1.3	Pomůcky a přístroje	36
7.1.4	Příprava pracovních roztoků	37
7.1.4.1	Mobilní fáze	37
7.1.4.2	Kalibrační roztoky	37
7.1.4.3	Pufr	38
7.1.4.4	Derivatizační činidlo	38
7.2	Stanovení betainu a dimethylglycinu metodou HPLC s UV detekcí	38
7.2.1	Optimalizace metody stanovení	38
7.2.1.1	Mobilní fáze	38
7.2.1.2	Derivatizace	38
7.2.1.3	Chromatografické stanovení	39
7.2.1.4	Určení koncentrace analytů ve vzorcích	39
7.2.2	Příprava vzorku	40
7.2.3	Derivatizace	40
7.2.4	Chromatografické stanovení	40
7.2.5	Analytické parametry	41
7.2.5.1	Linearita	41
7.2.5.2	Preciznost	41
7.2.5.3	Mezilehlá preciznost	41
7.2.5.4	Výtěžnost	42
7.2.5.5	Limit detekce a kvantifikace	42
7.2.6	Použitý software	42
7.3	Stanovení homocysteinu a kreatininu	42

7.3.1	Stanovení plazmatické koncentrace homocysteinu	43
7.3.2	Stanovení plazmatické koncentrace kreatininu.....	44
8	VÝSLEDKY.....	45
8.1	Zavedení metody stanovení betainu a dimethylglycinu.....	45
8.1.1	Chromatografická separace.....	45
8.1.2	Analytické vlastnosti metody.....	45
8.1.2.1	Linearita	45
8.1.2.2	Preciznost	46
8.1.2.3	Mezilehlá preciznost	46
8.1.2.4	Výtěžnost.....	47
8.1.3	Stanovení betainu a dimethylglycinu u jednotlivých skupin pacientů	48
8.1.3.1	Kontrolní skupina.....	48
8.1.3.2	Pacienti s bolestí na hrudi a potvrzeným infarktem myokardu.....	50
8.1.3.3	Pacienti s bolestí na hrudi a vyloučeným infarktem myokardu	51
8.1.3.4	Pacienti s diabetes mellitus a různým stupněm kompenzace.....	52
8.1.3.5	Pacienti se selháním ledvin léčeni hemodialýzou	53
8.1.3.6	Pacienti se selháním ledvin léčeni hemodialýzou a diabetes mellitus	54
8.1.3.7	Pacienti s metabolickým syndromem a prediabetem	55
8.1.3.8	Přehled výsledků stanovení betainu a dimethylglycinu	56
8.2	Stanovení homocysteinu a kreatininu	58
8.2.1	Stanovení homocysteinu	58
8.2.2	Stanovení kreatininu	59
8.2.3	Korelace	60
9	DISKUZE.....	61
10	ZÁVĚR	67
11	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	68
12	PŘÍLOHY	76

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 - Zjednodušené schéma metabolismu jednonuhlíkatých zbytků, upraveno dle [2] ..16	16
Obrázek 2 - Struktura THF [9]	19
Obrázek 3 - Zjednodušené schéma ovlivnění metabolismu jednonuhlíkatých zbytků homocysteinem a ADMA, upraveno dle [10].....	22
Obrázek 4 - Struktura betainu [18]	23
Obrázek 5 - Lokalizace metabolismu betainu a dimethylglycinu, upraveno dle [24]	24
Obrázek 6 - Struktura dimethylglycinu [19].....	26
Obrázek 7 – Dimethylglycin a jeho úloha v metabolismu jednonuhlíkatých zbytků [7]	27
Obrázek 8 - Derivatizace (4-bromfenacyl bromid) [30]	28
Obrázek 9 - Princip enzymatického stanovení homocysteinu	43
Obrázek 10 - Kalibrační křivka pro betain	45
Obrázek 11 - Kalibrační křivka pro dimethylglycin	46
Obrázek 12 - Krabicový graf koncentrace betainu v plazmě u kontrolní skupiny	48
Obrázek 13 - Krabicový graf koncentrace dimethylglycinu v plazmě u kontrolní skupiny	48
Obrázek 14 - Srovnání plazmatické koncentrace betainu u mužů a žen	49
Obrázek 15 - Srovnání plazmatické koncentrace dimethylglycinu u mužů a žen	49
Obrázek 16 - Krabicový graf koncentrace betainu v plazmě u pacientů s bolestí na hrudi a potvrzeným infarktem myokardu.....	50
Obrázek 17 - Krabicový graf koncentrace dimethylglycinu v plazmě u pacientů s bolestí na hrudi a potvrzeným infarktem myokardu	50
Obrázek 18 - Krabicový graf koncentrace betainu v plazmě u pacientů s bolestí na hrudi a vyloučeným infarktem myokardu	51
Obrázek 19 - Krabicový graf koncentrace dimethylglycinu v plazmě u pacientů s bolestí na hrudi a vyloučeným infarktem myokardu.....	51
Obrázek 20 - Krabicový graf koncentrace betainu v plazmě u pacientů s diabetes mellitus a různým stupněm kompenzace	52
Obrázek 21 - Krabicový graf koncentrace dimethylglycinu v plazmě u pacientů s diabetes mellitus a různým stupněm kompenzace	52
Obrázek 22 - Krabicový graf koncentrace betainu v plazmě u pacientů se selháním ledvin lčených hemodialýzou.....	53
Obrázek 23 - Krabicový graf koncentrace dimethylglycinu v plazmě u pacientů se selháním ledvin lčených hemodialýzou.....	53

Obrázek 24 - Krabicový graf koncentrace betainu v plazmě u pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou a diabetes mellitus	54
Obrázek 25 - Krabicový graf koncentrace dimethylglycinu v plazmě u pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou a diabetes mellitus	54
Obrázek 26 - Krabicový graf koncentrace betainu v plazmě u pacientů s metabolickým syndromem a prediabetem	55
Obrázek 27 - Krabicový graf koncentrace dimethylglycinu v plazmě u pacientů s metabolickým syndromem a prediabetem.....	55
Obrázek 28 - Souhrn krabicových grafů pro plazmatické koncentrace betainu u jednotlivých skupin pacientů pro muže a ženy	56
Obrázek 29 - Souhrn krabicových grafů pro plazmatické koncentrace dimethylglycinu u jednotlivých skupin pacientů pro muže a ženy	57
Obrázek 30 - Souhrn krabicových grafů pro plazmatické koncentrace homocysteinu u jednotlivých skupin pacientů pro muže a ženy	58
Obrázek 31 - Souhrn krabicových grafů pro plazmatické koncentrace kreatininu u jednotlivých skupin pacientů pro muže a ženy	59
Tabulka 1 - Stupně hyperhomocysteinémie [5]	20
Tabulka 2 - Koncentrace jednotlivých směsných kalibračních roztoků	37
Tabulka 3 - Chromatografické podmínky	41
Tabulka 4 - Preciznost pro betain a dimethylglycin	46
Tabulka 5 - Mezilehlá preciznost pro betain a dimethylglycin	46
Tabulka 6 - Výťažnost pro stanovení betainu	47
Tabulka 7 - Výťažnost pro stanovení dimethylglycinu	47
Tabulka 8 - Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě u kontrolní skupiny	48
Tabulka 9 - Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě u pacientů s bolestí na hrudi a potvrzeným infarktem myokardu	50
Tabulka 10 – Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě u pacientů s bolestí na hrudi a vyloučeným infarktem myokardu	51
Tabulka 11 - Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě u pacientů s diabetes mellitus a různým stupněm kompenzace	52
Tabulka 12 - Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě u pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou.....	53

Tabulka 13 - Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě u pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou a diabetes mellitus	54
Tabulka 14 - Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě u pacientů s metabolickým syndromem a prediabetem	55

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

3-PG - 3-fosfoglycerát

ADMA - asymetrický dimethylarginin

ALD - alkoholové poškození jater

BAH – betainaldehyddehydrogenáza

BHMT – betainhomocysteinmethyltransferáza

CBS - cystathionin- β -syntáza

CE-MS/MS - kapilární elektroforéza s tandemovou hmotnostní spektrometrií

CGL - cystathionin- γ -lyáza

CMO - cholinmonooxygenáza

DDAH - dimethylargináza

DHFR - dihydroflátreduktáza

DM - diabetes mellitus

DMG - dimethylglycin

dUMP - deoxyuridinmonofosfát

dUTP - deoxythymidinmonofosfát

eGFR - odhad glomerulární filtrace

eNOS - endoteliální syntáza oxidu dusnatého

FAD - flavinadenindinukleotid

HHC - hyperhomocysteinémie

HILIC - chromatografie hydrofobních interakcí

HPLC - vysokoúčinná kapalinová chromatografie

KH_2PO_4 - dihydrogenfosforečnan draselný

LC-MS - kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

LC-MS/MS - kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

LOD – limit detekce

LOQ – limit kvantifikace

MAT - methioninadenosyltransferáza

MgO - oxid hořečnatý

MS - methioninsyntáza

MTHFD – methylenetetrahydrofolátdehydrogenáza

MTHFR - methylenetetrahydrofolát reduktáza

N⁵-MTHF - N⁵-methyltetrahydrofolát

NAD - nikotinadenindinukleotid

NAFLD - nealkoholické tukové onemocnění jater

NASH - nealkoholická steatóza

NO - oxid dusnatý

NOS - syntáza oxidu dusnatého

PEMT - fosfatidylethanolaminmethyltransferáza

PRMT - proteinargininmethyltransferáza

SAH - S-adenosylhomocystein

SAHH - S-adenosylhomocysteinhydroláza

SAM - S-adenosylmethionin

SDMA - symetrický dimethylarginin

SHMT - serinhydroxymethyltransferáza

THF - tetrahydrofolát

TS - thymidylátsyntáza

UHPLC-MS/MS - extrémně účinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

UPLC-MS/MS - ultraúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií

VLDL - lipoproteiny o velmi nízké hustotě

0 Úvod

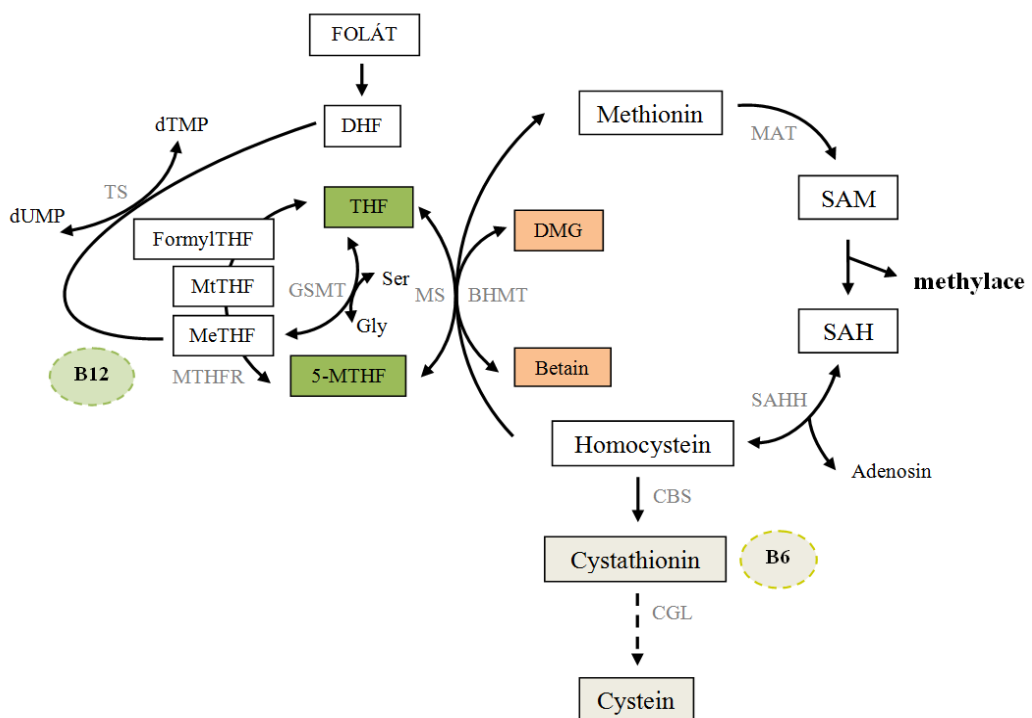
V poslední době vzrůstá počet studií, které se zabývají stanovením methylovaných derivátů glycinu, konkrétně betainu a dimethylglycinu, u různých patologických stavů. Betain je jedním ze dvou možných donorů methylové skupiny pro remethylaci homocysteinu, jehož zvýšená koncentrace (hyperhomocysteinémie) je markerem především kardiovaskulárních, ale i jiných onemocnění. Stanovení betainu v plazmě má však pouze informativní charakter, zatímco dimethylglycin je prognosticky nadřazený a ukazuje skutečnou míru remethylace. Otázkou těchto studií je, zdali může být koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě markerem počínajících či probíhajících patologických stavů.

Dříve byla nejpoužívanější metodou stanovení betainu a dimethylglycinu vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí. Dnes je však nejvíce využívána kapalinová chromatografie spojená s tandemovou hmotnostní spektrometrií, která oproti klasické UV detekci disponuje mnohem větší citlivostí, rychlostí analýzy a snadnou přípravou vzorku.

Cílem této práce je zavedení metody stanovení betainu a dimethylglycinu vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s UV detekcí a stanovení těchto analytů u různých skupin pacientů. Mezi tyto skupiny patří pacienti s bolestí na hrudi a prokázaným infarktem myokardu, pacienti s bolestí na hrudi a vyloučeným infarktem myokardu, pacienti s diabetes mellitus a různým stupněm kompenzace, pacienti se selháním ledvin léčení hemodialýzou, pacienti se selháním ledvin léčení hemodialýzou a diabetes mellitus a pacienti s metabolickým syndromem a prediabetem. Dále také porovnání našich výsledků se studiemi s podobnou tematikou. U všech skupin pacientů byly stanoveny i plazmatické koncentrace homocysteinu a kreatininu.

1 Metabolismus jednouhlíkatých zbytků

Jak již název vypovídá, metabolismus jednouhlíkatých zbytků (one carbon metabolism) se týká přenosu jednouhlíkatých skupin nezbytných pro různé biochemické reakce v organismu. Zahrnuje tak metabolismus aminokyseliny methioninu a pro něj nezbytný folátový cyklus. Zdrojem jednouhlíkatých skupin jsou tak S-adenosylmethionin (SAM), jednotlivé deriváty tetrahydrofolátu (THF) a zároveň i betain (trimethylglycin). Metabolismus jednouhlíkatých zbytků je tak komplexní děj, který zasahuje do mnoha dalších biochemických reakcí a ovlivňuje tak velké množství pochodů v organismu [1]. Zjednodušené schéma metabolismu jednouhlíkatých zbytků je vyobrazeno na obrázku 1.



Obrázek 1 - Zjednodušené schéma metabolismu jednouhlíkatých zbytků, upraveno dle [2]

Legenda: MAT - methioninadenosyltransferáza, SAM - S-adenosylmethionin, SAH - S-adenosylhomocystein, SAHH - S-adenosylhomocysteinhydroláza, CBS - cystathionin- β -syntáza, CGL - cystathionin- γ -lyáza, B6 - vitamin B6, BHMT - betainhomocysteinmethyltransferáza, DMG - dimethylglycin, MS - methioninsyntáza, 5-MTHF - 5-methyltetrahydrofolát, THF - tetrahydrofolát, GSMT - glycinsarkosinmethyltransferáza, MTHFR - methyltetrahydrofolátreduktáza, MeTHF - methylenetetrahydrofolát, MtTHF - methenyltetrahydrofolát, FormylTHF - formyltetrahydrofolát, B12 - vitamin B12, TS - thymidylátsyntáza, dUMP - deoxyuridinmonofosfát, dTMP - deoxythymidinmonofosfát, DHF - dihydrofolát

1.1 Metabolismus aminokyseliny methionin

Esenciální aminokyselina methionin obsahuje síru a methylovou skupinu, jejímž přenosem dochází k methylačním reakcím našeho organismu. Je tak prekurzorem mnoha důležitých látek, mezi které patří jednak meziprodukty cyklu (homocystein, cystein, tripeptid glutathion), ale i samotné methylované produkty. Další významnou funkcí této aminokyseliny, mimo stavební složku bílkovin, je pozice iniciátora proteosyntézy [3]. Methionin se ve svém cyklu může plně regenerovat remethylací, nebo může docházet k jeho katabolismu a vzniku aminokyseliny cysteinu [4].

První reakcí cyklu je přeměna aminokyseliny methionin na donor methylové skupiny, S – adenosylmethionin (SAM), za katalýzy enzymem methioninadenosyltransferázy (MAT). Dochází tak k aktivaci methylové skupiny pomocí ATP, tedy připojením adenosylu [4]. Mezi SAM zprostředkované reakce patří například metylace DNA (regulace genové exprese), proteinů a lipidů. Má tak podíl na vzniku mnoha významných látek jako kreatinu, karnitinu, fosfolipidů, polyaminů, hormonů, neurotransmiterů a mnoha dalších [1]. Po odštěpení methylové skupiny se z něj stává S – adenosylhomocystein (SAH), který je inhibitorem methyltransferáz, a jeho hydrolýzou následně vzniká homocystein. Tato reakce katalyzovaná enzymem S-adenosylhomocysteinhydrolázou (SAHH) je obousměrná a umožňuje tak regulaci tohoto cyklu, přičemž fyziologicky je preferována syntéza SAH [4].

Vznikající homocystein má tři možné cesty, kterými může být metabolizován.

- První cestou je katabolická (transsulfurační) cesta, která se odehrává pouze ve tkáni jaterní, ledvinné, pankreatické a střevní. Ostatní tkáně našeho organismu jsou tak více vystaveny negativním účinkům zvýšené koncentrace SAH a homocysteinu (např. endotelové buňky). Homocystein reaguje se serinem za vzniku cystathioninu za katalýzy enzymem cystathionin- β -syntázou (CBS). Následně dochází k deaminaci cystathioninu na cystein a α -ketoglutarát za katalýzy enzymem cystathionin- γ -lyázou (CGL). Kofaktorem obou reakcí je vitamin B6 [5]. Cystein je aminokyselinou, která je výchozí látkou pro vznik aminokyseliny taurin. Dále je součástí tripeptidu glutathionu, který je důležitým antioxidantem [1]. Vzniklý α -ketoglutarát je dále přeměněn skrze propionyl-CoA až na sukcinyl-CoA, který je meziproduktem Krebsova cyklu [4].

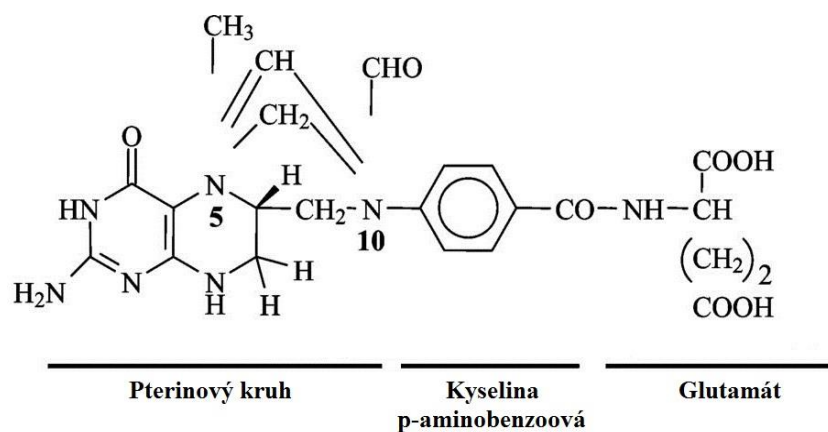
Dvěma dalšími cestami jsou dvě různé možnosti remethylace homocysteinu zpět na methionin. Tyto reakce jsou důležité nejen pro efektivní hospodaření s aminokyselinou methionin, ale i pro detoxikaci homocysteinu a hlavně pro opětovaný vznik SAM [6].

- První reakce je katalyzována enzymem methioninsyntázou (MS) a kofaktorem této reakce je vitamin B12. Ten zprostředkovává přesun methylové skupiny z N^5 -methyltetrahydrofolátu (N^5 -MTHF) na homocystein, čímž vzniká methionin a THF [4].
- Další možností je reakce katalyzovaná zinkovým metalloenzymem betainhomocysteinmethyltransferázou (BHMT), který přenáší methylovou skupinu z betainu (trimethylglycinu) na homocystein za vzniku methioninu a dimethylglycinu [7].

Obě tyto cesty jsou životně důležité a fyziologicky v rovnováze. O tom jaká cesta bude v případě potřeby využívána více, rozhoduje například neschopnost enzymu katalyzovat předkládané množství homocysteinu kvůli jeho snížené aktivitě v důsledku mutace v genu pro enzym MTHFR [5]. Další možné ovlivnění cesty remethylace je např. nedostatek vitaminů skupiny B (B6, B12, kyselina listová) nebo stimulace aktivity BHMT se současnou inhibicí aktivity MS působením ethanolu [2, 7].

1.2 Metabolismus tetrahydrofolátu

S methioninovým cyklem souvisí i tetrahydrofolát (THF), který je koenzymem přenášející jednouhlíkaté skupiny. Skládá se z pterinového kruhu, kyseliny p-aminobenzoové a glutamátu a je tak formou aktivované kyseliny listové (vitamin B9). Existují tak různé deriváty THF v závislosti na přenášené jednouhlíkaté skupině [8]. Připojením jednouhlíkatých skupin formyl, formimino a methyl na N^5 vznikají deriváty N^5 -formyl THF, N^5 -formimino THF a N^5 -methyl THF. Při připojení skupiny formyl na N^{10} vzniká N^{10} -formyl THF. THF také umožňuje přenos methylenových a methenylových skupin prostřednictvím navázání na N^5 a N^{10} za vzniku N^5, N^{10} -metylen THF, popřípadě N^5, N^{10} -methenyl THF [3]. Struktura THF s jednotlivými přenášenými skupinami je vyobrazena na obrázku 2.



Obrázek 2 - Struktura THF [9]

Výchozí látkou pro vznik N^5,N^{10} -metylen THF je především serin, který může být získán třístupňovou reakcí z meziprojektu glykolýzy, 3-fosfoglycerátu (3-PG). Dalším možným zdrojem je glycin. Serin je tak donorem methylu pro THF, přičemž vzniká N^5,N^{10} -metylen THF a glycin. Reakce je v cytoplazmě katalyzována enzymem serinhydroxymethyltransefázou I (SHMT1), zatímco v mitochondriích SHMT2 [1].

Vzniklý N^5,N^{10} -metylen THF může být využit jako donor jednouhlíkatého zbytku pro syntézu pyrimidinů. Konkrétně jde o přeměnu deoxyuridinmonofosfátu (dUMP) na deoxythymidinmonofosfát (dUTP, thymidylát) za katalýzy enzymem thymidylázy (TS). Oxidovaný dihydrofolát se poté redukuje za katalýzy enzymu dihydrofolát reduktázy (DHFR) na THF [8].

Další možností je přeměna N^5,N^{10} -metylen THF na N^5 -formyl THF za katalýzy cytoplazmatického enzymu methylen tetrahydrofolátdehydrogenázy 1 (MTHFD1) nebo mitochondriálního enzymu MTHFD2 [1]. Vzniklý N^5 -formyl THF se podílí na syntéze purinů. Konkrétně jde o přeměnu glycinamid-ribosyl-5-fosfátu na formylglycinamid-ribosyl-5-fosfát za katalýzy enzymem formyltransferázy [3].

Třetí možností je redukce N^5,N^{10} -metylen THF za katalýzy enzymem methylen tetrahydrofolátreduktázy (MTHFR) na N^5 -methyl THF [1]. Tato reakce je součástí již popsaného methioninového cyklu. N^5 -methyl THF je donorem methylové skupiny pro homocystein za vzniku methioninu a THF. Reakce je katalyzována enzymem MS a jejím kofaktorem je vitamin B12 [4]. THF je poté zregenerován pomocí SHMT1 a SHMT2, čímž dochází k ukončení folátového cyklu [1].

1.3 Návaznost na další pochody v organismu

Folátový a methioninový cyklus svými meziprodukty zasahují do mnoha dalších metabolických drah, které ovlivňují. Z uvedených popisů cyklů je zřejmé, že metabolické dráhy transmethylace úzce propojují methionin, homocystein, N⁵-MTHF společně s THF, vitaminy B6 a B12, betain společně s dimethylglycinem a také cholin, látku, z níž je betain endogenně syntetizován. V případě zpomalení cyklu dochází k hypomethylaci napříč celým organismem [5].

1.3.1 Homocystein

Jedním z klinicky významných meziproduktů uvedených cyklů je homocystein. Již v několika studiích byla prokázána souvislost jeho zvýšené hladiny v krvi (hyperhomocysteinémie) se zvýšeným rizikem pro kardiovaskulární onemocnění (zejména aterosklerózu) [5]. Hyperhomocysteinémie však provází i jiná onemocnění, jako například chronické onemocnění ledvin, perikoncepční patologie, poruchy výživy spojené s nedostatkem vitaminů skupiny B (B6, B12, B9), vegetariánství (popř. veganství), dědičné metabolické choroby (mutace v genu pro enzym MTHFR), hemokoagulační choroby a mnohé další. Stanovení homocysteinémie má své opodstatnění i pro sledování množství methylací v organismu. Koncentrace homocysteinu je totiž přímo úměrná metabolitu SAM, který je ale obtížně detekovatelný kvůli jeho nízké koncentraci (přibližně 500krát nižší) [4].

Fyziologická koncentrace homocysteinu v plazmě dospělého jedince je od 5,0 do 14,9 $\mu\text{mol/l}$ (v případě odebrání vzorku krve nalačno). Zvýšená hladina homocysteinu v krvi $> 15 \mu\text{mol/l}$ je označována jako hyperhomocysteinémie (HHC) a má celkem 3 kategorie uvedené v tabulce 1 [5]. S nižšími hladinami homocysteinu se můžeme fyziologicky setkat u žen v graviditě a u dětí. Naopak vyšší koncentrace nacházíme u seniorů nad 65 let [4].

Tabulka 1 - Stupně hyperhomocysteinémie [5]

Stupeň homocysteinémie	$\mu\text{mol/l}$
Mírná	15 - 30
Středně těžká	30 - 100
Těžká	> 100

Mírnou HHC je možné snadno ovlivnit prostřednictvím vitaminů a není příliš diagnosticky významná. Nacházíme u ní pouze patologické cévní změny. Nejproblematičtější kategorií je středně těžká HHC, zejména kvůli množství její možné etiologie, díky které je interpretace výsledků obtížnější. Těžká HHC je doprovodným ukazatelem různých (již zmíněných) onemocnění [4].

Jedním z patologických účinků homocysteinu je jeho vlastnost způsobit oxidační stres. Obsahuje totiž sulfhydrylovou skupinu, která se snadno oxiduje s jinými volnými thioley. Jako vedlejší produkt oxidace vzniká superoxidový radikál, který může reagovat s oxidem dusnatým za vzniku peroxynitritu [10]. Dalším klinicky důležitým aspektem je vlastnost homocysteinu inhibovat enzym dimethylargináza (DDAH), který degraduje asymetrický dimethylarginin (ADMA) na citrulin a dimethylamin [11]. Zjednodušené schéma ovlivnění metabolismu jednoulíkatých zbytků homocysteinem a ADMA je vyobrazeno na obrázku 3.

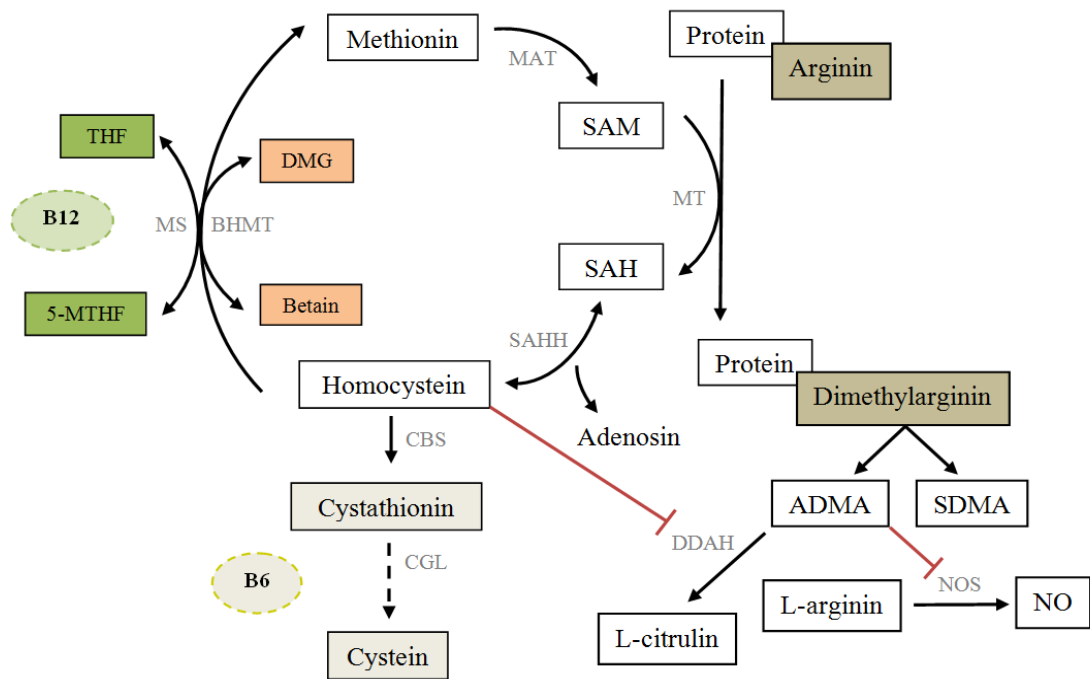
1.3.2 Metabolismus oxidu dusnatého, symetrický a asymetrický dimethylarginin

Prostřednictvím metabolismu jednoulíkatých zbytků je ovlivněn i metabolismus oxidu dusnatého. Oxid dusnatý ($\text{NO}\bullet$) se díky obsahu nepárového elektronu řadí mezi volné radikály a je velmi důležitý pro správnou funkci cévního endotelu [12]. Je to dáno jeho vazodilatačním účinkem, antitrombotickým efektem (inhibuje adhezi a agregaci trombocytů) a protizánětlivým působením [13]. Ve vysokých koncentracích však působí cytotoxicky [12].

Jeho vznik v organismu katalyzuje enzym syntáza oxidu dusnatého (NOS). V endoteliálních buňkách je syntetizován z aminokyseliny L-argininu za katalýzy enzymem endoteliální NOS (eNOS) [13]. Meziproduktem reakce je N-hydroxy-L-arginin, který může posloužit jako zdroj oxidu dusnatého i ve tkáních, které NOS neobsahují [12].

Klinicky významná je blokáce NOS ADMA, který se tvoří v bílkovinách potravními modifikacemi za katalýzy enzymů proteinargininmethyltransferáz (PRMT) a proteolýzou je pak uvolňován do periferie. Může docházet i ke vzniku symetrického dimethylargininu (SDMA), ten však funkci NOS neovlivňuje, ale zabraňuje buněčnému vychytávání ADMA. Důsledkem inhibice NOS ADMA dochází k oxidaci kyslíku namísto L-argininu, za vzniku nebezpečného a velmi reaktivního superoxidového radikálu. Cirkulující koncentrace ADMA a SDMA jsou tak markery počínajících, ale i pokročilých kardiovaskulárních onemocnění [13].

Setkáváme se s nimi ale i u pacientů s onemocněním ledvin různé etiologie. Odbourávání ADMA je katalyzováno enzymem DDAH, který je ale blokován zvýšenou koncentrací homocysteinu vyskytující se u této skupiny pacientů. ADMA tak nepodléhá degradaci a kumuluje se v periférii společně se SDMA, který je fyziologicky vylučován močí [14]. Klíčová role homocysteinu oproti samotnému poškození ledvin byla potvrzena studií, ve které byly porovnávány plazmatické koncentrace ADMA u pacientů se selháním ledvin a pacientů s normální funkcí ledvin se současnou hyperhomocysteinémií. Výsledky byly ve prospěch zdravých jedinců s hyperhomocysteinémií, která byla označena za hlavní příčinu zvýšené koncentrace ADMA [15]. Ta je v krvi ukazatelem endoteliální dysfunkce, první předzvěstí aterosklerózy. Nacházíme ji také u jedinců, kteří trpí hypercholesterolémií, arteriální hypertenzí a diabetem [16].

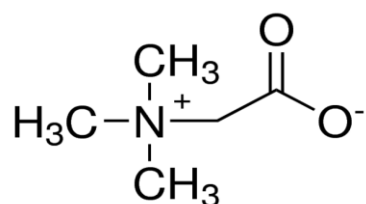


Obrázek 3 - Zjednodušené schéma ovlivnění metabolismu jednouhlíkatých zbytků homocysteinem a ADMA, upraveno dle [10]

Legenda: MAT - methioninadenosyltransferáza, SAM - S-adenosylmethionin, MT - methyltransferáza, SAH - S-adenosylhomocystein, SAHH - S-adenosylhomocysteinhydroláza, ADMA - asymetrický dimethylarginin, SDMA - symetrický dimethylarginin, DDAH - dimethylargináza, NOS - syntáza NO, NO - oxid dusnatý, CBS - cystathionin- β -syntáza, CGL - cystathionin- γ -lyáza, B6 - vitamin B6, BHMT - betainhomocysteinmethyltransferáza, DMG - dimethylglycin, MS - methioninsyntáza, 5-MTHF - 5-methyltetrahydrofolát, THF - tetrahydrofolát, B12 - vitamin B12

2 Betain

Betain (trimethylglycin, glycinbetain) je methylderivátem aminokyseliny glycin a důležitou látkou v našem metabolismu. Jeho struktura je vyobrazena na obrázku 4. Je možné jej získat exogenně z potravy nebo endogenně syntézou z cholinu [16]. Mezi potraviny bohaté na betain patří zejména cukrová řepa (melasa), v níž byl poprvé objeven v 19. století [17]. Dále se také nachází ve výrobcích z pšenice, v mořských plodech či špenátu. Fyziologická koncentrace betainu u dospělých jedinců je přibližně v rozpětí od 20 do 70 $\mu\text{mol/l}$ [16].



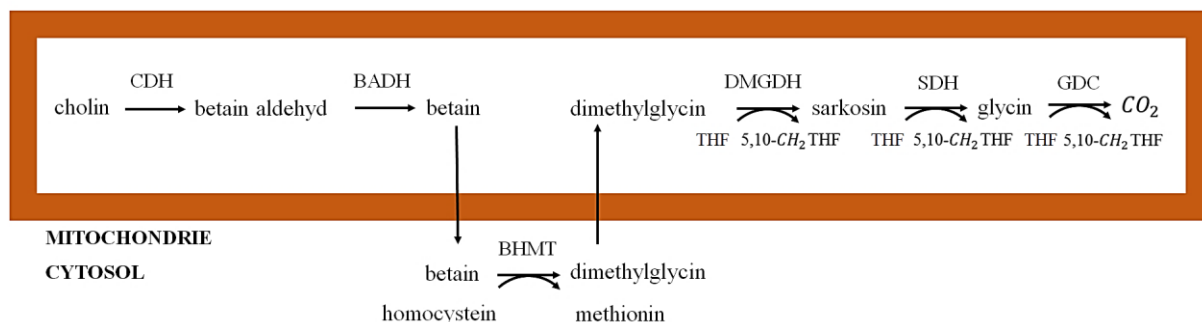
Obrázek 4 - Struktura betainu [18]

2.1 Cholin, tvorba a degradace betainu

Tak jako betain, i cholin může být získán exogenně z potravy nebo endogenně, a to z lipidového metabolismu (z fosfolipidů). Ústředním orgánem pro jeho metabolismus jsou játra [20]. Cholin je součástí fosfatidylcholinu a sfingomyelinu, tedy látek, které jsou nezbytné pro buněčné membrány [7]. Dále jej obsahuje i plicní surfaktant a lipoproteinové částice. Další významnou látkou jej obsahující je neurotransmitter acetylcholin [3].

V případě příjmu betainu potravou dochází ke vstupu do buněk pomocí transportéru gama-aminomáselné kyseliny nebo transportním systémem aminokyselin. Endogenní tvorba betainu z cholinu probíhá v mitochondriální matrix hepatocytů, pomocí dvou nevratných dehydrogenačních enzymatických reakcí. První z reakcí je katalyzována enzymem cholinmonooxygenázou (CMO) za účasti FAD, který je spojen s vnitřní mitochondriální membránou, a vzniká meziproduct betainaldehyd. Další reakce je katalyzována enzymem betainaldehyd dehydrogenázou (BAH) za účasti NAD, konečným produktem je betain. Ten je poté transportován do cytosolu, kde může být působením BHMT metabolizován na dimethylglycin [6, 20]. Lokalizace těchto dějů je vyobrazena na obrázku 5.

V ledvinných tubulech je betain aktivně reabsorbován a jeho exkrece do moči je tak nízká (< 2 % frakční clearance) a konstantní i po podání dietárního betainu [22]. Pohybuje se okolo 2 až 35 mmol/mol kreatinin u zdravého dospělého jedince [23]. Předpokládá se tak, že jde o fyziologické ztráty způsobené osmoregulací (ztrátou z dřeně ledvin při finálním zakoncentrování moče). Normální cestou degradace betainu je tedy katabolismus [22].



Obrázek 5 - Lokalizace metabolismu betainu a dimethylglycinu, upraveno dle [24]

Legenda: CMO - cholinmonooxygenáza, BADH - betainaldehyddehydrogenáza, BHMT - betainhomocysteinmethyltransferáza, DMGDH - dimethylglycindehydrogenáza, SDH - sarkosindehydrogenáza, GDC - glycindekarboxyláza

2.2 Osmolytická funkce

Betain patří mezi látky nazývané osmolyty, které umožňují regulovat stav buněčné hydratace důležité pro jejich správnou funkci. Při vystavení buňky hyperosmolárnímu prostředí dochází ke zmenšení jejího objemu a akumulaci anorganických iontů (Na⁺, K⁺, Cl⁻) s organickými osmolyty (betain, některé aminokyseliny, sorbitol). Regulace pomocí transportu anorganických iontů buněčnou membránou je v tomto případě limitována, protože jejich vysoká koncentrace destabilizuje struktury proteinů. Proto jsou v tomto případě pro regulaci upřednostňovány organické osmolyty, které struktury proteinů neovlivňují. V případě potřeby se pak osmolyty syntetizují a umožňují tak zadržování vody. Z tohoto důvodu se betain v hojné míře nachází v ledvinné tkáni, kde chrání buňky před vysokými koncentracemi elektrolytů a močoviny při finálním zkoncentrování moče [6].

2.3 Donor methylové skupiny

Při odštěpení své methylové skupiny slouží betain jako donor pro remethylaci homocysteinu v methioninovém cyklu. Umožňuje tak opětovaný vznik aminokyseliny methionin, tedy reakci, která je katalyzovaná zinkovým metalloenzymem BHMT [7]. Děje se tak především v játrech a ledvinách. Nedostatečná metylace má mnoho závažných důsledků, mezi něž patří například narušení metabolismu proteinů (zvýšená koncentrace homocysteinu, snížená koncentrace SAM) nebo nedostatečným metabolismem lipidů v játrech, který vede ke steatóze a následné plazmatické dyslipidémii. Díky tomu se nedostatečná hladina betainu nachází zejména u pacientů s chorobami lipidového metabolismu, dále také u diabetických pacientů, u pacientů s vaskulárními onemocněními a pravděpodobně i dalšími chorobami [25]. Také byl prokázán jeho vliv na reprodukci [5].

Betain zvyšuje hladinu sérového methioninu a také rychlost transmethylace. Dochází tak ke zvyšování SAM, který je přímým donorem methylů pro důležité biochemické reakce (např. pro syntézu proteinů, kreatinu, fosfolipidů, karnitinu, hormonů - adrenalinu a také pro metylaci DNA) [6].

2.4 Lipotropní efekt

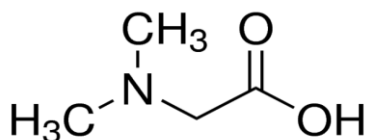
Při nedostatečném množství cholinu (a z něj vznikajícího betainu) dochází v organismu ke snížené dostupnosti jaterního SAM pro methylační reakce. Důsledkem je pak snížená koncentrace methylovaných produktů, např. fosfatidylcholinu, který vzniká z fosfatidylethanolaminu prostřednictvím enzymu fosfatidylethanolaminmethyltransferázy (PEMT) a je důležitou složkou lipoproteinových částic typu VLDL (very low density lipoproteins, lipoproteiny o velmi nízké hustotě) [21]. Pokud v organismu není dostatečná syntéza VLDL, dochází tak k akumulaci lipidů v játrech, což může být příčinou tzv. nealkoholického tukového onemocnění jater (NAFLD, non alcoholic fatty liver disease). Jde o jedno z nejčastějších onemocnění jater na světě, které se může rozvinout v nealkoholickou steatózu (NASH, „non alcoholic steatohepatitis“) a přejít až do cirhotického stádia, vzniku hepatocelulárního karcinomu či jaterního selhání [3]. Mezi další možné příčiny patří zvýšená lipogeneze a přetrvávající lipolýza v adipocytech (vlivem zvýšené nabídky lipidů). NAFLD bývá také často spojen s diabetem a inzulínovou rezistencí [26].

Podobně i nadměrná spotřeba alkoholu způsobuje alkoholové poškození jater (ALD, „alcohol liver disease“). Ethanol je v organismu odbouráván působením enzymů alkoholdehydrogenázy a aldehyddehydrogenázy, přičemž prudce vzrůstá poměr NADH / NAD⁺ v jaterní tkáni. Dochází tak k poruše oxidace mastných kyselin a ke zvýšené lipogenezi, což vyústí v akumulaci lipidů [3].

Působením ethanolu také dochází ovlivnění enzymů metioninového cyklu v reakcích týkající se remethylace homocysteinu. Inhibičně působí na enzym MS (donor methylu N⁵-MTHF) a stimulačně působí na enzym BHMT (donor methylu betain). [2] Veškerý betain se ale pro syntézu methioninu nemůže využít, protože je nutné zachovat dostatečné množství betainu pro osmolytickou regulaci buněk a vzniká tak hyperhomocysteinémie [6]. Zároveň dochází ke kumulaci nebezpečného SAH, který je významným inhibitorem methylačních reakcí. Mezi tyto reakce patří např. vznik fosfatidylcholinu, čímž se může vysvětlit steatóza jater vzniklá po nadměrné spotřebě alkoholu [16].

3 Dimethylglycin

Dimethylglycin je látkou, která vzniká v methioninovém cyklu při jedné ze dvou možných remethylací homocysteinu. Z toho je možné usuzovat, že stanovení betainu má pouze informativní charakter, zatímco stanovení dimethylglycinu je přímým ukazatelem remethylace [4]. Jeho struktura je vyobrazena na obrázku 6. Úzce tak souvisí s cholinem, betainem, sarkosinem a glycinem [16].

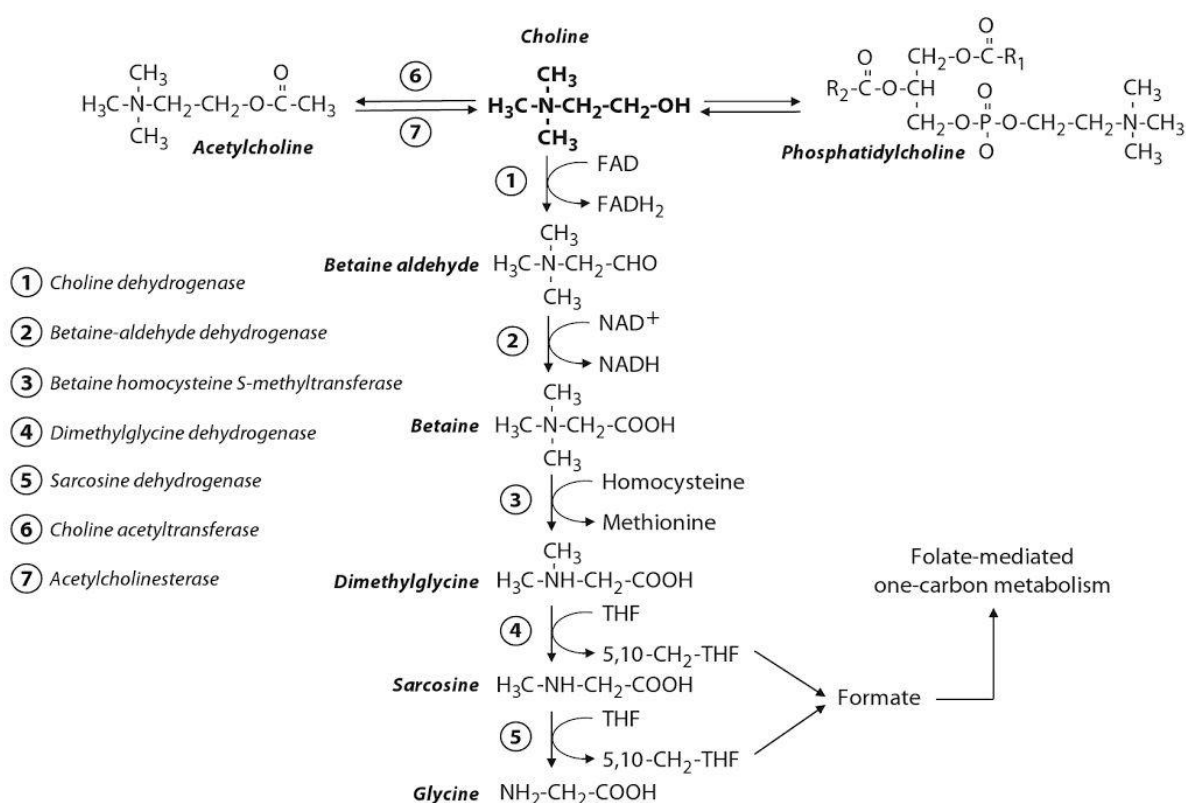


Obrázek 6 - Struktura dimethylglycinu [19]

3.1 Vznik a degradace dimethylglycinu

Dimethylglycin vzniká při remethylaci homocysteinu na aminokyselinu methionin za využití betainu jako zdroje methylové skupiny. Reakce je katalyzována zinkovým metalloenzymem BHMT [5]. Po vzniku dimethylglycinu následují dvě reakce, při níž se z něj postupně odštěpí obě methylové skupiny za vzniku aminokyseliny glycinu.

Nejprve se stává donorem samotný dimethylglycin, ze kterého je přenesena methylová skupina na akceptor THF za katalýzy enzymem dimethylglycindehydrogenázou. Vzniká tak N^5, N^{10} - methylenTHF a sarkosin. V další navazující reakci je donorem methylu sarkosin, který opět umožňuje methyloci THF za katalýzy enzymem sarkosindehydrogenázy, a dává tak vznik konečnému glycinu. Kofaktorem obou těchto reakcí je FAD [7]. Popsané reakce, včetně možného vzniku betainu z acetylcholinu a fosfatidylcholinu skrze cholin, jsou přehledně vyobrazeny na obrázku 7. Malé množství dimethylglycinu je také vylučováno močí, a to přibližně od 1 do 10 mmol/mol kreatininu [22, 26].



Obrázek 7 – Dimethylglycin a jeho úloha v metabolismu jednoduhlíkatých zbytků [7]

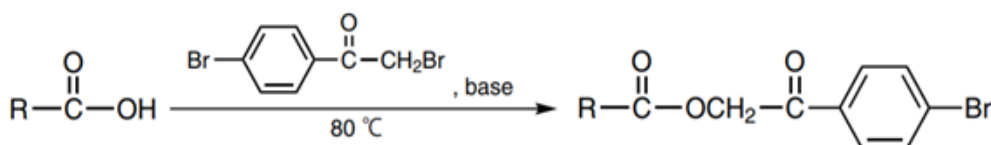
4 Metody stanovení betainu a dimethylglycinu

Mezi nejčastější metody stanovení betainu a dimethylglycinu ve vzorku plazmy (séra) nebo moče patří chromatografické metody, konkrétně kapalinová chromatografie. V dnešní době je nejvíce používána kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí. Vzorky plazmy (séra) lze zpracovat bez předchozí úpravy, zatímco vzorky moče je nutné vhodně naředit kvůli vysokému obsahu solí.

4.1 Kapalinová chromatografie s UV detekcí

Stanovení betainu a dimethylglycinu v biologických vzorcích je založeno na principu ionexové chromatografie. Protože jde o látky povahy karboxylových kyselin, které nevykazují fluorescenční nebo UV absorbující vlastnosti, je nutná jejich derivatizace [28]. Metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s UV detekcí využívá předkolonové derivatizace.

Jako derivatizační činidlo se nejčastěji využívá 4-bromfenacyl bromid (2-bromacetofenon) pro derivatizaci karboxylových kyselin, společně s katalyzátorem reakce 18-crown-6. Chemikálie jsou rozpuštěny v acetonitrilu, který slouží k deproteinaci a zároveň extrakci analytů [29]. Do reakce se také přidává roztok KH_2PO_4 , díky kterému nedochází ke vzniku dvojpíku u dimethylglycinu, jejímž důvodem je dvojitá alkylace. Během vzniku fenacylbromidových esterů je nutné vzorek inkubovat ve vodní lázni při $80\text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 60 minut. Po ochlazení na pokojovou teplotu je, podobně jako v jednotlivých krocích derivatizace, potřebné dokonalé promísení vzorku, aby se dosáhlo optimálních podmínek pro extrakci. Posledním krokem derivatizace je centrifugace. Vzniklý supernatant obsahující žádoucí estery se využívá k analýze. Detekce probíhá při 254 nm a doba analýzy nepřesahuje 25 minut. Jako standardní roztoky se využívají roztoky čistých látek [29]. Schéma derivatizace je vyobrazeno na obrázku 8.



Obrázek 8 - Derivatizace (4-bromfenacyl bromid) [30]

Dalším možným derivatizačním činidlem je např. 4-bromofenacyl triflát ve spojení s MgO. Zde je nejdříve vzorek plazmy (séra) či moče vysušen při $60\text{ }^\circ\text{C}$ pod horkým dusíkem. Vzniklý odparek je následně rozpuštěn ve směsi acetonitrilu a vody, ke kterému se poté přidává 4-bromofenacyl triflát a MgO. Po 5 minutové inkubaci je vzorek zcentrifugován a vzniklý supernatant je použit k analýze. Detekce probíhá při 260 nm [31].

Ve spojení s MgO se také využívá derivatizační činidlo 2-naftacyltriflát. Zde je postup derivatizace odlišný a nejdříve dochází k extrakci látek do směsi acetonitrilu s methanolem. Poté se do reakce přidává sulfát sodný a po 60 minutové inkubaci se vzorek zcentrifuguje. Vzniklý supernatant se využívá k derivatizaci. Detekce probíhá při 249 nm [28].

Uvedená derivatizační činidla však nejsou specifická a umožňují tak vznik i jiných derivatizovaných látek přítomných v plazmě. Všechny uvedené metody analýzy betainu a dimethylglycinu jsou založené na systému s reverzními fázemi a probíhají isokraticky. Mobilní fáze se skládá z 90 % - 97,5 % acetonitrilu a redestilované vody, dále je obohacena např. o cholin, kyselinu citrónovou, kyselinu sukcinovou, trimethylamin a podobně [27, 28, 30].

4.2 Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Metoda kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC-MS) nebo ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) jsou další možnou a v dnešní době nejčastěji využívanou metodou pro stanovení betainu a dimethylglycinu v biologickém materiálu.

Spojení metody kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí disponuje mnohem vyšší citlivostí oproti HPLC s UV detekcí. Další výhodou je krátká doba analýzy a jednoduchá příprava vzorku k analýze, která je mnohdy plně automatizovaná. Nedochozí zde k derivatizaci vzorku, pouze k jeho deproteinaci, následné centrifugaci a analýze supernatantu. Deproteinace se provádí smísením s acetonitrem (1:3), do něhož se betain a dimethylglycin následně extrahují. V některých případech je jako extrakční činidlo použit acetonitril smísený s vodou [32].

Jako interní standardy jsou využívány deuterovaný betain (d_9 -betain) a dimethylglycin (d_9 -dimethylglycin). Často je v rámci jedné analýzy stanovena i hladina plazmatického cholinu. Zatímco u chromatografie s UV detekcí je eluce nejčastěji izokratická, u hmotnostní detekce se setkáme s elucí gradientovou. Mobilní fáze se skládá z acetonitrilu s mravenčnanem amonným v různém poměru [32].

4.3 Chromatografie hydrofobních interakcí (HILIC)

Betain a dimethylglycin lze v biologických vzorcích stanovit i metodou HILIC (Hydrophilic interaction chromatography) spojenou s hmotnostní spektrometrií. Využívá se metody ultraúčinné kapalinové chromatografie (UPLC-MS/MS) nebo extrémně účinné kapalinové chromatografie (UHPLC-MS/MS) s tandemovou hmotnostní spektrometrií [17].

Podobně jako předchozí metoda s hmotnostní detekcí disponuje vysokou citlivostí, snadnou přípravou vzorku a krátkou dobou analýzy. Jako interní standardy se také využívají deuterovaný betain (d_9 -betain) a dimethylglycin (d_9 -dimethylglycin). Vzorek plazmy nebo moče (případně standardní roztok) je přidán k internímu standardu rozpuštěnému v acetonitrilu, díky němuž dochází k deproteinaci vzorku a zároveň i k extrakci analytů. Extrakce se zde provádí intenzivním mixováním po dobu 30 s. Centrifugací vzniklý supernatant se využívá k analýze [17].

I zde se využívá gradientové eluce, přičemž mobilní fáze obsahuje acetonitril s mravenčanem amonným v různém poměru. V rámci jedné analýzy se stanovuje současně i hladina cholinu a acetylcholinu. [33]

4.4 Kapilární elektroforéza s hmotnostní spektrometrií

Další možnou metodou stanovení betainu a dimethylglycinu je kapilární elektroforéza s tandemovou hmotnostní spektrometrií (CE-MS/MS). Vzorek plazmy se deproteinuje v nadbytku acetonitrilu a po centrifugaci se vzniklý supernatant odpaří pod vakuem. Ten se následně rozředí destilovanou vodou a tím je připraven k analýze. I zde se jako interní standardy využívají deuterovaný betain (d_9 -betain) a dimethylglycin (d_9 -dimethylglycin) [34].

5 Význam stanovení betainu a dimethylglycinu

Stanovení betainu a dimethylglycinu je přímým ukazatelem remethylace homocysteinu cestou katalyzovanou enzymem BHMT. Snížená plazmatická koncentrace betainu tak koreluje se zvýšenou hladinou nebezpečného metabolitu homocysteinu, který je významnou látkou provázející různé patologické stavy. Prognosticky nadřazeným diagnostickým markerem je však dimethylglycin, který je skutečným ukazatelem míry remethylace homocysteinu [35].

Nízké plazmatické koncentrace betainu mohou znamenat nedostatečný příjem betainu (cholinu) v potravě, nadměrnou ztrátu cholinu či vadnou syntézu betainu z cholinu. Naopak vysoké koncentrace betainu mohou být způsobeny jeho únikem z buněk, kde se nachází ve vyšších koncentracích, vlivem špatné regulace jeho vylučování [22].

Snížené plazmatické koncentrace dimethylglycinu mohou být způsobeny nedostatečnou plazmatickou koncentrací betainu nebo inhibicí enzymu BHMT. [36] Naopak zvýšené plazmatické koncentrace dimethylglycinu odpovídají hyperhomocysteinémii nebo stimulaci enzymu BHMT (např. ethanol) [2].

5.1 Význam stanovení u zdravé populace

Fyziologické plazmatické koncentrace betainu i dimethylglycinu jsou u mužů nepatrně vyšší než u žen. Plazmatická koncentrace betainu u zdravého dospělého člověka je přibližně od 20 do 70 $\mu\text{mol/l}$ a je oproti dimethylglycinu více variabilní [37]. V případě měření dimethylglycinu metodou HPLC s UV detekcí se uvádějí plazmatické koncentrace až 144 $\mu\text{mol/l}$ [29].

Plazmatická koncentrace dimethylglycinu je naopak výrazně nižší, a to přibližně od 1 do 5 $\mu\text{mol/l}$ [31, 32, 38]. Podobně jako u betainu, i zde jsou uváděny vyšší hodnoty v případě měření metodou HPLC s UV detekcí, a to do 13 $\mu\text{mol/l}$ [29].

5.2 Význam stanovení u kardiovaskulárních onemocnění

U pacientů s kardiovaskulárními chorobami nalézáme hyperhomocysteinémii, která je provázena sníženou plazmatickou koncentrací betainu a z toho vyplývající zvýšenou plazmatickou koncentrací dimethylglycinu [27]. Nacházíme však i zvýšené plazmatické koncentrace betainu vlivem poruchy regulace vylučování betainu z tkání, kde je jeho koncentrace vyšší než v krvi (v rámci mmol/l) nebo inhibicí enzymu BHMT (např. zvýšenou koncentrací dimethylglycinu) [22].

Nízké plazmatické koncentrace betainu jsou spojeny s akutním infarktem myokardu, zatímco vysoké plazmatické koncentrace betainu se srdečním selháním. U obou onemocnění je současně přítomná zvýšená plazmatická koncentrace homocysteinu, která koreluje se zvýšenou plazmatickou koncentrací dimethylglycinu [22].

Setkáváme se zde i s abnormální exkrecí betainu do moče. U pacientů se srdečním selháním a zvýšenou plazmatickou koncentrací betainu dochází ke zvýšené exkreci. Naopak u pacientů s infarktem myokardu, kde je plazmatická koncentrace betainu nízká, dochází k nízké exkreci. Význam na exkreci betainu do moče má i druh použité terapie, protože některá léčiva (např. fibráty) ji zvyšují [22].

5.3 Význam stanovení u diabetes mellitus

U pacientů s onemocněním diabetes mellitus (DM) dochází k narušení metabolismu betainu a jeho koncentrace je tak u této skupiny variabilní, ačkoliv podobná plazmatickým koncentracím u zdravé populace [39]. Jedním z možných vysvětlení variability je pravděpodobná regulace exprese enzymu BHMT prostřednictvím inzulínové represe. Z tohoto důvodu je zvýšená plazmatická koncentrace betainu markerem kardiovaskulárního rizika. [36] Vzhledem k možným protektivním účinkům dimethylglycinu na metabolismus glukózy nacházíme u pacientů jeho snížené koncentrace při současné hyperglykémii [40]. Mezi výsledky pacientů s onemocněním diabetes mellitus 1 a 2 typu nebyl nalezen žádný rozdíl [41].

Exkrece betainu je fyziologicky nízká (frakční clearance < 2,5 %) a konstantní i po podání dietárního betainu. U pacientů s DM zároveň souvisí s vylučováním renálního osmolytu sorbitolu, což nebylo pozorováno v žádné jiné pozorované skupině pacientů [42]. V rámci několika studií byla potvrzena závislost mezi zvýšenou exkrecí betainu močí a zvýšenou hladinou glykovaného hemoglobinu, s tím související hyperglykémii a glykosurií [41].

Současně také s renální dysfunkcí, která vede k exkreci nízkomolekulárních látek včetně betainu. Na množství vyloučeného betainu močí má vliv i druh terapie, např. při léčbě fibráty je exkrece zvýšena, zatímco při užívání diuretik dochází k jejímu snížení [41].

5.4 Význam stanovení u onemocnění ledvin

U pacientů s onemocněním ledvin nacházíme hyperhomocysteinémii, která je způsobená sníženou funkcí ledvin, v nichž metabolismus homocysteinu intenzivně probíhá [43]. Další možnou příčinou hyperhomocysteinémie je poškození jeho metabolismu v extrarenální tkáni [44]. S koncentrací plazmatického homocysteinu koreluje hladina plazmatického dimethylglycinu a umožňuje tak koncentraci homocysteinu v plazmě predikovat [45].

Příčinou zvýšené koncentrace dimethylglycinu může být nedostatečná hladina kyseliny listové vlivem intenzivní remethylace homocysteinu. Protože je kyselina listová nezbytná i pro degradaci dimethylglycinu, dochází k jeho akumulaci, která vede k inhibici enzymu BHMT [43]. Plazmatické koncentrace betainu přesto nejsou výrazně odlišné od zdravé populace, podobně jako u pacientů s onemocněním diabetes mellitus [45]. Dále u těchto pacientů nacházíme abnormálně zvýšené nebo abnormálně snížené vylučování betainu močí [22].

5.5 Význam stanovení u onemocnění s poruchou metabolismu lipidů

U pacientů s lipidovými onemocněními (zejména metabolickým syndromem) nacházíme sníženou plazmatickou koncentraci betainu. Zároveň u těchto pacientů dochází ke zvýšenému vylučování betainu močí, což vede k hyperhomocysteinémii [46]. Snížená plazmatická koncentrace betainu tak negativně koreluje lipidovými markery (plazmatickou koncentraci triacylglycerolů, non-HDL cholesterolu) a homocysteinem [47]. Můžeme tedy říci, že je spojena s vysokým rizikem vzniku kardiovaskulárních chorob. [22].

Na hladinu betainu má však vliv i terapie. U pacientů, kteří užívají fibráty dochází ke zvýšenému vylučování betainu do močí, zatímco terapie statiny způsobuje jen mírné zvýšení plazmatické koncentrace, které je však zanedbatelné. Podobně jako u pacientů s kardiovaskulárními chorobami nacházíme zvýšené plazmatické koncentrace dimethylglycinu [22].

6 Cíl práce

Cílem diplomové práce je zavedení metody stanovení betainu a dimethylglycinu v biologických vzorcích (plazmě) metodou HPLC s UV detekcí. Dále také stanovení těchto analytů u různých skupin pacientů a jejich zhodnocení.

Mezi zahrnuté skupiny pacientů patří:

- pacienti s bolestí na hrudi a prokázaným infarktem myokardu
- pacienti s bolestí na hrudi a vyloučeným infarktem myokardu
- pacienti s diabetes mellitus a různým stupněm kompenzace
- pacienti se selháním ledvin léčení hemodialýzou
- pacienti se selháním ledvin léčení hemodialýzou a diabetes mellitus
- pacienti s metabolickým syndromem a prediabetem

7 Experimentální část

7.1 Materiál

7.1.1 Biologické vzorky

Vzorky krve byly odebrány do zkumavek s antikoagulačním činidlem heparinátem lithným (Vacuette, Greiner Bio-One, GmbH, Rakousko). Následně byly centrifugovány po dobu 10 min při 2000 x g. Odebraná plazma byla rozdělena na více alikvotů, které byly uskladněny v hlubokomrazicím boxu při -80 °C až do doby analýzy.

Pro zavedení metody byly využity vzorky plazmy od 30 dárců z transfuzního oddělení Fakultní nemocnice v Plzni. Soubor obsahoval 15 mužů a žen ve věkovém rozmezí od 39 do 61 let.

Soubor pacientů s bolestí na hrudi a prokázaným infarktem myokardu obsahoval 15 mužů a 5 žen ve věkovém rozmezí od 35 do 65 let.

Soubor pacientů s bolestí na hrudi a vyloučeným infarktem myokardu obsahoval 2 muže a 8 žen ve věkovém rozmezí od 30 do 73 let.

Soubor pacientů s diabetes mellitus a různým stupněm kompenzace obsahoval 10 mužů a 12 žen ve věkovém rozmezí od 20 do 80 let.

Soubor pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou obsahoval 17 mužů a 3 ženy ve věkovém rozmezí od 27 do 66 let.

Soubor pacientů se selháním ledvin a diabetes mellitus obsahoval 12 mužů a 8 žen ve věkovém rozmezí od 36 do 67 let.

Soubor pacientů s metabolickým syndromem a prediabetem obsahoval 9 mužů a 11 žen ve věkovém rozmezí od 44 do 73 let.

7.1.2 Chemikálie

Acetonitril (C_2H_3N , M_r 41,05) (Sigma-Aldrich, Německo)

Choline chloride ($C_5H_{14}ClNO$, M_r 139,62) (Sigma-Aldrich, Německo)

2,4-Dibromacetofenon ($Br_2C_8H_6O$, M_r 227,94) (Sigma-Aldrich, Německo)

18-Crown-6 ($C_{12}H_{24}O_6$, M_r 264,32) (Fluka Chemika, Sigma-Aldrich, Německo)

Dimethylglycin ($C_4H_9NO_2$, M_r 103,12) (Fluka Chemika, Sigma-Aldrich, Německo)

Betaine anhydrous ($C_5H_{11}NO_2$, M_r 117,15) (Fluka Chemika, Sigma-Aldrich, Německo)

Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4 , M_r 139,06) (VWR International, USA)

NaOH (NaOH, M_r 40,00) (VWR International, USA)

7.1.3 Pomůcky a přístroje

Kapalinový chromatograf Thermo Separation Products SpectraSYSTEM: odplyňovač SCM 1000, pumpa P 2000, automatický dávkovač AS 3000, UV detektor UV 2000, fluorescenční detektor FL 3000, řídicí jednotka SN 4000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

Chromatografická kolona SupelcosilTM LC-SCX HPLC Column, 5 μ m, 25 cm x 4,6 mm (Supelco Inc., Sigma-Aldrich, Německo)

Ochranná předkolona SupelcosilTM LC-SCX SupelguardTM Cartridge, 5 μ m, 2 cm x 4,6 mm (Supelco Inc., Sigma-Aldrich, Německo)

Nylonové filtry Nylon filter membranes 0,45 μ m, 47 mm (Supelco, Sigma-Aldrich, Německo)

Filtrační systém na filtraci roztoků pro chromatografii

Ultrazvuková vodní lázeň UC-80 (STURDY, Taiwan)

Vodní lázeň 1003 (GFL, Německo)

Třepačka Reax Top (Heidolph, Německo)

Centrifuga UNIVERSAL 320 R (Hettich, Německo)

Mikrocentrifuga MIKRO 220 R (Hettich, Německo)

Odběrové zkumavky Vacuette Li-heparin, 4 ml (Greiner Bio-One GmbH, Rakousko)

Polypropylenové zkumavky 1,5 ml (FL medical, Itálie)

Hlubokomrazicí box MDF-DC700VX-PE (Sanyo, Japonsko)

Automatické pipety Finnpiette (Sigma Aldrich, Německo)

Analytické váhy 125 A (Precisa, Švýcarsko)

Chladnička FKS 3602 (Liebherr, Německo)

Skleněné vialky (Sigma-Aldrich, Německo)

7.1.4 Příprava pracovních roztoků

7.1.4.1 Mobilní fáze

Mobilní fáze je složena z 90 % acetonitrilu, 10 % redistilované vody a cholinu o koncentraci 22 mmol/l. Byla připravena z navážky 3,072 g cholinu rozpuštěného ve 100 ml redistilované vody a doplněna na objem 1 000 ml acetonitrilem. Hotová mobilní fáze byla vakuově filtrována přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,45 μm a odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 30 minut. Hotová mobilní fáze byla uchovávána v chladničce při 4 °C.

7.1.4.2 Kalibrační roztoky

Zásobní roztoky byly připraveny z roztoků čistých látek betainu a dimethylglycinu o koncentraci 1 mmol/l. Zásobní roztok betainu o koncentraci 1 mmol/l byl připraven z navážky 0,0234 g ve 200 ml redistilované vody. Zásobní roztok dimethylglycinu o obdobné koncentraci byl připraven z navážky 0,0206 g ve 200 ml redistilované vody. Hotové zásobní roztoky byly uchovávány v chladničce při 4 °C. Směsné kalibrační roztoky byly připraveny zředěním zásobních roztoků redistilovanou vodou na požadované koncentrace uvedené v tabulce 2.

Tabulka 2 - Koncentrace jednotlivých směsných kalibračních roztoků

Směsný standard	Betain ($\mu\text{mol/l}$)	Dimethylglycin ($\mu\text{mol/l}$)
1.	8	2
2.	16	4
3.	32	8
4.	64	16
5.	128	32
6.	256	64

7.1.4.3 Pufr

Pufr potřebný pro derivatizaci (pH = 6) byl připraven smísením 5,64 ml 0,1 mol/l NaOH s 50,00 ml 0,1 mol/l KH_2PO_4 a doplněním na 100 ml destilovanou vodou. Hotový pufr byl uchováván v lednici při 4 °C.

7.1.4.4 Derivatizační činidlo

Derivatizační činidlo bylo připraveno navážkou 0,3475 g 2,4-dibromoacetofenonu a 0,0165 g 18-crown-6 rozpuštěných ve 25 ml acetonitrilu. Hotové derivatizační činidlo bylo uchováváno v lednici při 4 °C.

7.2 Stanovení betainu a dimethylglycinu metodou HPLC s UV detekcí

7.2.1 Optimalizace metody stanovení

Pro stanovení koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě byla využita mírně upravená metoda M. D. Laryea. [29]

7.2.1.1 Mobilní fáze

Složení mobilní fáze bylo zachováno, ačkoliv mu byla věnována pozornost. Důvodem byly rozdílné retenční časy analytů ve srovnání s literaturou. Se složením mobilní fáze s 90 % acetonitrilu (ACN), 10 % destilované vody a 22 mmol/l cholinu byla eluce příliš rychlá (4,9 min pro dimethylglycin a 5,7 min pro betain) oproti 12,7 min a 14,8 min. Při snížení koncentrace cholinu na polovinu (11 mmol/l) došlo k mírnému posunu retenčních časů, a to na 7,4 min a 8,8 min. Toto řešení se neosvědčilo při separaci biologických vzorků, kdy nebyly píky stanovovaných analytů ostře ohraničené, přestože píky standardních roztoků byly téměř nezměněny. Při snížení koncentrace cholinu na 2,2 mmol/l byly píky rozmyté a eluce betainu přesahovala 20 min. Taktéž změny poměru ACN a redestilované vody (95 % : 5 %) nepřineslo žádoucí výsledky.

7.2.1.2 Derivatizace

Důvodem pro změny v derivatizaci byla obtížná separace dimethylglycinu v biologických vzorcích. Způsob derivatizace byl pozměněn přidáním pufru $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ o pH 6 a inkubací 20 min při pokojové teplotě před přidáním derivatizačního činidla. Tímto zásahem jsme omezili vznik dvojpíku u dimethylglycinu, který je způsoben dvojitou alkylací (O-alkylace a N-alkylace).

V případě metody stanovení dle Laryea je tento problém vyřešen pouhým přidáním KH_2PO_4 o koncentraci 0,1 mol/l, což se ale v našem případě neosvědčilo ani s použitím koncentrace 0,5 a 1 mol/l. Testovaná doba inkubace byla v různých časových intervalech (15, 30 a 60 min) a jako neoptimálnější byla vybrána délka 60 minut, obdobně jako v literatuře.

7.2.1.3 Chromatografické stanovení

Další změnou je objem nástřiku, který byl dle literatury 15 μl , ale v našem případě způsobil přetížení kolony a obtížnější separaci. Zvolili jsme tedy nižší objem nástřiku, a to 10 μl , při kterém docházelo k lepší separaci a vzniku ostrých píků. V závislosti na rychlé eluci látek byla upravena i doba analýzy. Všechny UV absorbující látky byly eluovány do 15 minut na rozdíl od 25 minut uvedených v literatuře.

Poslední změnou je teplota kolony, která je v našem případě 33 °C oproti uváděné pokojové teplotě. Důvodem je neklimatizovaná místnost, v níž se chromatograf nachází. Na základě zvolených chromatografických podmínek byly retenční časy pro dimethylglycin a betain $4,9 \pm 0,1$ a $5,7 \pm 0,1$ min.

7.2.1.4 Určení koncentrace analytů ve vzorcích

Vzhledem k povaze vzorků jsme pro výpočet koncentrací obou analytů využili směsnou plazmu oproti směsnému standardnímu roztoku. Skutečná koncentrace analytů ve směsné plazmě byla zjištěna metodou standardních přídavek a následně byla používána k jednobodové kalibraci. Alikvoty směsné plazmy byly uchovávány při -80 °C v hlubokomrazícím boxu a při každé derivatizované sérii vzorků byl použit čerstvý alikvot.

Důvodem pro použití směsné plazmy se známou koncentrací obou analytů k určení koncentrace v neznámých vzorcích byla matrice vzorku a dále také koeluce dimethylglycinu s látkami s podobným retenčním časem, díky čemuž vycházely koncentrace dimethylglycinu falešně nadhodnocené. Zejména u některých skupin pacientů byla koeluce problematictější (např. u ledvinových onemocnění). Tyto látky se nám nepodařilo odseparovat změnou složení mobilní fáze, ani změnami v průběhu derivatizace. Koncentraci betainu bylo možné počítat i ze standardního roztoku čisté látky, ale pro úplnost byla počítána obdobně jako koncentrace dimethylglycinu.

7.2.2 Příprava vzorku

Vzorky uchovávané v hlubokomrazícím boxu byly nejdříve rozmrazeny při pokojové teplotě. Následně byly důkladně promíseny a zcentrifugovány 1 min při 2000 x g kvůli lepší manipulaci se vzorky a oddělení případného sedimentu.

7.2.3 Derivatizace

Derivatizace probíhala v polypropylenových zkumavkách. Nejdříve bylo k 50 μ l vzorku plazmy přidáno 50 μ l pufru $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$. Po důkladném promísení vzorku na vortexu se směs inkubovala po dobu 20 minut při laboratorní teplotě. Po uplynutí této doby bylo přidáno 900 μ l derivatizačního činidla. Po opětovaném promísení vzorku byly zkumavky uzavřeny a vloženy do vodní lázně vyhřáté na 80 °C po dobu 60 minut. V této fázi docházelo ke vzniku nescifických fenacylbromidových esterů. Po uplynutí této doby byly zkumavky odebrány z vodní lázně a zchlazeny na laboratorní teplotu. Poté byly důkladně promíseny na vortexu a následně zcentrifugovány 5 minut při 1000 g.

Vzniklý supernatant byl přenesen do vialek a ihned neprodyšně uzavřen kvůli možnému odpaření. Připravené vzorky ve vialkách byly uchovávány v chladničce při 4 °C až do doby analýzy, která probíhala maximálně do druhého dne.

7.2.4 Chromatografické stanovení

Podmínky chromatografické separace jsou přehledně uvedeny v tabulce 3. Pro stanovení byla použita chromatografická kolona LC-SCX HPLC o velikosti částic 5 μ m o délce 25 cm a průměru 4,6 mm. Dále byla použita i odpovídající ochranná předkolona. Separace byla izokratická s objemem nástřiku vzorku 10 μ l a průtokem mobilní fáze 1,5 ml/min. Celková doba analýzy byla 15 minut.

Píky betainu a dimethylglycinu byly kvantifikovány určením plochy pod křivkou (AUC). Vyhodnocené AUC uvedených analytů ve vzorku plazmy byly vztaženy na AUC ve směsné plazmě o jejich známé koncentraci. Vyhodnocení bylo prováděno v ovládacím programu chromatografu ChromQuest.

Tabulka 3 - Chromatografické podmínky

Doba analýzy:	15 minut
Teplota kolony:	33 °C
Průtok mobilní fáze:	1,5 ml/min
Objem dávkovaného vzorku:	10 µl
Detekce:	254 nm

7.2.5 Analytické parametry

7.2.5.1 Linearita

Linearita je vlastnost metody, při které ověřujeme, zdali existuje lineární vztah mezi naměřenými výsledky a odpovídajícími koncentracemi v sestrojené kalibrační křivce. U betainu byla ověřována v rozsahu očekávaných koncentrací, zatímco u dimethylglycinu byly zahrnuty i koncentrace vyšší. Pro měření byly použity směsné kalibrační roztoky obsahující betain a dimethylglycin v koncentracích 8/2, 16/4, 32/8, 64/16, 128/32 a 256/64 µmol/l. Kalibrační křivka pro oba analyty byla sestrojena z jednotlivých AUC a odpovídajících koncentrací kalibračních roztoků. Data byla zpracována metodou regresní analýzy.

7.2.5.2 Preciznost

Preciznost je vlastností metody, která určuje její spolehlivost. Preciznost pro stanovení betainu a dimethylglycinu byla určena analýzou 10 nezávislých měření identického vzorku směsné plazmy. Vzorky byly analyzovány po dobu jednoho dne. Jako míra přesnosti byl použit variační koeficient (CV) v %.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 (\%)$$

7.2.5.3 Mezilehlá preciznost

Podobně i mezilehlá preciznost určuje spolehlivost metody. Mezilehlá preciznost pro stanovení betainu a dimethylglycinu byla určena analýzou 10 nezávislých měření identického vzorku směsné plazmy provedených v 10 dnech. Vytvořené alikvoty směsné plazmy byly uchovávány při -80 °C v hlubokomrazícím boxu a každý den byl použit čerstvý alikvot. Jako míra přesnosti byl použit variační koeficient (CV) v %.

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 (\%)$$

7.2.5.4 Výtěžnost

Výtěžnost je vlastností metody, která udává její účinnost, tedy schopnost postihnout veškerý analyt ve vzorku. Výtěžnost byla určena ve vzorku směsné plazmy se známou koncentrací se standardním přídatkem dimethylglycinu a betainu. Přídatky byly zvoleny tak, aby se konečná koncentrace pohybovala v rozmezí kalibrační křivky. Hodnoty výtěžnosti byly počítány jako poměr mezi nalezeným a přidaným množstvím betainu a dimethylglycinu.

$$\text{výtěžnost (\%)} = \frac{x_i - x_0}{y} \cdot 100$$

kde x_i je koncentrace vzorku s přídatkem, x_0 původní koncentrace (bez přídatku) a y přidaná koncentrace.

7.2.5.5 Limit detekce a kvantifikace

Limit detekce (LOD) betainu a dimethylglycinu nebyl ověřen. Jako limit kvantifikace (LOQ) byl použit nejnižší bod kalibrační křivky, a to 8 $\mu\text{mol/l}$ pro betain a 2 $\mu\text{mol/l}$ pro dimethylglycin. Jako měřicí rozsah byl zvolen interval mezi nejnižším a nejvyšším bodem kalibrační křivky.

7.2.6 Použitý software

ChromQuest 2.51 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)

MS Excel 2016 (Microsoft Corp., Redmond, USA)

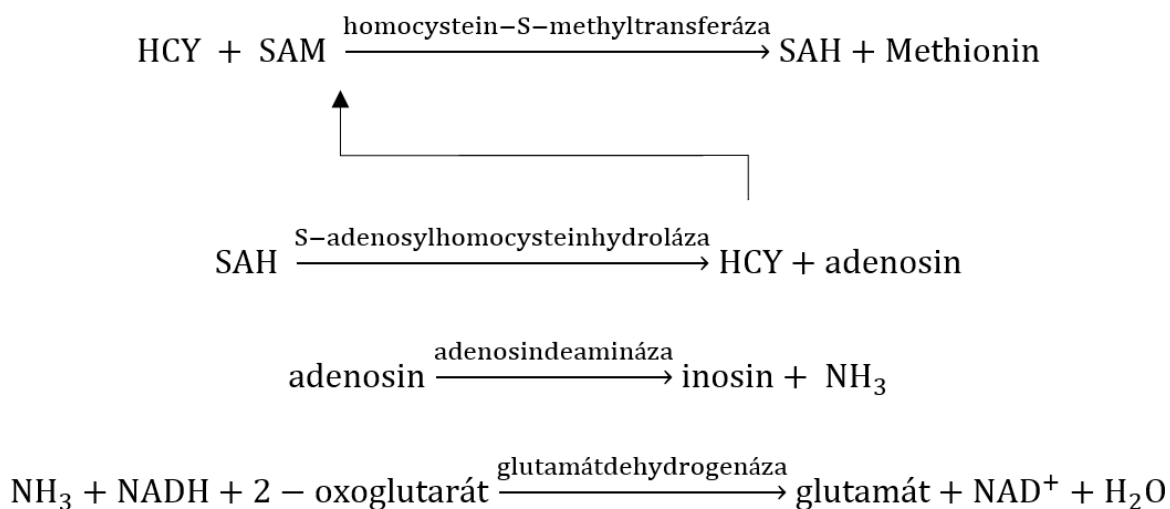
7.3 Stanovení homocysteinu a kreatininu

U všech skupin pacientů byla také stanovena plazmatická koncentrace homocysteinu a kreatininu. Důvodem pro jejich stanovení je zhodnocení jejich vztahu vůči betainu a dimethylglycinu korelační analýzou. Obě stanovení byla prováděna na přístroji Cobas 8000 firmy Roche.

7.3.1 Stanovení plazmatické koncentrace homocysteinu

Pro stanovení plazmatické koncentrace homocysteinu byla využita souprava s oficiálním označením HCYS: ACN 8778 (Homocysteine enzymatic assay). Princip stanovení je přehledně vyobrazen na obrázku 9. Jedná se o enzymatický test, kdy je nejdříve oxidovaný homocystein redukován na volný homocystein, který poté reaguje s kosubstrátem S-adenosylmethioninem (SAM) za vzniku methioninu a S-adenosylhomocysteinu (SAH) za katalýzy enzymem homocystein-S-methyltransferázou. SAH se poté stanovuje kopulovanými enzymatickými reakcemi, ve kterých se SAH hydrolyzuje na adenosin a homocystein za katalýzy enzymem S-adenosylhomocysteinhydrolázou.

Vzniklý homocystein se znovu vrací do konverzní reakce, čímž vzniká reakční cyklus, který zesiluje detekční signál. Adenosin je ihned hydrolyzován na inosin a amoniak za katalýzy enzymem adenosindeaminázou. V posledním kroku katalyzuje enzym glutamátdehydrogenáza reakci amoniaku s 2-oxoglutarátem a NADH za vzniku NAD⁺, glutamátu a vody. Koncentrace vzorku je přímo úměrná množství NADH přeměněného na NAD⁺ ($\Delta A_{340 \text{ nm}}$).



Obrázek 9 - Princip enzymatického stanovení homocysteinu

Legenda:

HCY - homocystein

SAM - S-adenosylmethionin

SAH - S-adenosylhomocystein

7.3.2 Stanovení plazmatické koncentrace kreatininu

Pro stanovení plazmatického kreatininu byla využita souprava s oficiálním označením CREJ2 (Creatinine Jaffé 2. generace). Jedná se o spektrofotometrický test s kinetickým měřením, který je založen na tvorbě žluto oranžového komplexu kreatininu s kyselinou pikrovou v alkalickém prostředí. Intenzita vzniklého zabarvení je přímo úměrná koncentraci kreatininu ve vzorku. Protože je to stanovení nespecifické a díky existenci Jaffého pozitivním chromogenům by byly výsledky falešně nadhodnocené, odečítá se od každého výsledku „pseudohodnota“, která je v tomto případě 26 $\mu\text{mol/l}$.

8 VÝSLEDKY

8.1 Zavedení metody stanovení betainu a dimethylglycinu

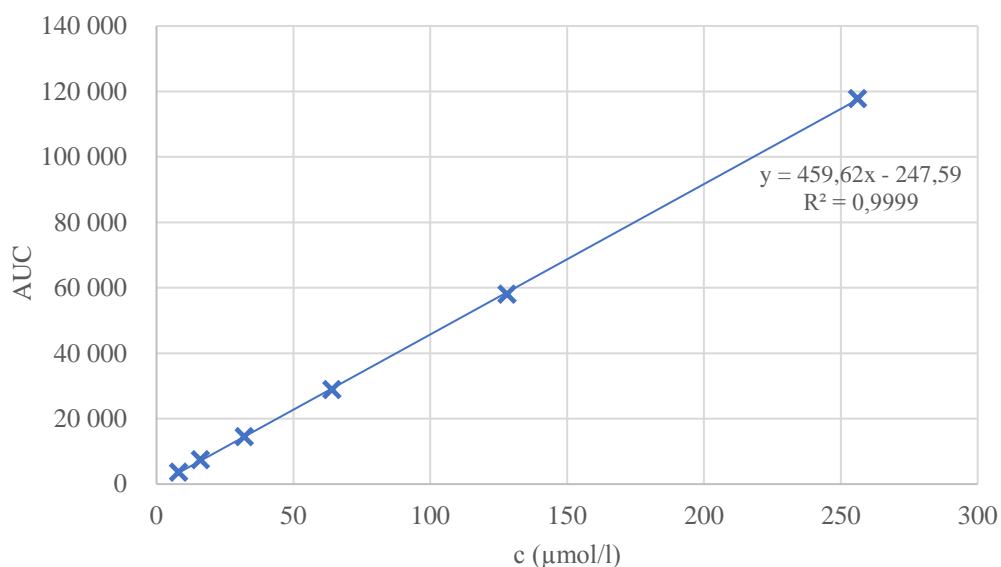
8.1.1 Chromatografická separace

Retenční časy pro dimethylglycin a betain byly $4,9 \pm 0,1$ min a $5,7 \pm 0,1$ min. Chromatografické záznamy standardního roztoku a vybraných pacientů jsou uvedeny v příloze 1 až 4.

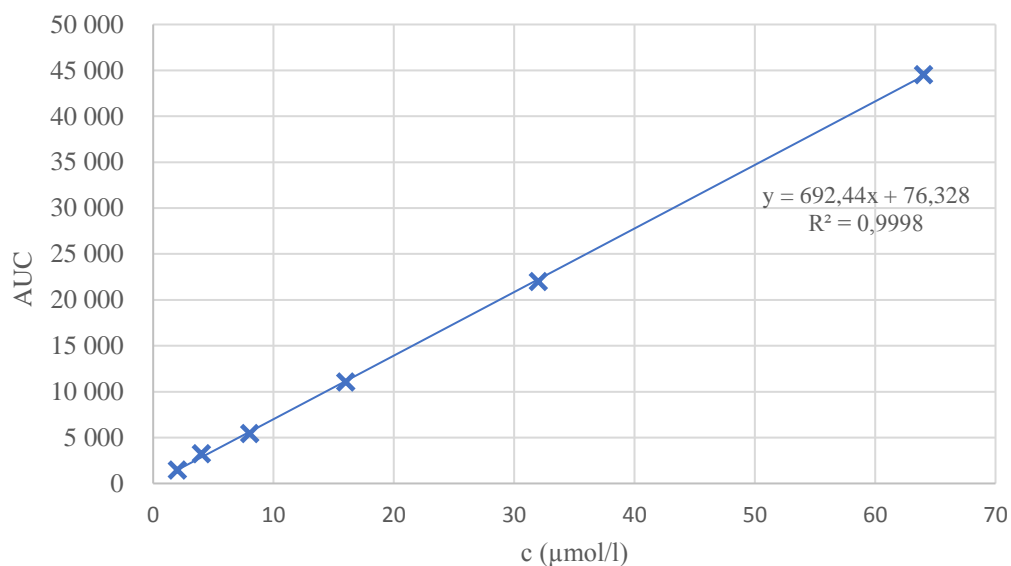
8.1.2 Analytické vlastnosti metody

8.1.2.1 Linearita

Lineární závislost AUC na koncentraci kalibračních roztoků byla potvrzena v celém rozsahu použitých koncentrací. V případě betainu od 8 do 256 $\mu\text{mol/l}$ a od 2 do 64 $\mu\text{mol/l}$ pro dimethylglycin. Kalibrační křivky pro betain a dimethylglycin jsou vyobrazeny na obrázcích 10 a 11.



Obrázek 10 - Kalibrační křivka pro betain



Obrázek 11 - Kalibrační křivka pro dimethylglycin

8.1.2.2 Preciznost

Preciznost stanovení dimethylglycinu a betainu byla zjištěna analýzou 10 nezávisle připravených vzorků analyzovaných v jeden den. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4 - Preciznost pro betain a dimethylglycin

Analyt	Průměr (μmol/l)	SD (μmol/l)	CV (%)
Betain	74,3	7,8	10,6
Dimethylglycin	2,8	0,4	11,8

8.1.2.3 Mezilehlá preciznost

Mezilehlá preciznost stanovení mezi sériemi byla zjištěna analýzou 10 nezávisle připravených vzorků po dobu deseti dní. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5 - Mezilehlá preciznost pro betain a dimethylglycin

Analyt	Průměr (μmol/l)	SD (μmol/l)	CV (%)
Betain	60,1	4,3	7,1
Dimethylglycin	2,5	0,3	12,3

8.1.2.4 Výtěžnost

Výtěžnost stanovení byla zjištěna metodou standardních přidavků. Výsledky pro betain a dimethylglycin jsou uvedeny v tabulkách 6 a 7.

Tabulka 6 - Výtěžnost pro stanovení betainu

Přídavek ($\mu\text{mol/l}$)	Výtěžnost (%)	Průměrná výtěžnost (%)	SD (%)	CV (%)
25	102,3	97,8	4,0	4,0
50	94,7			
100	96,4			

Tabulka 7 - Výtěžnost pro stanovení dimethylglycinu

Přídavek ($\mu\text{mol/l}$)	Výtěžnost (%)	Průměrná výtěžnost (%)	SD (%)	CV (%)
20	91,4	97,7	6,5	6,6
40	104,3			
60	97,6			

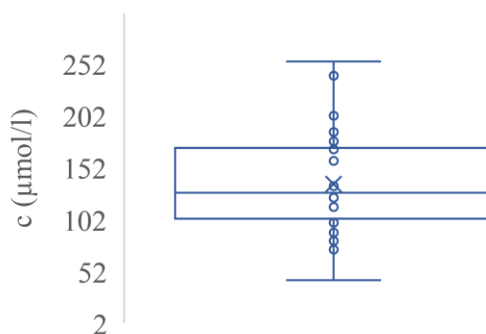
8.1.3 Stanovení betainu a dimethylglycinu u jednotlivých skupin pacientů

8.1.3.1 Kontrolní skupina

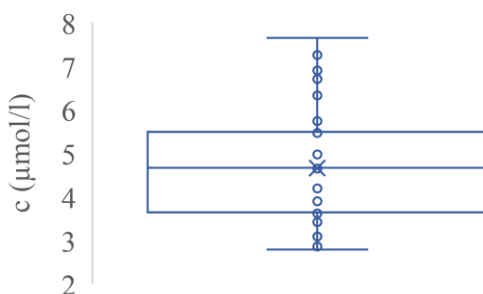
Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě se u kontrolní skupiny pohybovaly v rozmezí $135,8 \pm 47,4 \mu\text{mol/l}$ a $4,7 \pm 1,3 \mu\text{mol/l}$. Soubor obsahoval 15 mužů a žen. Výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulce 8 a na obrázcích 12 a 13. Srovnání stanovení betainu a dimethylglycinu u mužů a žen je uvedeno na obrázcích 14 a 15.

Tabulka 8 - Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě u kontrolní skupiny

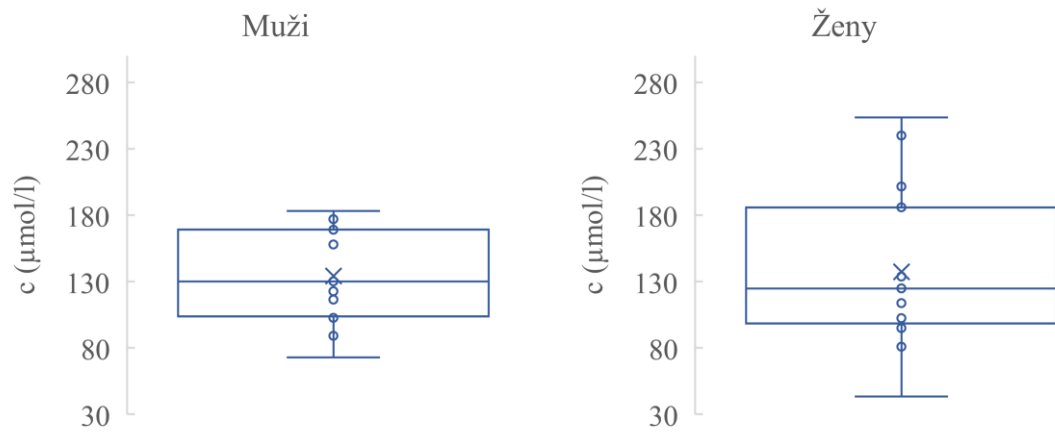
pohlaví	n	betain			dimethylglycin		
		průměr ($\mu\text{mol/l}$)	medián ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)	průměr ($\mu\text{mol/l}$)	medián ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)
muži	15	134,2	130,0	34,7	4,9	5,0	1,4
ženy	15	137,3	124,7	58,7	4,4	3,9	1,2
obojí	30	135,8	127,2	47,4	4,7	4,7	1,3



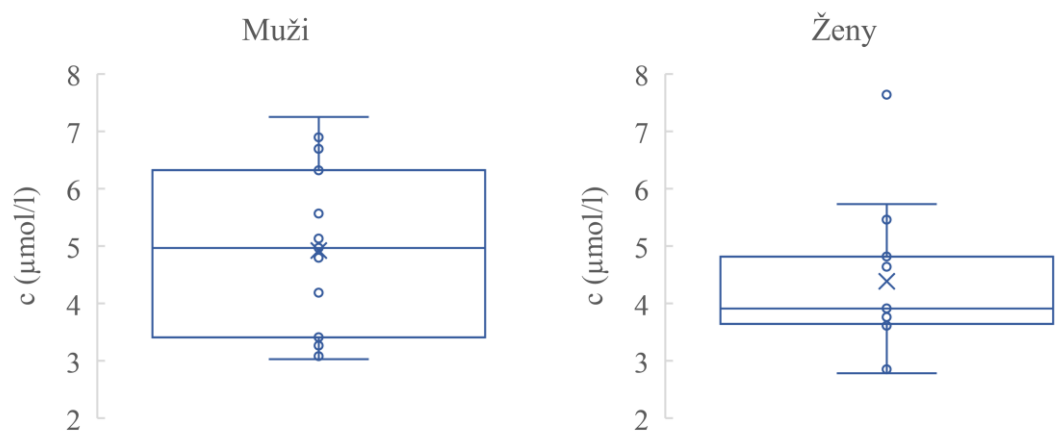
Obrázek 12 - Krabicový graf koncentrace betainu v plazmě u kontrolní skupiny



Obrázek 13 - Krabicový graf koncentrace dimethylglycinu v plazmě u kontrolní skupiny



Obrázek 14 - Srovnání plazmatické koncentrace betainu u mužů a žen



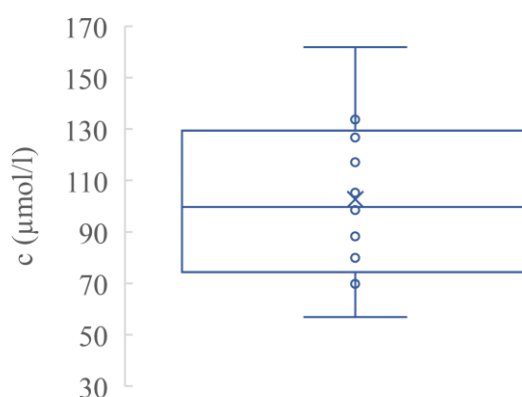
Obrázek 15 - Srovnání plazmatické koncentrace dimethylglycinu u mužů a žen

8.1.3.2 Pacienti s bolestí na hrudi a potvrzeným infarktem myokardu

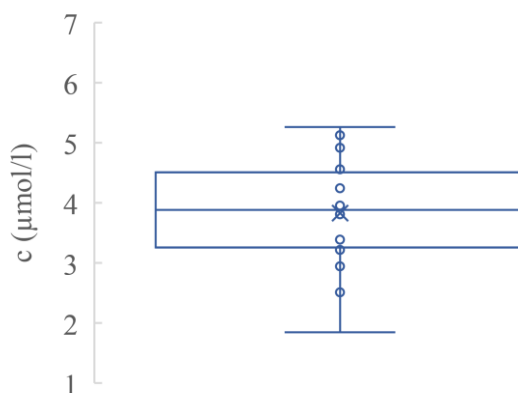
Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě se u pacientů s bolestí na hrudi a potvrzeným infarktem myokardu pohybovaly v rozmezí $102,6 \pm 28,3 \mu\text{mol/l}$ a $3,8 \pm 0,9 \mu\text{mol/l}$. Soubor obsahoval 15 mužů a 5 žen. Výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulce 9 a na obrázcích 16 a 17.

Tabulka 9 - Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě u pacientů s bolestí na hrudi a potvrzeným infarktem myokardu

pohlaví	n	Betain			dimethylglycin		
		průměr ($\mu\text{mol/l}$)	medián ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)	průměr ($\mu\text{mol/l}$)	medián ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)
muži	15	99,2	98,5	30,7	3,9	4,0	0,9
ženy	5	113,1	100,9	18,2	3,7	3,8	1,4
obojí	20	102,6	99,7	28,3	3,8	3,9	0,9



Obrázek 16 - Krabicový graf koncentrace betainu v plazmě u pacientů s bolestí na hrudi a potvrzeným infarktem myokardu



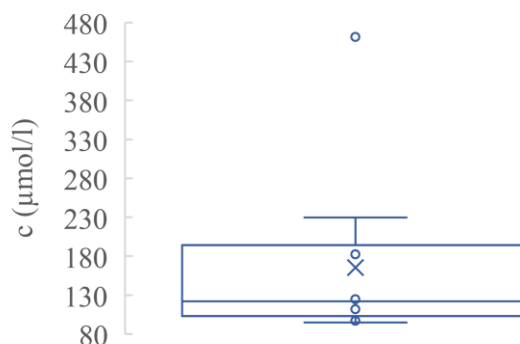
Obrázek 17 - Krabicový graf koncentrace dimethylglycinu v plazmě u pacientů s bolestí na hrudi a potvrzeným infarktem myokardu

8.1.3.3 Pacienti s bolestí na hrudi a vyloučeným infarktem myokardu

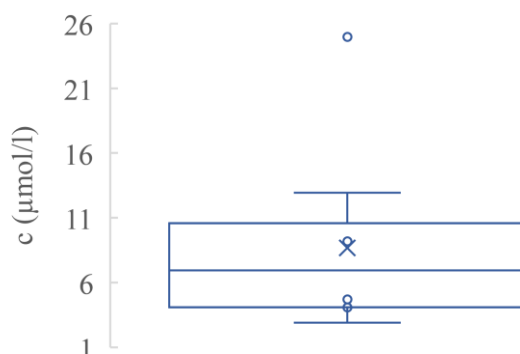
Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě se u pacientů s bolestí na hrudi a vyloučeným infarktem myokardu pohybovaly v rozmezí $165,1 \pm 112,4 \mu\text{mol/l}$ a $8,7 \pm 6,7 \mu\text{mol/l}$. Soubor obsahoval 2 muže a 8 žen. Výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulce 10 a na obrázcích 18 a 19.

Tabulka 10 – Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě u pacientů s bolestí na hrudi a vyloučeným infarktem myokardu

pohlaví	n	Betain			dimethylglycin		
		průměr ($\mu\text{mol/l}$)	medián ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)	průměr ($\mu\text{mol/l}$)	medián ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)
muži	2	153,7	123,4	40,8	8,8	9,5	5,8
ženy	8	168,0	123,4	126,3	8,6	9,5	7,2
obojí	10	165,1	121,9	112,4	8,7	6,9	6,7



Obrázek 18 - Krabicový graf koncentrace betainu v plazmě u pacientů s bolestí na hrudi a vyloučeným infarktem myokardu



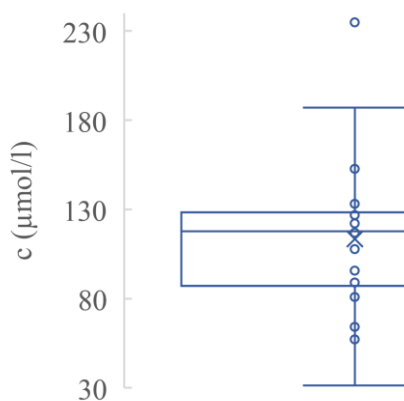
Obrázek 19 - Krabicový graf koncentrace dimethylglycinu v plazmě u pacientů s bolestí na hrudi a vyloučeným infarktem myokardu

8.1.3.4 Pacienti s diabetes mellitus a různým stupněm kompenzace

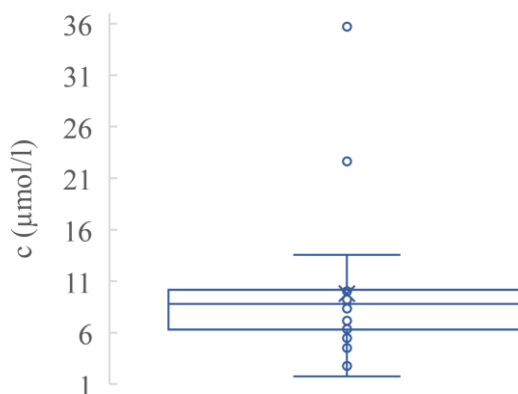
Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě se u pacientů s diabetes mellitus a různým stupněm kompenzace pohybovaly v rozmezí $113,5 \pm 44,5 \mu\text{mol/l}$ a $9,8 \pm 7,1 \mu\text{mol/l}$. Soubor obsahoval 10 mužů a 12 žen. Výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulce 11 a na obrázcích 20 a 21.

Tabulka 11 - Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě u pacientů s diabetes mellitus a různým stupněm kompenzace

pohlaví	n	betain			dimethylglycin		
		průměr ($\mu\text{mol/l}$)	medián ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)	průměr ($\mu\text{mol/l}$)	medián ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)
muži	10	107,4	113,2	57,0	13,0	9,1	9,6
ženy	12	118,5	116,9	32,4	7,2	8,7	2,2
obojí	22	113,5	117,8	44,5	9,8	8,8	7,1



Obrázek 20 - Krabicový graf koncentrace betainu v plazmě u pacientů s diabetes mellitus a různým stupněm kompenzace



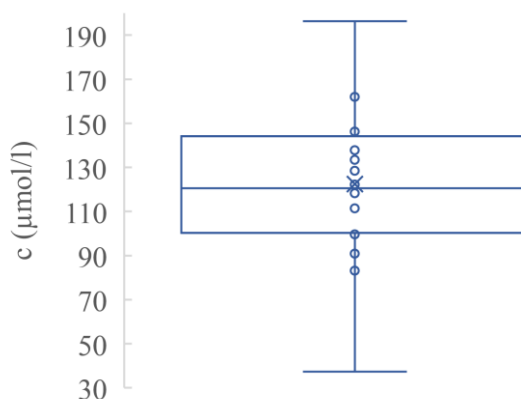
Obrázek 21 - Krabicový graf koncentrace dimethylglycinu v plazmě u pacientů s diabetes mellitus a různým stupněm kompenzace

8.1.3.5 Pacienti se selháním ledvin léčeni hemodialýzou

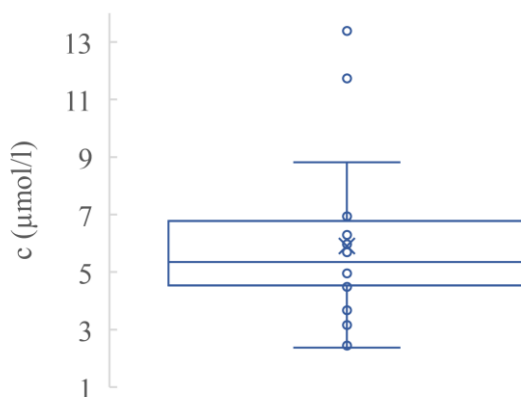
Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě se u pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou pohybovaly v rozmezí $122,5 \pm 34,0 \mu\text{mol/l}$ a $5,9 \pm 2,8 \mu\text{mol/l}$. Soubor obsahoval 17 mužů a 3 ženy. Výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulce 12 a na obrázcích 22 a 23.

Tabulka 12 - Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě u pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou

pohlaví	n	betain			dimethylglycin		
		průměr ($\mu\text{mol/l}$)	medián ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)	průměr ($\mu\text{mol/l}$)	medián ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)
muži	17	122,5	120,5	28,3	5,9	5,4	2,8
ženy	3	111,3	122,5	65,7	5,8	6,0	3,2
obojí	20	122,5	120,5	34,0	5,9	5,4	2,8



Obrázek 22 - Krabicový graf koncentrace betainu v plazmě u pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou



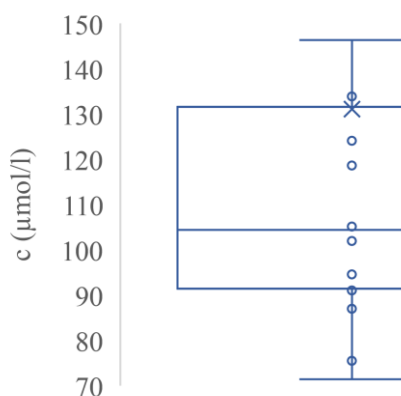
Obrázek 23 - Krabicový graf koncentrace dimethylglycinu v plazmě u pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou

8.1.3.6 Pacienti se selháním ledvin léčení hemodialýzou a diabetes mellitus

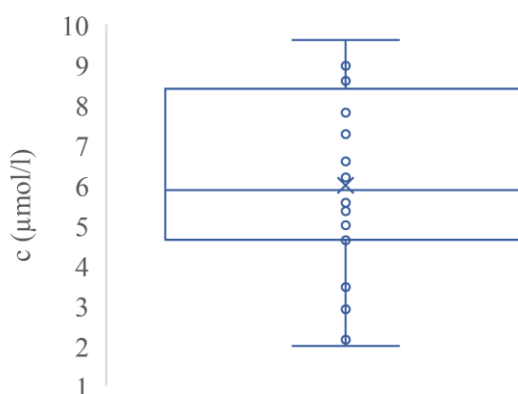
Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě se u pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou a diabetes mellitus pohybovaly v rozmezí $131,1 \pm 71,0 \mu\text{mol/l}$ a $6,0 \pm 2,4 \mu\text{mol/l}$. Soubor obsahoval 12 mužů a 8 žen. Výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulce 13 a na obrázcích 24 a 25.

Tabulka 13 - Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě u pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou a diabetes mellitus

pohlaví	n	betain			dimethylglycin		
		průměr ($\mu\text{mol/l}$)	medián ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)	průměr ($\mu\text{mol/l}$)	medián ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)
muži	12	136,7	111,9	85,9	5,9	5,9	2,2
ženy	8	99,8	103,6	15,3	5,8	6,2	2,7
obojí	20	131,1	104,4	71,0	6,0	5,9	2,4



Obrázek 24 - Krabicový graf koncentrace betainu v plazmě u pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou a diabetes mellitus



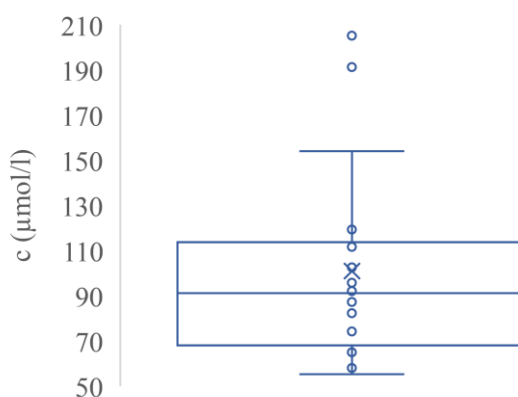
Obrázek 25 - Krabicový graf koncentrace dimethylglycinu v plazmě u pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou a diabetes mellitus

8.1.3.7 Pacienti s metabolickým syndromem a prediabetem

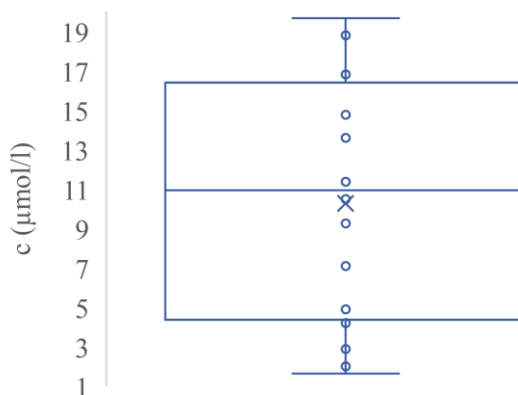
Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě se u pacientů s metabolickým syndromem a prediabetem pohybovaly v rozmezí $100,9 \pm 40,9 \mu\text{mol/l}$ a $10,3 \pm 6,2 \mu\text{mol/l}$. Soubor obsahoval 9 mužů a 11 žen. Výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulce 14 a na obrázcích 26 a 27.

Tabulka 14 - Koncentrace betainu a dimethylglycinu v plazmě u pacientů s metabolickým syndromem a prediabetem

pohlaví	N	betain			dimethylglycin		
		průměr ($\mu\text{mol/l}$)	medián ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)	průměr ($\mu\text{mol/l}$)	medián ($\mu\text{mol/l}$)	SD ($\mu\text{mol/l}$)
muži	9	87,2	86,1	32,0	10,8	12,5	7,0
ženy	11	108,5	95,7	47,6	10,0	10,5	5,7
obojí	20	100,9	91,1	40,9	10,3	10,9	6,2



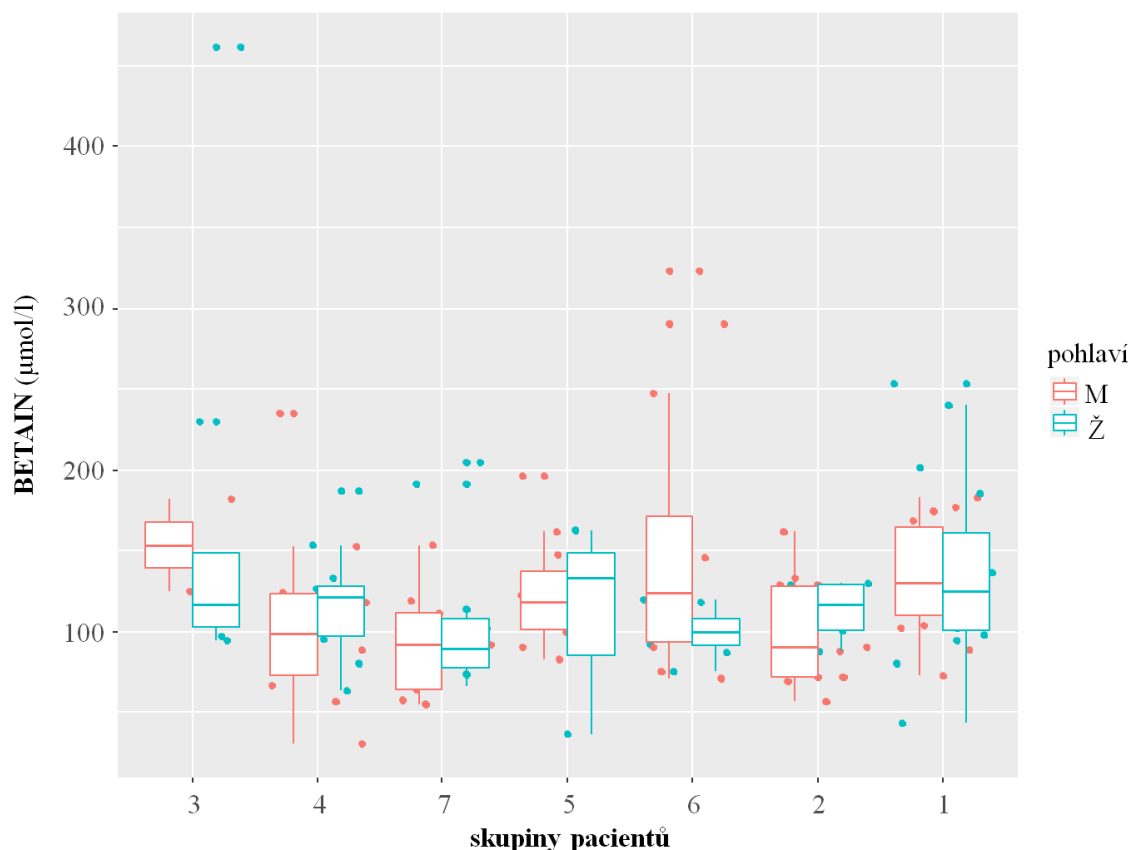
Obrázek 26 - Krabicový graf koncentrace betainu v plazmě u pacientů s metabolickým syndromem a prediabetem



Obrázek 27 - Krabicový graf koncentrace dimethylglycinu v plazmě u pacientů s metabolickým syndromem a prediabetem

8.1.3.8 Přehled výsledků stanovení betainu a dimethylglycinu

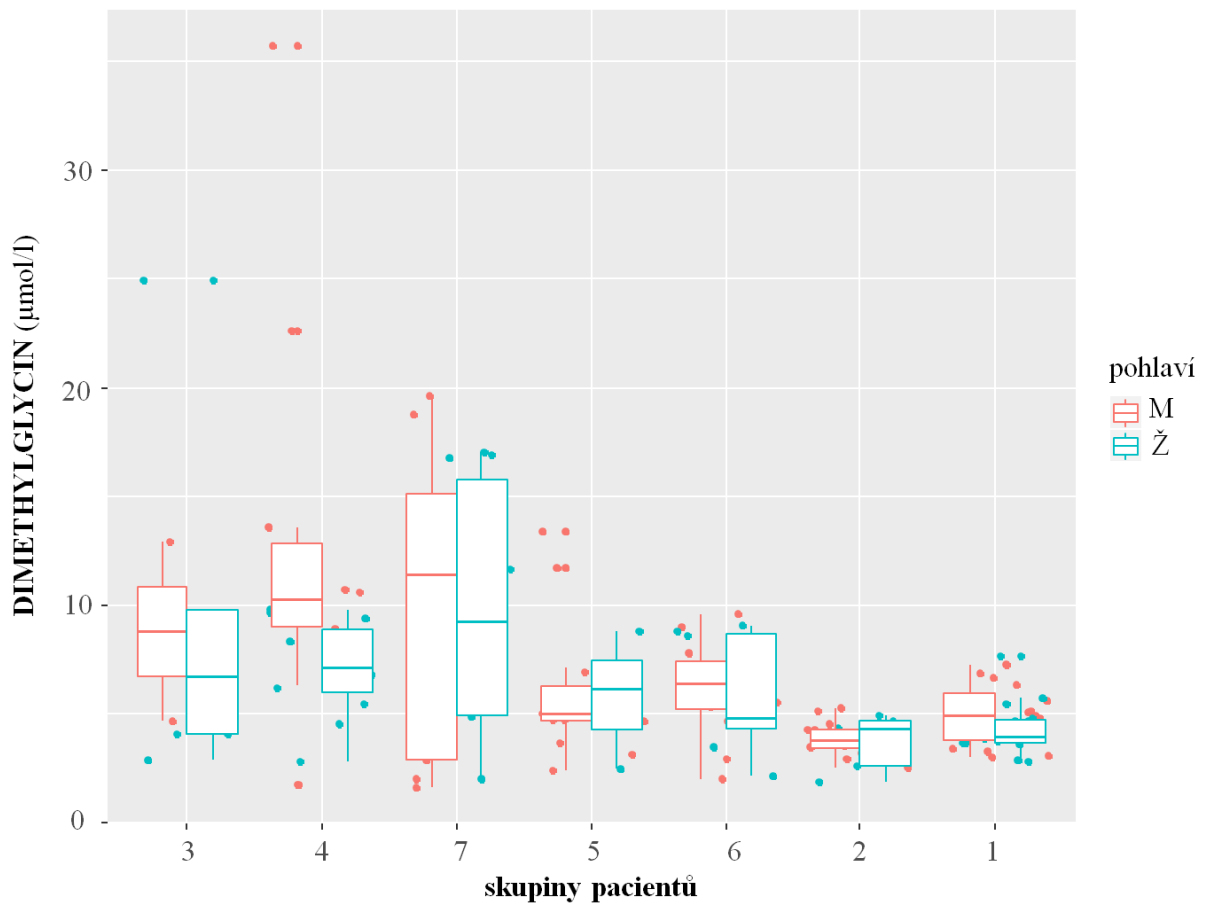
Na následujících obrázcích jsou vyobrazeny souhrnné výsledky. Na obrázku 28 jsou vyobrazené krabicové grafy pro plazmatické koncentrace betainu u jednotlivých skupin pacientů rozdělené dle pohlaví. Plazmatické koncentrace dimethylglycinu jsou obdobně vyobrazeny na obrázku 29.



Obrázek 28 - Souhrn krabicových grafů pro plazmatické koncentrace betainu u jednotlivých skupin pacientů pro muže a ženy

Legenda:

- 1 - kontrolní skupina
- 2 - pacienti s bolestí na hrudi a prokázaným infarktem myokardu
- 3 - pacienti s bolestí na hrudi a vyloučeným infarktem myokardu
- 4 - pacienti s diabetes mellitus a různým stupněm kompenzace
- 5 - pacienti se selháním ledvin léčeni hemodialýzou
- 6 - pacienti se selháním ledvin léčeni hemodialýzou a diabetes mellitus
- 7 - pacienti s metabolickým syndromem a prediabetem



Obrázek 29 - Souhrn krabicových grafů pro plazmatické koncentrace dimethylglycinu u jednotlivých skupin pacientů pro muže a ženy

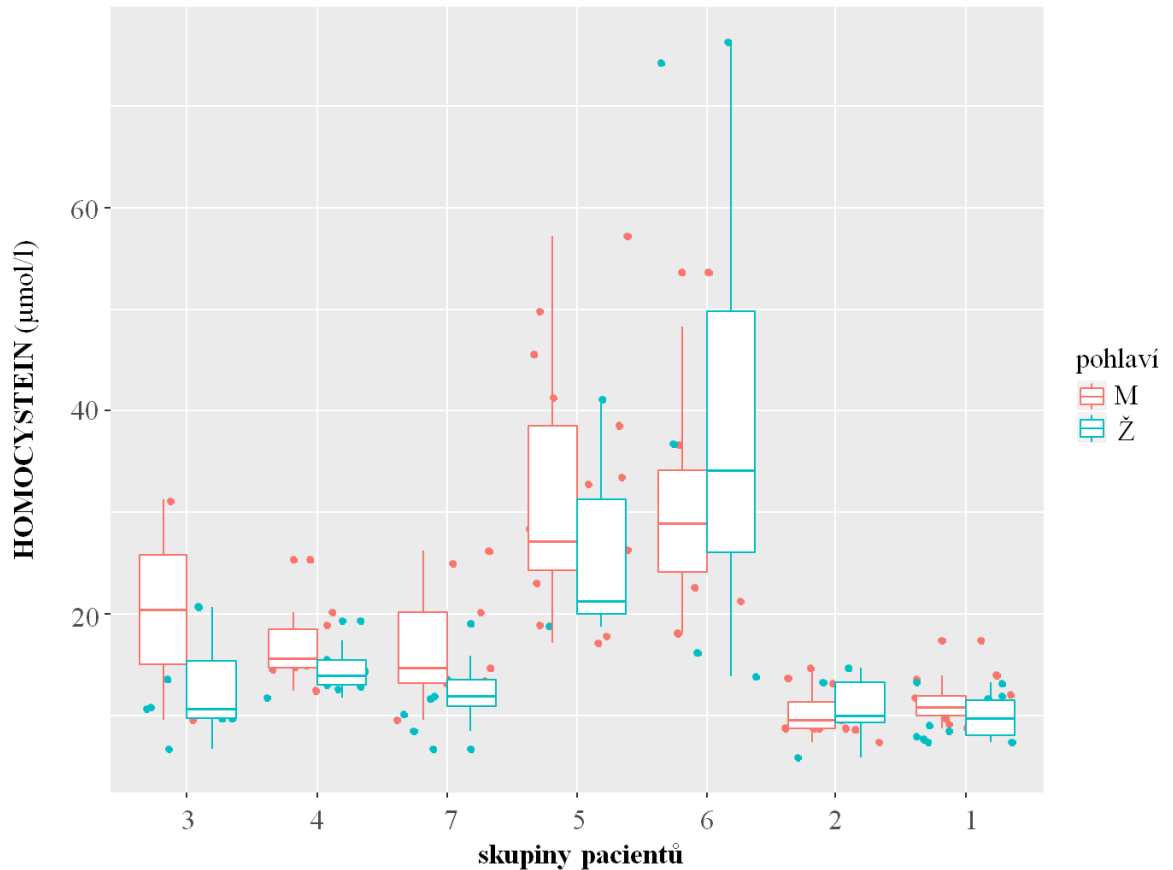
Legenda:

- 1 - kontrolní skupina
- 2 - pacienti s bolestí na hrudi a prokázaným infarktem myokardu
- 3 - pacienti s bolestí na hrudi a vyloučeným infarktem myokardu
- 4 - pacienti s diabetes mellitus a různým stupněm kompenzace
- 5 - pacienti se selháním ledvin léčeni hemodialýzou
- 6 - pacienti se selháním ledvin léčeni hemodialýzou a diabetes mellitus
- 7 - pacienti s metabolickým syndromem a prediabetem

8.2 Stanovení homocysteinu a kreatininu

8.2.1 Stanovení homocysteinu

U všech skupin pacientů byly stanoveny i plazmatické koncentrace homocysteinu, které jsou vyobrazeny na obrázku 30. Výsledky jsou rozdělené dle pohlaví.



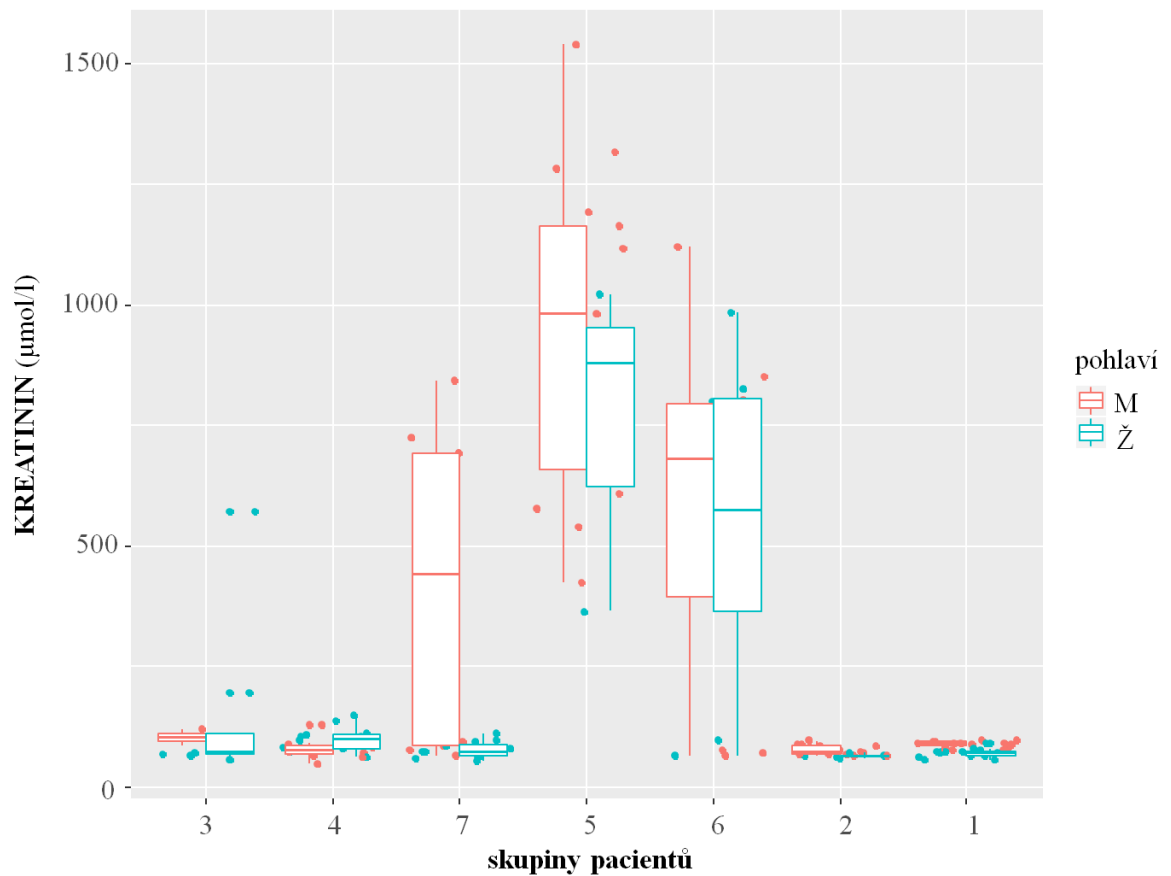
Obrázek 30 - Souhrn krabicových grafů pro plazmatické koncentrace homocysteinu u jednotlivých skupin pacientů pro muže a ženy

Legenda:

- 1 - kontrolní skupina
- 2 - pacienti s bolestí na hrudi a prokázaným infarktem myokardu
- 3 - pacienti s bolestí na hrudi a vyloučeným infarktem myokardu
- 4 - pacienti s diabetes mellitus a různým stupněm kompenzace
- 5 - pacienti se selháním ledvin léčeni hemodialýzou
- 6 - pacienti se selháním ledvin léčeni hemodialýzou a diabetes mellitus
- 7 - pacienti s metabolickým syndromem a prediabetem

8.2.2 Stanovení kreatininu

U všech skupin pacientů byly stanoveny i plazmatické koncentrace kreatininu, které jsou vyobrazeny na obrázku 31. Výsledky jsou rozdělené dle pohlaví.



Obrázek 31 - Souhrn krabicových grafů pro plazmatické koncentrace kreatininu u jednotlivých skupin pacientů pro muže a ženy

Legenda:

- 1 - kontrolní skupina
- 2 - pacienti s bolestí na hrudi a prokázaným infarktem myokardu
- 3 - pacienti s bolestí na hrudi a vyloučeným infarktem myokardu
- 4 - pacienti s diabetes mellitus a různým stupněm kompenzace
- 5 - pacienti se selháním ledvin léčeni hemodialýzou
- 6 - pacienti se selháním ledvin léčeni hemodialýzou a diabetes mellitus
- 7 - pacienti s metabolickým syndromem a prediabetem

8.2.3 Korelace

Na základě naměřených plazmatických koncentrací homocysteinu, kreatininu, betainu a dimethylglycinu byly zjištěny hodnoty korelačních koeficientů (Spearmanův korelační koeficient). Dále byl do korelační analýzy zařazen i věk pacientů a glykovaný hemoglobin u pacientů s onemocněním diabetes mellitus a různým stupněm kompenzace.

V případě posouzení celého souboru pacientů byla zjištěna významná kladná korelace (0,65) mezi plazmatickou koncentrací homocysteinu a kreatininu. Zároveň byla zjištěna méně významná kladná korelace (0,32) mezi plazmatickou koncentrací dimethylglycinu a homocysteinu.

Při vyloučení dvou skupin pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou vyšly hodnoty korelačních koeficientů opačně. Významná kladná korelace (0,53) byla mezi plazmatickou koncentrací dimethylglycinu a homocysteinu, zatímco méně významná kladná korelace (0,34) mezi plazmatickou koncentrací homocysteinu.

Grafické znázornění korelačních koeficientů pro všechny skupiny pacientů a bez pacientů se selháním ledvin léčených dialýzou jsou uvedeny v příloze 5 a 6.

9 DISKUZE

Betain a dimethylglycin jsou methylované deriváty glycinu, které souvisejí s cyklem aminokyseliny methionin. Konkrétně jde o remethylaci homocysteinu na aminokyselinu methionin díky betainu, který v cyklu slouží jako donor methylové skupiny. Po odštěpení methylové skupiny se z betainu stává dimethylglycin. Tyto dvě látky tak přímo souvisejí s homocysteinem, jehož zvýšená hladina (hyperhomocysteinémie) provází řadu patologických stavů. Mezi tyto stavy patří zejména kardiovaskulární onemocnění, onemocnění ledvin, diabetes mellitus, mutace v genu pro enzym MTHFR a v neposlední řadě také vegetariánství (popř. veganství).

Pro stanovení betainu a dimethylglycinu v plazmě byla využita mírně upravená metoda dle Laryea, konkrétně HPLC v systému obrácených fází s UV detekcí [29]. Byla použita chromatografická kolona LC-SCX HPLC o velikosti částic 5 μm o délce 25 cm a průměru 4,6 mm s odpovídající předkolonou. Separace probíhala isokraticky za použití identické mobilní fáze (složené z 900 ml acetonitrilu, 100 ml vody a 22 mmol/l cholinu) a s totožným průtokem 1,5 ml/min. Změna se týkala objemu nástřiku, který byl snížen na 10 μl kvůli přetížení kolony a obtížnější separaci. Dále byla teplota separace navýšena na 33 $^{\circ}\text{C}$ kvůli pracovním podmínkám, které neumožnily zajistit nižší stabilní teplotu po dobu celé separace. Upravena byla i celková doba analýzy, díky rychlejší eluci analytů z kolony. Separace trvala celkem 15 minut.

Retenční časy pro dimethylglycin a betain byly $4,9 \pm 0,1$ min a $5,7 \pm 0,1$ min. V našem případě byla eluce analytů rychlejší než v metodě původní. Píky byly kvantifikovány určením AUC (plochy pod křivkou). Ty byly následně vztaženy na AUC o známé koncentraci uvedených analytů ve směsné plazmě. Vyhodnocení bylo prováděno v ovládacím programu chromatografu ChromQuest.

Kalibrační křivka byla lineární v celém rozsahu použitých koncentrací a jako LOQ byl použit nejnižší bod kalibrační křivky. Preciznost, vyjádřená variačním koeficientem, pro betain a dimethylglycin vyšla 11,8 % a 10,6 %. Mezilehlá preciznost pro betain a dimethylglycin vyšla 12,3 % a 7,1 %. Průměrná výtěžnost činila 97,8 % (CV 4,0 %) pro betain a 97,7 % (CV 6,6 %) pro dimethylglycin. Preciznost a mezilehlá preciznost jsou v našem případě vyšší, než v původní metodě (CV < 5,30 %), zatímco výtěžnost vyšla obdobná.

Pro zavedení metody byly využity vzorky plazmy od 30 dárců z transfuzního oddělení Fakultní nemocnice v Plzni, které sloužily zároveň jako kontrolní skupina. Další skupiny pacientů, u nichž byl betain a dimethylglycin stanoven, byly vybírány zejména dle vztahu diagnózy k hladině homocysteinu v plazmě (hyperhomocysteinémii).

Na základě toho byla vybrána skupina pacientů přijatých do Fakultní nemocnice Plzeň s bolestí na hrudi a podezřením na infarkt myokardu. Ta byla rozdělena na pacienty, kde byl infarkt myokardu potvrzen a na pacienty, u nichž byl infarkt myokardu vyloučen. U všech těchto pacientů byla očekávána hyperhomocysteinémie s doprovázející zvýšenou hladinou dimethylglycinu, ačkoliv hladina betainu se může lišit. U pacientů s infarktem myokardu byly očekávány nižší hladiny betainu, zatímco u srdečních selhání mohou být naopak vyšší.

Další vybranou skupinou byli pacienti s diabetes mellitus a různým stupněm kompenzace, u nichž jsou kardiovaskulární onemocnění častou komplikací. Zde byla očekávána hyperhomocysteinémie doprovázená sníženou hladinou dimethylglycinu, ačkoliv hladiny betainu jsou blízké kontrolní skupině. U pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou naopak očekáváme hyperhomocysteinémii doprovázenou zvýšenou hladinou dimethylglycinu, ale s hladinami betainu blízkými kontrolní skupině. Zároveň byla vybrána i kombinace těchto dvou skupin, a to pacienti se selháním ledvin léčení hemodialýzou a diabetes mellitus.

Poslední vybranou skupinou byli pacienti s metabolickým syndromem a prediabetem, u nichž také očekáváme hyperhomocysteinémii doprovázenou zvýšenou hladinou dimethylglycinu, ale naopak se sníženou hladinou betainu.

Kontrolní skupina pacientů obsahovala celkem 30 dárců krve z transfuzního oddělení, z toho 15 mužů a žen. Plazmatické koncentrace betainu vyšly $135,8 \pm 47,4 \mu\text{mol/l}$. U mužů byly plazmatické koncentrace betainu nepatrně nižší, současně i s nižším rozptylem oproti ženám. To lze vysvětlit vysokou interindividuální variabilitou tohoto analytu a zároveň možným vlivem životosprávy (diety). Plazmatické koncentrace dimethylglycinu byly $4,7 \pm 1,3 \mu\text{mol/l}$, u mužů byly naopak nepatrně vyšší než u žen, včetně rozptylu hodnot. Průměrná plazmatická koncentrace homocysteinu vyšla $10,0 \pm 3,5 \mu\text{mol/l}$.

V původní metodě dle Laryea byly rovněž oba analyty stanovovány u kontrolní skupiny. Plazmatické koncentrace betainu zde vyšly v rozmezí od 20 do 144 $\mu\text{mol/l}$ a od 4 do 13 $\mu\text{mol/l}$ pro dimethylglycin. [29] To je v souladu s našimi naměřenými koncentracemi u kontrolní skupiny, ačkoliv koncentrace betainu jsou vyšší. Může to být způsobeno rozdílným věkem souboru (od 30 do 50 let), který byl v našem případě vyšší (od 39 do 61 let). Při stanovení odlišným derivatizačním činidlem (2-naftacyl triflát) jsou uváděny plazmatické koncentrace pro betain $38,3 \pm 5,30 \mu\text{mol/l}$ a pro dimethylglycin $2,5 \pm 0,9 \mu\text{mol/l}$. Nižší plazmatické koncentrace mohly být způsobeny rozdílným derivatizačním činidlem, pohlavím a věkem souboru, který byl tvořen pouze muži od 19 do 40 let.

Z naměřených výsledků kontrolní skupiny byly určeny referenční rozmezí, a to v intervalu od 42,9 do 228,6 $\mu\text{mol/l}$ pro betain a od 2,0 do 7,3 $\mu\text{mol/l}$ pro dimethylglycin. Získané referenční rozmezí pro betain má velký rozptyl a je celkově vyšší, než uvádí většina publikací. To samé platí v menší míře i pro dimethylglycin [31, 32, 38]. Získané referenční intervaly je třeba brát jako orientační, zejména kvůli počtu jedinců v souboru. Dále také kvůli metodě stanovení, která se dnes již prakticky nevyužívá.

Zvýšené plazmatické koncentrace obou analytů mohly být způsobeny zejména vlivem instrumentace, neboť stanovení betainu a dimethylglycinu metodou HPLC s UV detekcí již není obvyklé. Dnešním standardem je stanovení pomocí metody HLPC - MS či ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií, které dosahují mnohem větší citlivosti včetně dalších výhod. Mezi tyto výhody patří zejména rychlost analýzy, snadná příprava vzorku k analýze (bez nutnosti derivatizace), stanovení i jiných methylovaných metabolitů v rámci jedné analýzy a také možnost automatizace celého postupu. Při využití hmotnostního detektoru jsou uváděny plazmatické koncentrace betainu od 20 do 70 $\mu\text{mol/l}$ a pro dimethylglycin od 1 do 5 $\mu\text{mol/l}$ [31, 32, 38]. V tomto případě není možné naše výsledky přímo srovnávat se studii, které měří s pomocí hmotnostního detektoru, ale spíše porovnat postavení výsledků vzhledem ke kontrolní skupině.

Skupina pacientů s bolestí na hrudi byla rozdělena na pacienty, kteří prodělali infarkt myokardu a na pacienty, u nichž byl infarkt myokardu vyloučen. V případě stanovení betainu a dimethylglycinu u pacientů s potvrzeným infarktem myokardu vyšly plazmatické koncentrace betainu $102,6 \pm 28,3 \mu\text{mol/l}$ a dimethylglycinu $3,8 \pm 0,9 \mu\text{mol/l}$. Průměrná koncentrace homocysteinu byla $10,0 \pm 3,5 \mu\text{mol/l}$.

Plazmatické koncentrace betainu jsou u mužů nižší než u žen a zároveň nižší než u kontrolní skupiny, včetně nižšího rozptylu hodnot. Plazmatické koncentrace dimethylglycinu jsou přibližně stejné u obou pohlaví a jsou nižší než u kontrolní skupiny. Průměrná plazmatická koncentrace homocysteinu je blízká kontrolní skupině. Nalezené plazmatické koncentrace dimethylglycinu a homocysteinu neodpovídají odborným publikacím [22]. Důvodem může být nízký počet pacientů v souboru a dále také role homocysteinu. Hyperhomocysteinémie je sice jedním z rizikových faktorů kardiovaskulárních komplikací (a vzniku infarktu myokardu), ale není jediným, naprosto průkazným markerem. Snížená plazmatická koncentrace betainu odpovídá odborným publikacím [27].

V případě stanovení u pacientů s bolestí na hrudi s vyloučeným infarktem myokardu vyšly plazmatické koncentrace betainu $165,1 \pm 112,4 \mu\text{mol/l}$ a dimethylglycinu $8,7 \pm 6,7 \mu\text{mol/l}$. Průměrná plazmatická koncentrace homocysteinu byla $14,3 \pm 7,6 \mu\text{mol/l}$. Plazmatické koncentrace betainu jsou u mužů nižší než u žen a zároveň vyšší než u kontrolní skupiny, včetně rozptylu hodnot, což odpovídá odborné publikaci [27]. Podobně i plazmatická koncentrace dimethylglycinu je vyšší než u kontrolní skupiny, avšak přibližně stejná u mužů i u žen. Ve srovnání se skupinou pacientů s prodělaným infarktem myokardu jsou plazmatické koncentrace betainu i dimethylglycinu rovněž zvýšené. Ačkoliv tyto naměřené výsledky nebyly očekávány, mohly být způsobeny různými patologickými stavy, které vedly k bolesti na hrudi a mohly tak zasáhnout do metabolismu jednouhlíkatých zbytků a vést tak zvýšené plazmatické koncentraci homocysteinu a dimethylglycinu.

Stanovení plazmatických koncentrací betainu a dimethylglycinu u nemocných s diabetes mellitus a různým stupněm kompenzace vyšly $113,5 \pm 44,5 \mu\text{mol/l}$ a $9,8 \pm 7,1 \mu\text{mol/l}$. Průměrná plazmatická koncentrace homocysteinu vyšla $15,6 \pm 3,2 \mu\text{mol/l}$. Plazmatické koncentrace betainu jsou u mužů nižší než u žen a zároveň nižší než u kontrolní skupiny, ale s podobným rozptylem hodnot. To přibližně odpovídá odborným publikacím, které u pacientů s diabetes mellitus zaznamenali koncentrace podobné zdravým jedincům [39, 40]. Plazmatické koncentrace dimethylglycinu jsou u mužů nepatrně vyšší než u žen a vyšší než u kontrolní skupiny, což naopak neodpovídá výsledkům uváděným v odborné publikaci [40]. Plazmatické koncentrace homocysteinu pravděpodobně odrážejí míru rizika kardiovaskulárních komplikací.

U pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou vyšly plazmatické koncentrace betainu a dimethylglycinu $122,5 \pm 34,0 \mu\text{mol/l}$ a $5,9 \pm 2,8 \mu\text{mol/l}$. Průměrná plazmatická koncentrace homocysteinu zde vyšla $30,8 \pm 11,4 \mu\text{mol/l}$. Plazmatické koncentrace betainu jsou u mužů vyšší než u žen a přibližně odpovídají hodnotám naměřených u kontrolní skupiny, což odpovídá odborným publikacím [22, 45]. Plazmatické koncentrace dimethylglycinu jsou u mužů nižší než u žen a zároveň jsou vyšší ve srovnání s kontrolní skupinou [22, 43]. Průměrná plazmatická koncentrace homocysteinu je zde poměrně vysoká a hladina dimethylglycinu ji neumožňuje predikovat tak, jak je uvedeno v odborné publikaci [45]. To lze vysvětlit např. úspěšným plánem léčby onemocnění (vhodně zvolenými intervaly mezi jednotlivými hemodialýzami), které vedou k normalizaci plazmatické koncentrace dimethylglycinu nebo nejednoznačným vlivem selhání ledvin na metabolismus jednovuhlíkatých zbytků.

U kombinace dvou předešlých skupin, u pacientů se selháním ledvin a diabetes mellitus, vyšly plazmatické koncentrace betainu a dimethylglycinu $131,1 \pm 71,0 \mu\text{mol/l}$ a $6,0 \pm 2,4 \mu\text{mol/l}$. Průměrná plazmatická koncentrace homocysteinu vyšla nejvyšší ze všech testovaných skupin, a to $35 \pm 17,5 \mu\text{mol/l}$. Plazmatické koncentrace betainu jsou vyšší u mužů než u žen a jsou podobné kontrolní skupině, což odpovídá odborným publikacím [22, 39, 40, 45]. Zároveň jsou ale vyšší než u skupiny pouze se selháním ledvin. To samé se projevilo u skupiny pacientů pouze s diabetes mellitus, kteří mají různý stupeň kompenzace oproti řádně kompenzovaným diabetikům se selháním ledvin. Plazmatické koncentrace dimethylglycinu jsou u žen nepatrně vyšší než u mužů a jsou podobné hodnotám u skupiny s onemocněním ledvin. To platí i pro hladinu homocysteinu a tak lze říci, že hladiny těchto dvou analytů jsou v případě onemocnění ledvin poměrně stálé.

U pacientů s metabolickým syndromem a prediabetem vyšly plazmatické koncentrace betainu a dimethylglycinu $100,9 \pm 40,9 \mu\text{mol/l}$ a $10,3 \pm 6,2 \mu\text{mol/l}$. Průměrná plazmatická koncentrace homocysteinu vyšla $14,4 \pm 5,0 \mu\text{mol/l}$. Nalezené plazmatické koncentrace odpovídají odborným publikacím [22, 46, 47]. Plazmatické koncentrace betainu jsou u mužů nižší než u žen a zároveň nižší než u kontrolní skupiny, podobně jako u skupiny pacientů s bolestí na hrudi a potvrzeným infarktem myokardu, ale s vyšším rozptylem. Plazmatické koncentrace dimethylglycinu jsou vyšší u mužů než u žen a jsou zde nejvyšší v celé testované skupině, ačkoliv jsou podobné pacientům s diabetes mellitus.

Na základě naměřených plazmatických koncentrací betainu, dimethylglycinu, homocysteinu a kreatininu byly zjištěny hodnoty korelačních koeficientů (Spearmanův korelační koeficient). Dále byl zahrnut věk a u pacientů s onemocněním diabetes mellitus a různým stupněm kompenzace také plazmatická koncentrace glykovaného hemoglobinu.

V případě posouzení celého souboru pacientů byla zjištěna významná kladná korelace (0,65) mezi plazmatickou koncentrací homocysteinu a kreatininu, která je způsobena přítomností dvou skupin pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou. Dále byla zjištěna méně významná kladná korelace (0,32) mezi plazmatickou koncentrací dimethylglycinu a homocysteinu.

Při vyloučení dvou skupin pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou byly hodnoty korelačních koeficientů opačné. V tomto případě byla významná kladná korelace (0,53) mezi plazmatickou koncentrací dimethylglycinu a homocysteinu, zatímco mezi plazmatickou koncentrací homocysteinu a kreatininu byla výrazně nižší (0,34). To dokazuje výrazný rušivý vliv pacientů se selháním ledvin způsobený jejich hyperhomocysteinémií spojenou se zvýšenou plazmatickou koncentrací kreatininu. Dá se tedy předpokládat, že dimethylglycin může u pacientů s hyperhomocysteinémií působit patofyziologicky [27].

10 ZÁVĚR

Cílem této diplomové práce bylo zavedení metody stanovení betainu a dimethylglycinu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s UV detekcí ve vzorcích lidské plazmy. Dále stanovení těchto analytů u vybraných skupin pacientů.

Hodnoty preciznosti v sérii a mezilehlé preciznosti vyjádřené CV jsou vyšší než v původní metodě stanovení, ačkoliv hodnoty výtěžnosti jsou obdobné.

Referenční rozmezí získaná měření u kontrolní skupiny vyšly od 42,9 do 228,6 $\mu\text{mol/l}$ pro betain a od 2,0 do 7,3 $\mu\text{mol/l}$ pro dimethylglycin. Získaná referenční rozmezí jsou však pouze orientační, zejména kvůli počtu jedinců kontrolní skupiny a dnes již téměř nevyužívané metodě stanovení.

Pouze u pacientů s metabolickým syndromem a prediabetem jsme zaznamenali srovnatelné výsledky, které jsou uváděny v odborných publikacích. V ostatních případech se naměřené výsledky od odborných publikací lišily. Dokonce ani u pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou nebo u pacientů s prodělaným infarktem myokardu nebyly prokázány žádné výrazné změny. I přesto byla v rámci všech skupin pacientů zjištěna kladná korelace mezi hladinou dimethylglycinu a homocysteinu, která však byla významnější při vyloučení dvou skupin pacientů se selháním ledvin.

Ačkoliv byla metoda zavedena, doporučujeme stanovení methylovaných derivátů betainu a dimethylglycinu metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií. Oproti námi zavedené metodě disponuje větší citlivostí, rychlostí analýzy, snazší přípravou vzorku k analýze (bez nutnosti derivatizace) a také možností automatizace celého procesu stanovení.

11 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SHUVALOV O., A. PETUKHOV, A. DAKS, O. FEDOROVA, E. VASILEVA a N. A. BARLEV. *One-carbon metabolism and nukleotide biosynthesis as attractive targets for anticancer therapy*. Oncotarget [online]. 2017, 8(14) [cit. 2017-10-26]. ISSN 1949-2553. DOI: 10.18632/oncotarget.15053. Dostupné z: <http://www.oncotarget.com/abstract/15053>
- [2] RAJDL D., J. RACEK, L. TREFIL, P. STEHLIK, J. DOBRA a V. BABUSKA. *Effect of Folic Acid, Betaine, Vitamin B6, and Vitamin B12 on Homocysteine and Dimethylglycine Levels in Middle-Aged Men Drinking White Wine*. Nutrients [online]. 2016, 8(1) [cit. 2017-10-26]. ISSN 2072-6643. DOI: 10.3390/nu8010034
Dostupné z: <http://www.mdpi.com/2072-6643/8/1/34>
- [3] MURRAY R. K., D. A. BENDER, K. M. BOTHAM, P. J. KENNELLY, V. W. RODWELL a P. A. WEIL. *Harperova ilustrovaná biochemie*. Praha: Galén, 2012, 730 s. ISBN 978-80-726-2907-7.
- [4] HYÁNEK J., L. DUBSKÁ, H. PEJZNOCHOVÁ, F. PEHAL, S. VAINGÁTOVÁ a V. MARTINÍKOVÁ. *Hyperhomocysteinémie – nepoznané, nepoznatelné a zanedbané (homocystein – užitečný marker methylačních poruch z deficitu holotranskobalaminu a folátu)*. Klinická biochemie a metabolismus. 2009, 17(2), 83-92. ISSN 1210-7921.
- [5] POKORNÝ M. *Role betainu v metabolismu homocysteinu. Význam pro plodnost a reprodukci*. New EU Magazine of Medicine [online]. 2015, (1-4) [cit. 2017-10-26]. ISSN 1802-1298. Dostupné z: http://www.neumm.cz/public/NEUMM_1-4_2014_Role_betainu.pdf
- [6] CRAIG S. AS. *Betaine in human nutrition*. The American Journal of Clinical Nutrition [online]. 2004, 80(3) [cit. 2017-10-26]. ISSN 1938-3207. Dostupné z: <http://ajcn.nutrition.org/content/80/3/539.long#fn-1>
- [7] ZEMPLENI, J., J. W. SUTTIE, J. F. GREGORY III a P. J. STOVER. *Handbook of vitamins* [online]. Fifth edition. Hoboken: CRC Press, 2014 [cit. 2017-10-26]. ISBN 9781466515574. Dostupné z: https://books.google.cz/books?id=IEHSBQAAQBAJ&printsec=copyright&hl=cs&source=gb_s_pub_info_r#v=onepage&q&f=false
- [8] KOOLMAN J. a K. H. RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012, 512 s. ISBN 978-80-247-2977-0.

- [9] SAHR T., S. RAVANEL a F. RÉBEILLÉ. *Tetrahydrofolate biosynthesis and distribution in higherplants*. Biochemical Society Transactions [online]. 2005, 33(4) [cit. 2017-11-02]. ISSN 0300-5127. DOI: 10.1042/BST0330758. Dostupné z: <http://biochemsoctrans.org/lookup/doi/10.1042/BST0330758>
- [10] LAI W. K. C. a M. Y. KAN. *Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction*. *Annals of Nutrition and Metabolism* [online]. 2015, 67(1) [cit. 2017-11-02]. ISSN 0250-6807. DOI: 10.1159/000437098. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/437098>
- [11] C. SHUFEN, N. LI, M. DEB-CHATTERJI, Q. DONG, J. KIELSTEIN, K. WEISSENBORN a H. WORTHMANN. *Asymmetric Dimethylarginine as Marker and Mediator in Ischemic Stroke*. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2012, 13(12) [cit. 2017-11-02]. ISSN 1422-0067. DOI: 10.3390/ijms131215983. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1422-0067/13/12/15983/>
- [12] RACEK J. *Oxid dusnatý, oxid uhelnatý a sirovodík - jedovaté plyny či potřebné regulátory metabolismu?* Labor Aktuell [online]. 2012, 11(3) [cit. 2017-11-02]. Dostupné z: http://www.roche-diagnostics.cz/content/dam/diagnostics_czechrepublic/cs_CZ/documents/Labor_Aktuell/LA2012/LA0312/Oxiddusnaty_profRacek.pdf
- [13] BAHLS M., N. FRIEDRICH, D. ATZLER, S. B. FELIX, M. A. NAUCK, R. H. BÖGER, H. VÖLZKE, E. SCHWEDHELM a M. DÖRR. *L-Arginine and SDMA Serum Concentrations Are Associated with Subclinical Atherosclerosis in the Study of Healthin Pomerania (SHIP)*. PLOS ONE [online]. 2015, 10(6) [cit. 2017-11-02]. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0131293. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0131293>
- [14] JACOBI J. a P. S. TSAO. *Asymmetrical Dimethylarginine in Renal Disease: Limits of Variation or Variation Limits?* American Journal of Nephrology [online]. 2008, 28(2) [cit. 2017-11-02]. ISSN 0250-8095. DOI: 10.1159/000110092. Dostupné z: <https://www.karger.com/Article/FullText/110092>
- [15] ŠIROKÁ R., L. TREFIL, D. RAJDL, J. RACEK, H. RUSŮÁKOVÁ a J. EISELT. *Asymetrický dimethylarginin, homocystein a funkce ledvin*. *Klinická biochemie a metabolismus* [online]. 2005, 13(4) [cit. 2017-11-02]. ISSN 1210-7921. Dostupné z: <http://nts.prolekare.cz/cls/odkazy/KBM20054-184.pdf>

- [16] DAY C. R. a S. A. KEMPSON. *Betaine chemistry, roles, and potential use in liver disease*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects [online]. 2016, 1860 (6) [cit. 2017-11-02]. ISSN 03044165. DOI: 10.1016/j.bbagen.2016.02.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416516300149>
- [17] PREEDY, V. R. *Betaine: chemistry, analysis, function and effects* [online]. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2015 [cit. 2017-11-02]. ISBN 978-1-78262-844-6. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=J3UoDwAAQBAJ&pg=PR2&lpg=PR2&dq=Betaine:+chemistry,+analysis,+function+and+effects&source=bl&ots=mSY8xvcUvi&sig=QRWP-891MJmFBZt7wdgvIXwakjc&hl=cs&sa=X&ved=0ahUKEwjFmZDI9KLaAhXJB5oKHRKsBO0Q6AEIXDAG#v=onepage&q&f=false>
- [18] *Betaine*. Sigma-Aldrich [online]. ©2018 [cit. 2017-11-02]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/betaine1171510743711?lang=en&ion=CZ>
- [19] *N,N-Dimethylglycin*. Sigma-Aldrich [online]. ©2018 [cit. 2017-11-02]. Dostupné z: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/nndimethylglycine10312111868911?lang=en®ion=CZ>
- [20] FRIESEN R. W., E. M. NOVAK, D. HASMAN a S. M. INNIS. *Relationship of Dimethylglycine, Choline, and Betaine with Oxoproline in Plasma of Pregnant Women and Their Newborn Infants*. *The Journal of Nutrition* [online]. 2007, 137(12) [cit. 2017-11-02]. ISSN 1541-6100. Dostupné z: <http://jn.nutrition.org/content/137/12/2641.full>
- [21] CLOW K. A., J. R. TREBERG, M. E. BROSANAN a J. T. BROSANAN. *Elevated Tissue Betaine Contents in Developing Rats Are Due to Dietary Betaine, Not to Synthesis*. *The Journal of Nutrition* [online]. 2008, 138(9) [cit. 2017-11-02]. ISSN 1541-6100. Dostupné z: <http://jn.nutrition.org/content/138/9/1641.full>
- [22] LEVER M., P. M. GEORGE, J. L. ELMSLIE, W. ATKINSON, S. SLOW, S. L. MOLYNEUX, R. W. TROUGHTON, A. M. RICHARDS, CH. M. FRAMPTON a S. T. CHAMBERS. *Betaine and Secondary Events in an Acute Coronary Syndrome Cohort*. PLOS ONE [online]. 2012, 7(5) [cit. 2017-11-02]. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0037883. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0037883>

- [23] HERRMANN, W. a R. OBEID. *Vitamins in the prevention of human diseases* [online]. New York: Walter de Gruyter, 2011 [cit. 2017-11-02]. ISBN 978-311-0214-482. Dostupné z: <https://books.google.cz/books?id=b9ahvNjPFO8C&printsec=frontcover&hl=cs#v=onepage&q&f=false>
- [24] MAILLOUX R. J., A. YOUNG, J. CHALKER, D. GARDINER, M. O'BRIEN, L. SLADE a J. T. BROSANAN. *Choline and dimethylglycine produce superoxide/hydrogen peroxide from the electron transport chain in liver mitochondria*. FEBS Letters [online]. 2016, 590(23) [cit. 2017-12-04]. ISSN 00145793. DOI: 10.1002/1873-3468.12461. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/1873-3468.12461>
- [25] SOOKOIAN S., P. PURI, G. O. CASTAÑO, R. SCIAN, F. MIRSHAHI, A. J. SANYAL a C. J. PIROLA. *Non alcoholic steatohepatitis is associated with a state of betaine-insufficiency*. Liver International. 2017, 37(4) [cit. 2017-12-04]. ISSN 14783223. DOI: 10.1111/liv.13249. Dostupné také z: <http://doi.wiley.com/10.1111/liv.13249>
- [26] KATHIRVEL E., K. MORGAN, G. NANDGIRI, B. C. SANDOVAL, M. A. CAUDILL, T. BOTTIGLIERI, S. W. FRENCH a T. R. MORGAN. *Betaine improves non alcoholic fatty liver and associated hepatic insulin resistance: a potential mechanism for hepatoprotection by betaine*. AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology [online]. 2010, 299(5) [cit. 2017-12-04]. ISSN 0193-1857. DOI: 10.1152/ajpgi.00249.2010. Dostupné z: <http://ajpgi.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpgi.00249.2010>
- [27] TVEITEVAG SVINGEN, G. F., P. M. UELAND, E. K. R. PEDERSEN, H. SCHARTUM-HANSE, R. SEIFERT, M. EBBING, K. H. LOLAND, G. S. TELL a O. NYGARD. *Plasma Dimethylglycine and Risk of Incident Acute Myocardial Infarction in Patients With Stable Angina Pectoris*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology [online]. 2013, 33(8) [cit. 2017-12-04]. ISSN 1079-5642. DOI: 10.1161/ATVBAHA.113.301714. Dostupné z: <http://atvb.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/ATVBAHA.113.301714>
- [28] STORER, M. K. a M. LEVER. *Aracyl triflates for preparing fluorescent and UV absorbing derivatives of unreactive carboxylates, amines and other metabolites*. Analytica Chimica Acta [online]. 2006, 558(1-2) [cit. 2017-12-04]. ISSN 00032670. DOI: 10.1016/j.aca.2005.10.060. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267005017940>

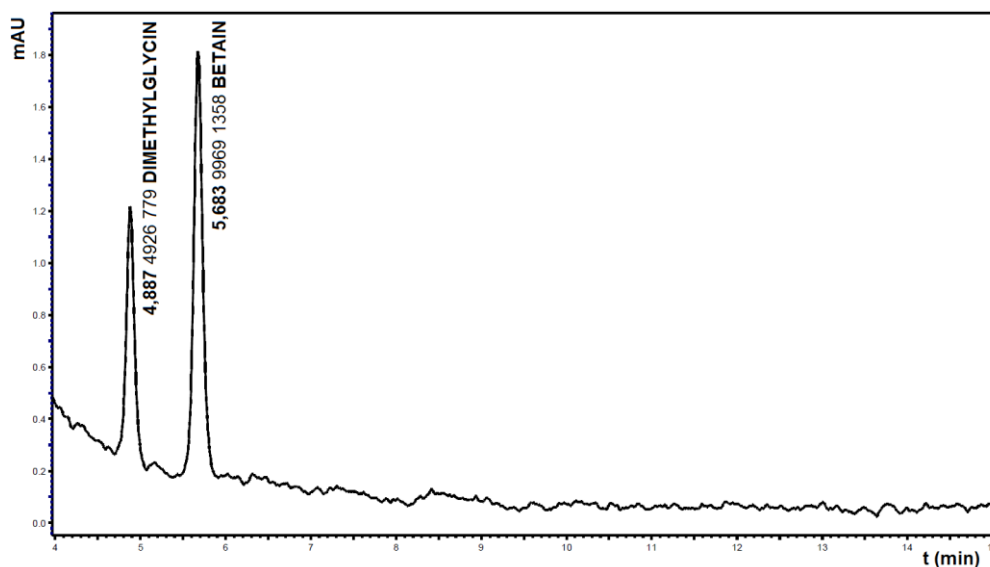
- [29] LARYEA M. D., F. STEINHAGEN, S. PAWLICZEK a U. WENDEL. *Simple method for the routine determinativ of betaine and N,N-dimethylglycine in blood and urine*. *Clinical Chemistry* [online]. 1998, 44(9) [cit. 2017-12-04]. ISSN 1530-8561. Dostupné z: <http://clinchem.aaccjnls.org/content/44/9/1937>
- [30] TCI EUROPE N. V., Belgie. *HPLC Labeling Reagents*. [cit. 2017-12-04] 103 s. Dostupné z: <http://www.tcichemicals.com/pdf/A1096E.pdf>
- [31] LEVER M., L. BASON, C. LEAVER, C. M. HAYMAN a S. T. CHAMBERS. *Same-day batch measurement of glycine betaine, carnitine, and other betaines in biological material*. *Analytical Biochemistry* [online]. 1992, 205(1) [cit. 2017-12-04]. ISSN 00032697. DOI: 10.1016/0003-2697(92)90572-O. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/000326979290572O>
- [32] HOLM P. I. *Determination of Choline, Betaine, and Dimethylglycine in Plasma by a High-Throughput Method Based on Normal-Phase Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*. *Clinical Chemistry* [online]. 2003, 49(2) [cit. 2017-12-04]. ISSN 0009-9147. DOI: 10.1373/49.2.286. Dostupné z: <http://www.clinchem.org/cgi/doi/10.1373/49.2.286>
- [33] KIRSCH S. H., W. HERRMANN, Y. RABAGNY a R. OBEID. *Quantification of acetylcholine, choline, betaine, and dimethylglycine in human plasma and urine using stable-isotope dilution ultra performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. *Journal of Chromatography B* [online]. 2010, 878(32) [cit. 2017-12-04]. ISSN 15700232. DOI: 10.1016/j.jchromb.2010.10.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1570023210006501>
- [34] FORTESCHI M., A. ZINELLU, S. ASSARETTI, A. A. MANGONI, G. PINTUS, C. CARRU a S. SOTGIA. *An isotope dilution capillary electrophoresis/tandem mass spectrometry (CE-MS/MS) method for the simultaneous measurement of choline, betaine, and dimethylglycine concentrations in human plasma*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* [online]. 2016, 408(26) [cit. 2017-12-04]. ISSN 1618-2642. DOI: 10.1007/s00216-016-9848-6. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00216-016-9848-6>
- [35] IMBARD A., J. F. BENOIST, R. ESSE, S. GUPTA, S. LEBON, A. S. DE VRIESE, H. O. DE BAULNY, W. KRUGER, M. SCHIFF a H. J. BLOOM. *High homocysteine induces betaine depletion*. *Bioscience Reports* [online]. 2015, 35(4) [cit. 2018-25-01]. ISSN 0144-8463. DOI: 10.1042/BSR20150094. Dostupné z: <http://bioscirep.org/cgi/doi/10.1042/BSR20150094>

- [36] LEVER M., P. M. GEORGE, S. SLOW, D. BELLAMY, J. M. YOUNG, M. HO, CH. J. McENTYRE, J. L. ELMSLIE, W. ATKINSON, S. L. MOLYNEUX, R. W. TROUGHTON, CH. M. FRAMPTON, A. M. RICHARDS a S. T. CHAMBERS. *Betaine and Trimethylamine-N-Oxide as Predictors of Cardiovascular Outcomes Show Different Patterns in Diabetes Mellitus: An Observational Study*. PLOS ONE [online]. 2014, 9(12) [cit. 2018-25-01]. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0114969. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0114969>
- [37] LEVER M., W. ATKINSON, S. SLOW, S. T. CHAMBERS a P. M. GEORGE. *Plasma and urine betaine and dimethylglycine variation in healthy young male subjects*. Clinical Biochemistry [online]. 2009, 42(7-8) [cit. 2018-25-01]. ISSN 00099120. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2009.02.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0009912009000812>
- [38] ALLEN R. H., S. P. STABLER a J. LINDENBAUM. *Serum betaine, N,N-dimethylglycine and N-methylglycine levels in patients with cobalamin and folate deficiency and related inborn errors of metabolism*. Metabolism [online]. 1993, 42(11) [cit. 2018-25-01]. ISSN 00260495. DOI: 10.1016/0026-0495(93)90198-W. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/002604959390198W>
- [39] LEVER M., Sandy S., D. O. MCGREGOR, W. J. DELLOW, P. M. GEORGE a S. T. CHAMBERS. *Variability of plasma and urine betaine in diabetes mellitus and its relationship to methionine load test responses: an observational study*. Cardiovascular Diabetology [online]. 2012, 11(1) [cit. 2018-25-01]. ISSN 1475-2840. DOI: 10.1186/1475-2840-11-34. Dostupné z: <http://cardiab.biomedcentral.com/articles/10.1186/1475-2840-11-34>
- [40] MAGNUSSON M., T. J. WANG, C. CLISH, G. ENGSTRÖM, P. NILSSON, R. E. GERSZTEN a O. MELANDER. *Dimethylglycine Deficiency and the Development of Diabetes*. Diabetes [online]. 2015, 64(8) [cit. 2018-25-01]. ISSN 0012-1797. DOI: 10.2337/db14-1863. Dostupné z: <http://diabetes.diabetesjournals.org/lookup/doi/10.2337/db14-1863>

- [41] SCHARTUM-HANSEN H., P. M. UELAND, E. R. PEDERSEN, K. MEYER, M. EBBING, Ø. BLEIE, G. F. T. SVINGEN, R. SEIFERT, B. E. VIKSE a O. NYGÅRD. *Assessment of Urinary Betaine as a Marker of Diabetes Mellitus in Cardiovascular Patients*. PLOS ONE [online]. 2013, 8(8) [cit. 2018-25-01]. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0069454. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0069454>
- [42] LEVER M., CH. J. MCENTYRE, P. M. GEORGE, S. SLOW, J. L. ELMSIE, H. LUNT, S. T. CHAMBERS, A. PARRY-STRONG a J. D. KREBS. *Extreme Urinary Betaine Losses in Type 2 Diabetes Combined with Bezafibrate Treatment are Associated with Losses of Dimethylglycine and Choline but not with Increased Losses of Other Osmolytes*. Cardiovascular Drugs and Therapy [online]. 2014, 28(5) [cit. 2018-25-01]. ISSN 0920-3206. DOI: 10.1007/s10557-014-6542-9. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10557-014-6542-9>
- [43] MCGREGOR D. O., W. J. DELLOW, R. A. ROBSON, M. LEVER, P. M. GEORGE a S. T. CHAMBERS. *Betaine supplementation decreases post-methionine hyperhomocysteinemia in chronic renal failure*. Kidney International [online]. 2002, 61(3) [cit. 2018-25-01]. ISSN 00852538. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2002.00199.x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815483139>
- [44] VAN GULDENER C. *Why is homocysteine elevated in renal failure and what can be expected from homocysteine-lowering?* Nephrology Dialysis Transplantation [online]. 2006, 21(5) [cit. 2018-25-01]. ISSN 1460-2385. DOI: 10.1093/ndt/gfl044. Dostupné z: <https://academic.oup.com/ndt/article/21/5/1161/1822259>
- [45] MCGREGOR D. O., W. J. DELLOW, M. LEVER, P. M. GEORGE, R. A. ROBSON a S. T. CHAMBERS. *Dimethylglycine accumulates in uremia and predicts elevated plasma homocysteinu concentrations*. Kidney International [online]. 2001, 59(6) [cit. 2018-25-01]. ISSN 00852538. DOI: 10.1046/j.1523-1755.2001.00743.x. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0085253815477221>
- [46] LEVER M., S. SLOW, P. M. GEORGE a S. T. CHAMBERS. *Betaine excretion correlates with plasma homocysteine when plasma lipids are elevated*. Clinical Biochemistry [online]. 2012, 45(1-2) [cit. 2018-25-01]. ISSN 00099120. DOI: 10.1016/j.clinbiochem.2011.10.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000991201102707X>

[47] LEVER M., P. M. GEORGE, W. ATKINSONS. L. MOLYNEUX, J. L. ELMSIE, S. SLOW, A. M. RICHARDS a S. T. CHAMBERS. *Plasma Lipids and Betaine Are Related in an Acute Coronary Syndrome Cohort*. PLOS ONE [online]. 2011, 6(7) [cit. 2018-25-01]. ISSN 1932-6203. DOI: 10.1371/journal.pone.0021666. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0021666>

12 PŘÍLOHY



Příloha 1 - Chromatografický záznam směsného standardu dimethylglycinu ($t_R = 4,887$, $AUC = 4926$, $h = 779$) a betainu ($t_R = 5,683$, $AUC = 9969$, $h = 1358$).

Legenda:

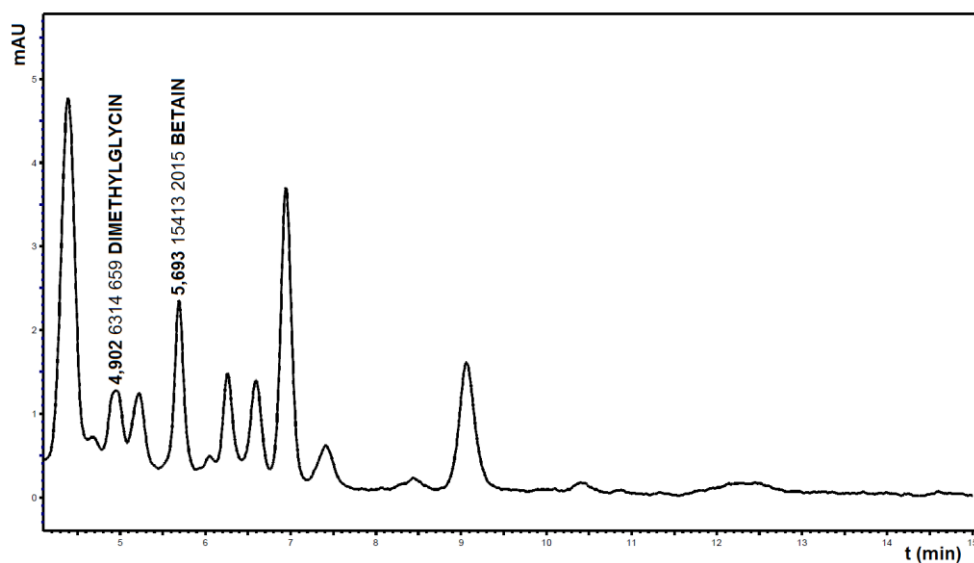
mAU - intenzita absorbance

AUC - plocha pod křivku

h - výška píku

t - čas (min)

t_R - retenční čas (min)



Příloha 2 - Chromatografický záznam dárce krve z kontrolní skupiny s fyziologickou plazmatickou koncentrací dimethylglycinu ($t_R = 4,902$, $AUC = 6314$, $h = 659$) a betainu ($t_R = 5,693$, $A = 15413$, $h = 2015$).

Legenda:

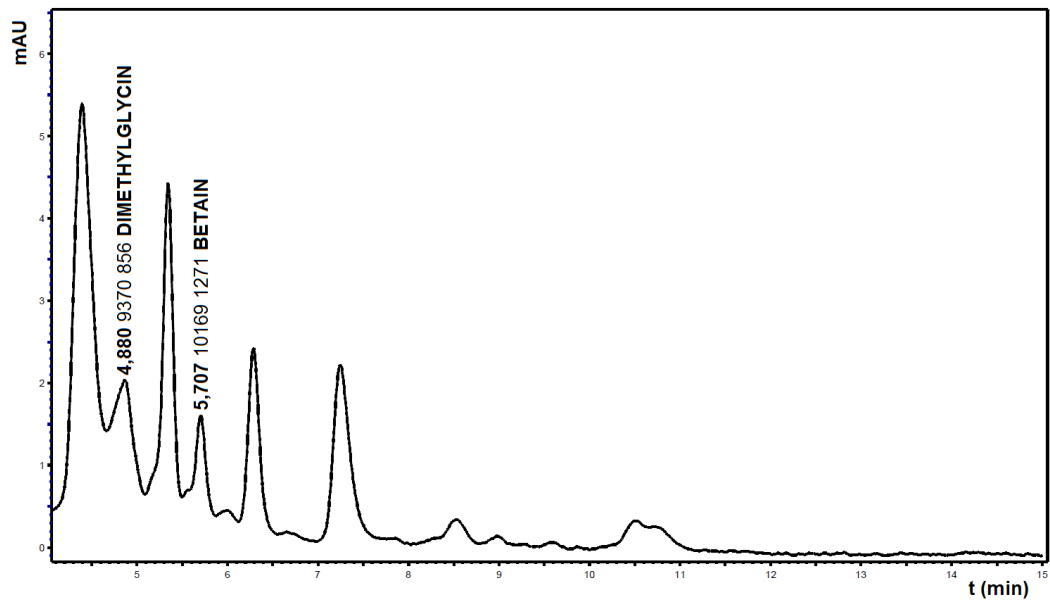
mAU - intenzita absorbance

AUC - plocha pod křivku

h - výška píku

t - čas (min)

tR - retenční čas (min)



Příloha 3 - Chromatografický záznam u pacienta s bolestí na hrudi a vyloučeným infarktem myokardu se zvýšenou plazmatickou koncentrací dimethylglycinu ($tR = 4,880$, $A = 9370$, $h = 856$) a fyziologickou plazmatickou koncentrací betainu ($tR = 5,707$, $A = 10169$, $h = 1271$).

Legenda:

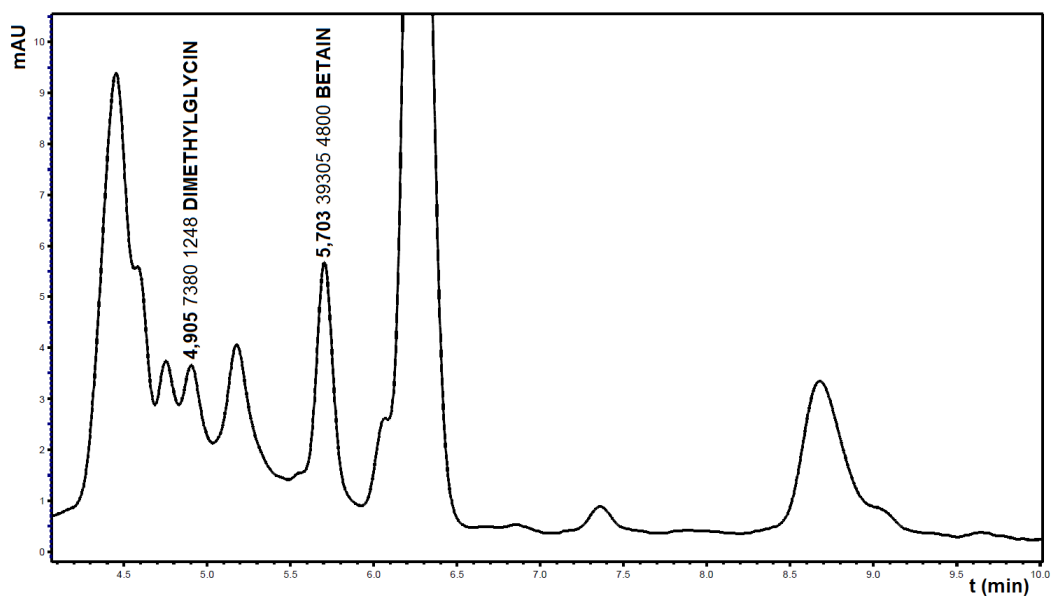
mAU - intenzita absorbance

AUC - plocha pod křivku

h - výška píku

t - čas (min)

tR - retenční čas (min)



Příloha 4 - Chromatografický záznam pacienta se selháním ledvin a diabetes mellitus se zvýšenou plazmatickou koncentrací betainu ($t_R = 5,703$, $A = 39305$, $h = 4800$) a fyziologickou plazmatickou koncentrací dimethylglycinu ($t_R = 4,905$, $A = 7380$, $h = 1248$).

Legenda:

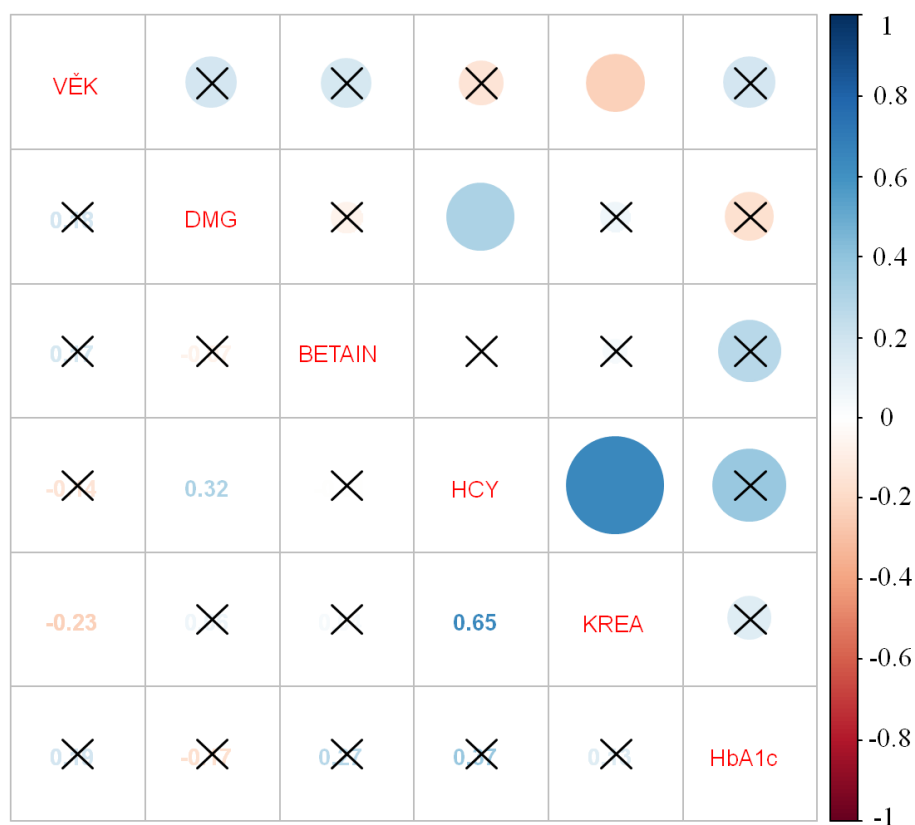
mAU - intenzita absorbance

AUC - plocha pod křivku

h - výška píku

t - čas (min)

t_R - retenční čas (min)



Příloha 5 - Grafické vyjádření korelačních koeficientů u všech skupin pacientů. Je zde patrná významná kladná korelace mezi plazmatickou koncentrací homocysteinu a kreatininu způsobená přítomností dvou skupin pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou. Dále je zde viditelná méně významná kladná korelace mezi plazmatickou koncentrací dimethylglycinu.

Legenda:

DMG - plazmatická koncentrace dimethylglycinu ($\mu\text{mol/l}$)

BETAIN - plazmatická koncentrace betainu ($\mu\text{mol/l}$)

HCY - plazmatická koncentrace homocysteinu ($\mu\text{mol/l}$)

KREA - plazmatická koncentrace kreatininu ($\mu\text{mol/l}$)

HbA1c - plazmatická koncentrace glykovaného hemoglobinu (mmol/mol)



Příloha 6 - Grafické vyjádření korelačních koeficientů se dvěma vyloučenými skupinami pacientů se selháním ledvin léčených hemodialýzou. V tomto případě je naopak významnější kladná korelace mezi plazmatickou koncentrací dimethylglycinu a homocysteinu.

Legenda:

DMG - plazmatická koncentrace dimethylglycinu ($\mu\text{mol/l}$)

BETAIN - plazmatická koncentrace betainu ($\mu\text{mol/l}$)

HCY - plazmatická koncentrace homocysteinu ($\mu\text{mol/l}$)

KREA - plazmatická koncentrace kreatininu ($\mu\text{mol/l}$)

HbA1c - plazmatická koncentrace glykovaného hemoglobinu (mmol/mol)