

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Stanovení asymetrického dimethylargininu v lidské plazmě  
Diplomová práce

2021

Anna Runcíková

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Anna Runčíková**  
Osobní číslo: **C19545**  
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**  
Studijní obor: **Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**  
Téma práce: **Stanovení asymetrického dimethylargininu v lidské plazmě**  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

Teoretická část:

Seznamte se s aktuálními literárními údaji o klinickém využití a o možnostech stanovení asymetrického dimethylargininu.

Experimentální část:

Vypracujte metodu pro stanovení asymetrického dimethylargininu a pokuste se ji optimalizovat tak, aby byla použitelná pro stanovení tohoto parametru v lidské plazmě.  
Zhodnoťte získané výsledky vzhledem k výsledkům publikovaným v literatuře.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Pavla Žáková, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Konzultant diplomové práce: **prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd  
Datum zadání diplomové práce: **18. prosince 2020**  
Termín odevzdání diplomové práce: **7. května 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

**prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**  
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 26. února 2021

Prohlašuji:

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

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

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

V Pardubicích dne 28. 7. 2021

Anna Runčíková v.r.

## **PODĚKOVÁNÍ**

Na tomto místě bych ráda poděkovala Mgr. Pavle Žákové, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup a projevenou trpělivost při vypracovávání mé diplomové práce.

Velké díky patří také mé rodině a přátelům za nepostradatelnou pomoc a podporu během celého studia.

## **ANOTACE**

Diplomová práce je zaměřena na asymetrický dimethylarginin, jeho klinické využití a na možnosti stanovení této látky v plazmě či séru. Praktická část se věnuje stanovení asymetrického dimethylargininu v plazmě pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí.

## **KLÍČOVÁ SLOVA**

asymetrický dimethylarginin, vysokoúčinná kapalinová chromatografie, elektrochemická detekce

## **TITLE**

The determination of asymmetric dimethylarginine in human plasma

## **ANNOTATION**

The master thesis is focused on asymmetric dimethylarginine, its clinical use and the possibility of determining this substance in plasma or serum. The practical part is devoted to the determination of asymmetric dimethylarginine in plasma using high performance liquid chromatography with electrochemical detection.

## **KEYWORDS**

asymmetric dimethylarginine, high performance liquid chromatography, electrochemical detection

# OBSAH

<b>SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK.....</b>	<b>8</b>
<b>SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....</b>	<b>9</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>10</b>
<b>1 TEORETICKÁ ČÁST.....</b>	<b>11</b>
1.1 ASYMETRICKÝ DIMETHYLARGININ .....	11
1.2 SYNTÉZA ASYMETRICKÉHO DIMETHYLARGININU .....	11
1.3 SYNTÁZA OXIDU DUSNATÉHO .....	12
1.4 OXID DUSNATÝ .....	14
1.5 DEGRADACE A ELIMINACE ADMA .....	15
1.6 KLINICKÝ VÝZNAM ADMA.....	18
1.6.1 <i>Biologické účinky ADMA</i> .....	19
1.6.2 <i>ADMA ve vztahu ke kardiovaskulárním onemocněním</i> .....	22
1.6.3 <i>ADMA ve vztahu k onemocnění ledvin</i> .....	28
1.7 MOŽNOSTI STANOVENÍ ASYMETRICKÉHO DIMETHYLARGININU .....	32
1.7.1 <i>HPLC s UV a fluorescenční detekcí</i> .....	33
1.7.2 <i>HPLC s elektrochemickou detekcí</i> .....	37
1.7.3 <i>Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí</i> .....	39
1.7.4 <i>Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí</i> .....	41
1.7.5 <i>Kapilární elektroforéza</i> .....	43
1.7.6 <i>ELISA</i> .....	44
1.8 REFERENČNÍ HODNOTY ADMA .....	46
<b>2 CÍL PRÁCE.....</b>	<b>47</b>
<b>3 PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>48</b>
3.1 CHEMIKÁLIE, PŘÍSTROJE A POUŽITÝ MATERIÁL .....	48
3.1.1 <i>Chemikálie</i> .....	48
3.1.2 <i>Materiál a soupravy</i> .....	49
3.1.3 <i>Přístroje</i> .....	49
3.1.4 <i>Software</i> .....	49
3.1.5 <i>Ostatní materiál a pomůcky</i> .....	50

3.2	PŘÍPRAVA ROZTOKŮ.....	50
3.2.1	<i>Roztoky standardních látek .....</i>	50
3.2.2	<i>Roztoky pro extrakci na pevné fázi.....</i>	51
3.2.3	<i>Roztoky pro derivatizaci.....</i>	52
3.2.4	<i>Mobilní fáze.....</i>	53
3.3	BIOLOGICKÉ VZORKY.....	53
3.4	METODIKA.....	54
3.4.1	<i>Příprava standardního nebo plazmatického vzorku.....</i>	54
3.4.2	<i>Extrakce na pevné fázi.....</i>	54
3.4.3	<i>Derivatizace .....</i>	55
3.4.4	<i>Chromatografická separace s elektrochemickou detekcí .....</i>	55
3.4.5	<i>Vyhodnocení a výpočty.....</i>	56
<b>4</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUSE .....</b>	<b>57</b>
4.1	ZAVEDENÍ METODY NA KOLONĚ NUCLEOSIL® C18.....	58
4.2	ZAVEDENÍ METODY NA KOLONĚ ARION® POLAR C18 .....	61
4.3	STABILITA POUŽITÝCH ČINIDEL A ROZTOKŮ.....	66
4.4	ZHODNOCENÍ METODY .....	68
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>72</b>
	<b>POUŽITÁ LITERATURA.....</b>	<b>73</b>
	<b>PŘÍLOHY.....</b>	<b>84</b>



## SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

<b>Obrázek 1</b> Chemická struktura L-argininu a jeho methylderivátů, upraveno dle [5] .....	12
<b>Obrázek 2</b> Stavba podjnotky enzymu syntáza oxidu dusnatého, upraveno dle [9].....	13
<b>Obrázek 3</b> Reakce probíhající na syntáze oxidu dusnatého, upraveno dle [6] .....	14
<b>Obrázek 4</b> Funkce oxidu dusnatého, upraveno dle [5] .....	15
<b>Obrázek 5</b> Metabolismus asymetrického dimethylargininu, upraveno dle [4] .....	18
<b>Obrázek 6</b> Vliv ADMA na tvorbu myofibroblastů, upraveno dle [1].....	21
<b>Obrázek 7</b> Kardiovaskulární onemocnění znázorněné jako kontinuum, upraveno dle [5].....	22
<b>Obrázek 8</b> Aduktý ADMA po derivatizační reakci s OPA, upraveno dle [72] .....	35
<b>Obrázek 9</b> Postup přípravy standardního nebo plazmatického vzorku.....	54
<b>Obrázek 10</b> Postup pro extrakci na pevné fázi.....	55
<b>Obrázek 11</b> Standardní roztok ADMA o koncentraci 5 a 20 $\mu\text{mol l}^{-1}$ .....	59
<b>Obrázek 12</b> Standardní roztok SDMA o koncentraci 20 $\mu\text{mol l}^{-1}$ .....	60
<b>Obrázek 13</b> Směsný standardní roztok ADMA a SDMA o koncentraci 10 $\mu\text{mol l}^{-1}$ .....	61
<b>Obrázek 14</b> Směsný standardní roztok ADMA a SDMA o koncentraci 5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ .....	62
<b>Obrázek 15</b> Směsný standardní roztok ADMA a SDMA o koncentraci 5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ .....	63
<b>Obrázek 16</b> Porovnání záznamů s použitím MMA o koncentraci 5 a 8 $\mu\text{mol l}^{-1}$ .....	63
<b>Obrázek 17</b> Směsný standardní roztok ADMA a SDMA o koncentraci 5 $\mu\text{mol l}^{-1}$ s MMA .....	64
<b>Obrázek 18</b> Záznam standardního vzorku po extrakci na pevné fázi .....	65
<b>Obrázek 19</b> Záznam plazmatického vzorku po extrakci na pevné fázi.....	65
<b>Obrázek 20</b> Záznam znázorňující nutnost promývaní po každé analýze plazmatického vzorku .....	66
<b>Obrázek 21</b> Porovnání záznamů s použitím derivatizačního činidla starého 1 a 6 dní.....	67
<b>Obrázek 22</b> Záznam s použitím derivatizačního činidla starého 21 dní .....	68
<b>Obrázek 23</b> Záznamy sloužící pro předběžný odhad koncentrace ADMA a SDMA ve vzorku .....	69

## SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

ADMA	asymetrický dimethylarginin
AGXT2	alanin-glyoxylát aminotransferáza 2
AUC	plocha pod křivkou
CAT	transportér kationtových aminokyselin
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
DDAH	dimethylarginin dimethylaminohydroláza
ELISA	enzymoimunoanalýza
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
L-NMMA	$N^G$ -monomethyl-L-arginin
LOX-1	receptor pro oxidovaný lipoprotein o nízké hustotě
MMA	$N^G$ -methyl-L-arginin, vnitřní standard
NADPH	redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu
NO•	oxid dusnatý
NOS	syntáza oxidu dusnatého
NSTEMI	infarkt myokardu bez elevace ST úseku na echokardiogramu
OPA	<i>ortho</i> -ftaldialdehyd
PBS	fosfátem pufovaný fyziologický roztok
PCI	perkutánní koronární intervence
PKG	proteinkináza G
PRMT	protein-arginin methyltransferáza
R <sub>1,2</sub>	rozlišení
SDMA	symetrický dimethylarginin
SPE	extrakce na pevné fázi
STEMI	infarkt myokardu s elevací ST úseku na echokardiogramu
t <sub>R</sub>	retenční čas

## ÚVOD

Asymetrický dimethylarginin byl objeven již v 70. letech 20. století a od té doby se stal předmětem zájmu mnoha vědeckých publikací. Tato sloučenina vzniká intracelulárně při normálním obratu bílkovin, její zvýšené koncentrace však mohou být nežádoucí. Jako nejúčinnější známý inhibitor syntázy oxidu dusnatého snižuje asymetrický dimethylarginin biologickou dostupnost oxidu dusnatého, molekuly s protektivními účinky pro cévní endotel. Inhibicí syntázy oxidu dusnatého se zároveň v buňce zvyšuje oxidační stres, který může být spouštěčem celé řady patologických mechanismů.

Doposud získané informace naznačují, že zvýšené hladiny cirkulujícího asymetrického dimethylargininu by mohly významně predikovat vývoj a úmrtnost u celé řady onemocnění, především pak u onemocnění kardiovaskulárních.

Diplomová práce se v teoretické části snaží přiblížit základní vlastnosti a metabolismus asymetrického dimethylargininu a jeho vztah k syntáze oxidu dusnatého, respektive k oxidu dusnatému. Dále je pozornost zaměřena na klinický význam asymetrického dimethylargininu a jeho vztah ke kardiovaskulárním a renálním onemocněním. V praktické části práce popisuje zavedení metody pro stanovení asymetrického dimethylargininu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí a snahu optimalizovat ji tak, aby byla použitelná pro stanovení tohoto parametru v lidské plazmě získané od kardiologických pacientů, kteří podstoupili perkutánní koronární intervenci. Získané výsledky jsou nakonec porovnány s výsledky publikovanými ve vědecké literatuře.

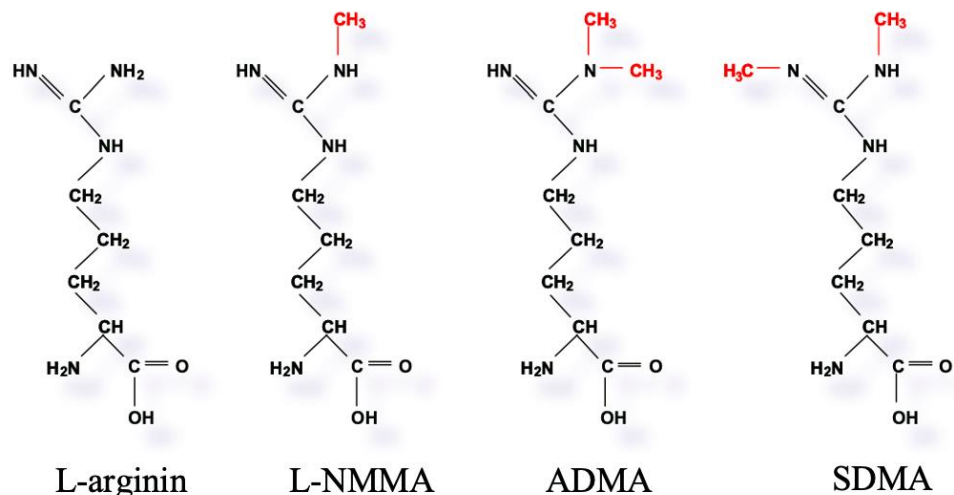
# 1 TEORETICKÁ ČÁST

## 1.1 Asymetrický dimethylarginin

Asymetrický dimethylarginin (ADMA) je přirozeně se vyskytující aminokyselina o molekulové hmotnosti 202 Daltonů. Vzniká intracelulárně, posttranslační modifikací z L-argininu, během normálního obratu bílkovin. ADMA je považován za nejúčinnější endogenní inhibitor enzymu syntáza oxidu dusnatého (NOS). Přirozeným substrátem NOS je L-arginin, ze kterého se jako produkt enzymatické reakce generuje oxid dusnatý (NO<sup>•</sup>), klíčový regulátor vaskulárního tonu. ADMA s L-argininem soutěží o vazebné místo na NOS a v případě, že ADMA zvítězí, aktivita NOS poklesne a s ní i produkce NO<sup>•</sup>. ADMA byl poprvé izolován z lidské moči v roce 1970 Kakimotoem a Akazawou a od té doby figuruje v celé řadě vědeckých publikací, které zkoumají jeho vztah k různým onemocněním, zejména kardiovaskulárním. [1,2,3]

## 1.2 Syntéza asymetrického dimethylargininu

Syntéza ADMA začíná intracelulárně z prekursoru L-argininu. L-arginin je semiesenciální aminokyselina vázaná v polypeptidovém řetězci celé řady nově vzniklých proteinů. Takové proteiny následně podléhají nejrůznějším posttranslačním modifikacím, z nichž jedna konkrétní, při které dochází k přenosu methylových skupin na jeden z terminálních dusíků guanidinové skupiny L-argininu, vede k syntéze ADMA. Tato posttranslační modifikace je katalyzována rodinou enzymů nazvaných protein-arginin methyltransferázy (PRMT). Rodinu PRMT dělíme ještě do dalších dvou podskupin na PRMT I (PRMT 1-4, 6, 8 a 10-11) a PRMT II (5, 7 a 9). PRMT I i PRMT II shodně katalyzují syntézu *N*<sup>G</sup>-monomethyl-L-argininu (L-NMMA), který vznikne navázáním jedné methylové skupiny. PRMT I následně katalyzuje přenos a navázání druhé methylové skupiny na již vytvořený L-NMMA za vzniku ADMA. Na místo toho PRMT II katalyzuje přenos a navázání druhé methylové skupiny na L-NMMA za vzniku symetrického dimethylargininu (SDMA). Vzniklé methylargininy jsou v této fázi stále ještě vázány ve struktuře proteinu a teprve po jeho fragmentaci a hydrolýze v proteasomu se uvolní samostatně do cytoplazmy. Chemickou strukturu L-argininu a jeho methylderivátů znázorňuje obrázek 1. Metabolismus ADMA včetně jeho syntézy znázorňuje obrázek 5. [1,4]



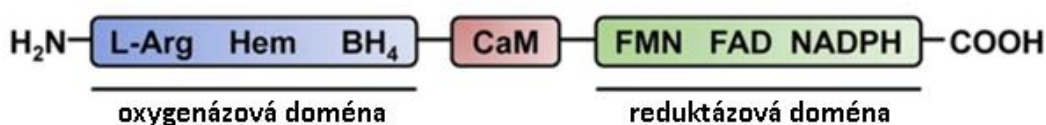
*Obrázek 1* Chemická struktura L-argininu a jeho methylderivátů, upraveno dle [5]

### 1.3 Syntáza oxidu dusnatého

NOS je enzym, který katalyzuje reakci, při které vzniká  $\text{NO}^\bullet$  a L-citrulin. Jako substrát pro tuto reakci slouží L-arginin spolu s molekulárním kyslíkem. Tuto enzymatickou reakci znázorňuje obrázek 5. ADMA a L-NMMA jsou přirozenými endogenními inhibitory tohoto enzymu. Protože však celková koncentrace ADMA je oproti L-NMMA asi 10x vyšší, je ADMA považován za hlavní endogenní inhibitor NOS v lidském organismu. SDMA i přesto, že je pouze strukturálním izomerem ADMA aktivitu NOS inhibovat nedokáže. [1,4,6]

Doposud jsou známy tři izoformy enzymu NOS u savců, endoteliální NOS, neuronální NOS a indukovatelná NOS. Endoteliální NOS je nejsilněji exprimována v cévním endotelu, zatímco neuronální NOS je převážně exprimována v neuronálních buňkách a buňkách kosterní svaloviny, v nižších hladinách jsou však obě tyto izoformy exprimovány také v mnoha jiných typech buněk. Endoteliální i neuronální NOS produkují  $\text{NO}^\bullet$  v reakci na zvýšení vápenatých iontů v cytosolu, proto se nazývají také  $\text{Ca}^{2+}$  dependentní NOS. Indukovatelná NOS je za normálních podmínek exprimována převážně v leukocytech, ale může být také indukována v mnoha dalších buněčných typech v reakci na zánět nebo v reakci na jiné stresové signály. Indukovatelná NOS je konstitutivně aktivní při bazální koncentraci vápenatých iontů, a zatímco endoteliální a neuronální NOS jsou považovány spíše za kardioprotektivní, exprese indukovatelné NOS může být i škodlivá. [1,4,7,8]

Stavbu NOS znázorňuje obrázek 2. NOS je dimer tvořený dvěma identickými monomery neboli podjednotkami. Každá podjednotka je následně rozdělena na dvě domény, oxygenázovou doménu na N-terminálním konci a reduktázovou doménu na C-terminálním konci, které jsou spojeny prostřednictvím kalmodulinu. U  $\text{Ca}^{2+}$  dependentních izoform NOS, je k stabilnímu propojení obou domén potřeba, aby kalmodulin vázal vápenaté ionty. Oxygenázová doména obsahuje vazebná místa pro substrát L-arginin a pro kofaktory hem, který váže trojmocné železo a tetrahydrobiopterin. Reduktázová doména obsahuje vazebná místa pro kofaktory flavinadenindinukleotid (FAD), flavinmononukleotid (FMN) a redukovanou formu nikotinamidadenindinukleotidfosfátu (NADPH). Vazba kofaktoru tetrahydrobiopterinu je klíčová, protože tetrahydrobiopterin zastává nejen redoxní funkci, ale také funkci alosterickou tím, že posouvá hemové železo do stavu s vysokou rotací, a tak stabilizuje aktivní dimerní formu enzymu, která je schopná v součinnosti s ostatními kofaktory efektivně produkovat molekuly  $\text{NO}^\bullet$ . [6,9]

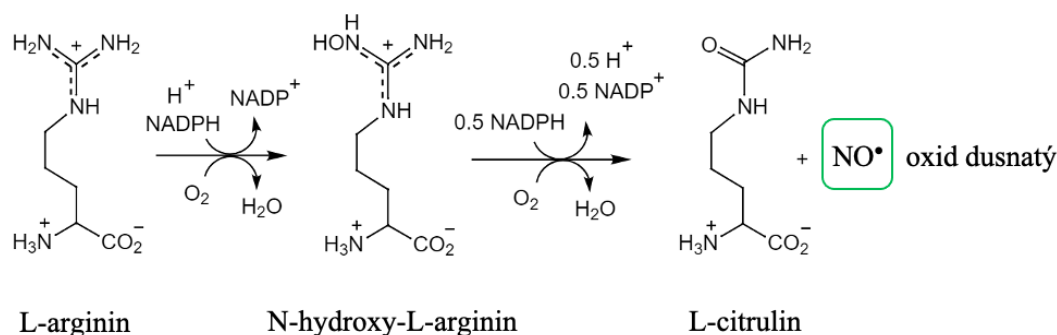


**Obrázek 2** Stavba podjednotky enzymu syntáza oxidu dusnatého, upraveno dle [9]

L-arg - L-arginin; BH<sub>4</sub> - tetrahydrobiopterin; CaM - kalmodulin; FAD - flavinadenindinukleotid; FMN - flavinmononukleotid; NADPH - redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu

Syntéza  $\text{NO}^\bullet$  probíhá ve dvou krocích, přičemž v prvním i druhém kroku se spotřebovává molekulární kyslík. Pro oxidačně-redukční reakci, kterou je z L-argininu přes *N*-hydroxy-L-arginin generován L-citrulin a  $\text{NO}^\bullet$  jsou dále potřebné volné elektrony, které poskytne kofaktor NADPH po navázání do reduktázové domény. Z reduktázové domény jsou volné elektrony postupně transportovány pomocí kofaktorů FAD a FMN přes kalmodulin do oxygenázové domény na hem. Hem vázající trojmocné železo je centrem, kde dvou kroková oxidačně-redukční reakce proběhne. Ačkoliv v každém kroku oxidačně-redukční reakce vznikne jiný produkt, jejich počátek je identický. Železitý hem je redukován jedním elektronem získaným z reduktázové domény. Redukovaný železnatý hem následně váže molekulární kyslík a vytvoří s ním železnatý oxyhemový komplex. Tento komplex je poté redukován dalším elektronem za vzniku železnatého komplexu superoxyhemu, který bude následně rychle protonován. Poté už se jednotlivé kroky reakce rozchází. Jelikož je však přenos elektronů mezi doménami

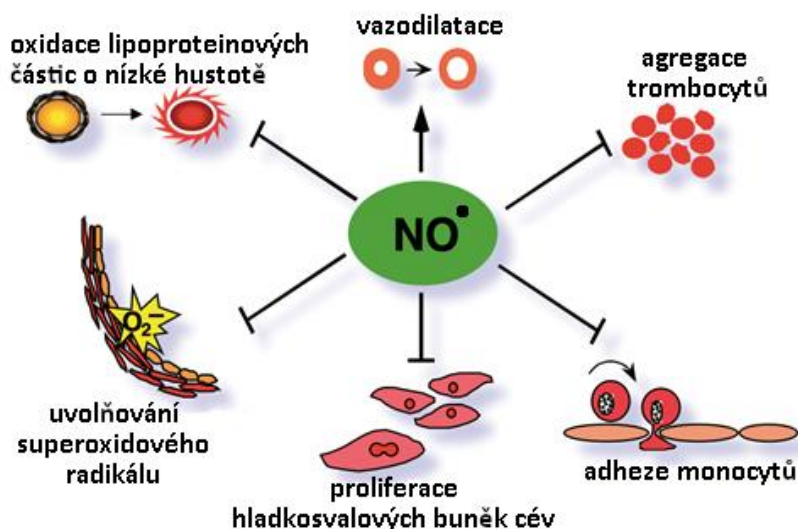
poměrně pomalý a oxyhemový komplex spíše nestabilní, používá NOS jako rychlý pomocný donor elektronů kofaktor tetrahydrobiopterin, který je vázán v blízkosti hemu v oxygenázové doméně. Za optimálních experimentálních podmínek je stechiometrie reakce následující, na 1 mol generovaného NO• se zoxiduje 1,5 molu NADPH. Syntézu NO• znázorňuje obrázek 3. [6,9,8]



**Obrázek 3** Reakce probíhající na syntéze oxidu dusnatého, upraveno dle [6]

## 1.4 Oxid dusnatý

NO• je dvouatomová plynná molekula s jedním nepárovým valenčním elektronem. Tato molekula je produkována endogenně, dokáže volně difundovat přes cytoplazmatickou membránu a působit tak jako lokální mediátor na okolní buňky. NO• produkovaný endotelovými buňkami hraje klíčovou roli v regulaci tonu cévní stěny. Po syntéze v endotelových buňkách NO• samovolně difunduje do sousedních buněk hladké svaloviny, v jejich cytosolu se spojí s rozpustnou guanylátcyklázou a aktivuje ji. Aktivovaná guanylátcykláza následně katalyzuje vznik cyklického guanosinmonofosfátu (cGMP) z guanosintrifosfátu. cGMP jako druhý posel poté aktivuje cGMP-dependentní proteinkinázu G (PKG). Aktivovaná PKG poté fosforyluje řadu důležitých intracelulárních cílů. Nejznámějším výsledkem popsané kaskády je relaxace hladké svaloviny vedoucí k dilataci cévní stěny. Tato kaskáda se také často popisuje jako NO•/cGMP/PKG signalizace. Vedle vazodilatace, plní NO• řadu dalších důležitých funkcí. Brání agregaci krevních destiček, adhezi monocytů k cévní stěně, proliferaci buněk hladké svaloviny, snižuje uvolňování superoxidového radikálu a tlumí oxidaci lipoproteinových částic o nízké hustotě. Díky těmto protektivním účinkům je NO• také označován jako endogenní antiaterogenní molekula. Funkce NO• znázorňuje obrázek 4. [5,7,10]



*Obrázek 4 Funkce oxidu dusnatého, upraveno dle [5]*

Produkce  $\text{NO}^\bullet$  je regulována množstvím a dostupností substrátu L-argininu, buněčnou a subbuněčnou distribucí, kvalitou a obsahem enzymu NOS, dostupností kofaktoru NOS tetrahydrobiopterinu, koncentrací endogenních inhibitorů NOS jako je ADMA a L-NMMA a v neposlední řadě enzymatickou aktivitou dimethylarginin dimethylaminohydrolázy. [7]

## 1.5 Degradace a eliminace ADMA

Koncentrace ADMA je v těle fyziologicky regulována třemi základními cestami, znázorněnými na obrázku 5. První a nejvýznamnější cestou regulace je intracelulární degradace ADMA pomocí enzymu dimethylarginin dimethylaminohydroláza (DDAH). Tento klíčový enzym je exprimován převážně v játrech, ledvinách, mozku a slinivce břišní. Doposud byly identifikovány dvě izoformy toho enzymu, DDAH1 a DDAH2, přičemž každá z těchto izoform je kódována odlišným genem. DDAH1 je přítomen převážně ve tkáních, které exprimují neuronální NOS, zatímco DDAH2 se nachází ve tkáních, které exprimují endoteliální NOS. Degradace prostřednictvím DDAH spočívá v hydrolýze ADMA na L-citrulin a dimethylamin. Tímto způsobem se tělo z celkové denní produkce zbaví asi 80 % ADMA. Pomocí DDAH je degradován také L-NMMA, na rozdíl od SDMA, na jehož degradaci se DDAH vůbec nepodílí. [1,2,4]

Experimentálně zvýšená exprese DDAH1 a DDAH2 v endotelových buňkách vedla k vyšší produkci  $\text{NO}^\bullet$ . Analogicky experimentálně snížená exprese DDAH1 a DDAH2 v endotelových buňkách produkci  $\text{NO}^\bullet$  utlumila. Při snížení exprese DDAH1 bylo



generováno zvýšené množství ADMA, poměr L-arginin/ADMA se tak snížil a s ním i produkce NO<sup>•</sup>. Po suplementaci L-argininem se poměr L-arginin/ADMA částečně obnovil a s ním produkce NO<sup>•</sup>. Naopak při snížené expresi DDAH2 se poměr L-arginin/ADMA v podstatě nezměnil a ani suplementace L-argininem produkci NO<sup>•</sup> nijak neovlivnila. Zdá se tedy, že koncentrace ADMA a s ní ovlivněná produkce NO<sup>•</sup> jsou závislé především na aktivitě DDAH1. Stejný poznatek naznačuje i studie Hu a kolektivu, v níž byl pro experimentální účely vytvořen myší kmen s deficitem genu pro DDAH1 a následně se zkoumal dopad tohoto deficitu na metabolismus ADMA. Ačkoliv růst a vývoj těchto myší byl stejný jako u myší divokého typu, naměřené plazmatické a intracelulární koncentrace ADMA byly u myší s deficitem DDAH1 několikanásobně vyšší. Zajímavé je, že i přesto, že exprese DDAH2 nebyla ovlivněna, ve všech zkoumaných tkáních byla naměřena nulová DDAH aktivita. Toto zjištění tedy rovněž naznačuje, že by aktivita DDAH1 mohla být pro degradaci ADMA in vivo klíčová. [11,12]

Druhá cesta regulující koncentraci ADMA je zprostředkována ledvinami. ADMA musí být nejprve přepraven z cytosolu přes cytoplazmatickou membránu do extracelulárního prostoru. Tento přechod je zprostředkován transportéry kationtových aminokyselin (CAT). ADMA transportovaný do krve může být následně v nezměněné podobě vyloučen renální exkrecí. Renální exkrece je zároveň hlavní cesta regulující koncentraci SDMA. [1,2,4]

CAT hrají důležitou roli nejen v distribuci ADMA, ale také L-argininu mezi buňkou a krví. Pro transmembránový transport L-argininu a jeho methylovaných derivátů je důležitý CAT-1. Tento transportér se exprimuje ve všech tkáních s výjimkou jater a má pro kationtové aminokyseliny vysokou afinitu s nízkou kapacitou. Dalším důležitým transportérem je CAT-2A, který je exprimován především v játrech a má pro kationtové aminokyseliny naopak nízkou afinitu s vysokou kapacitou. Posledním důležitým transportérem je CAT-2B, který je exprimován v různých tkáních především po stimulaci prozánětlivými faktory. CAT-2B se často exprimuje současně s indukovatelnou NOS. [13]

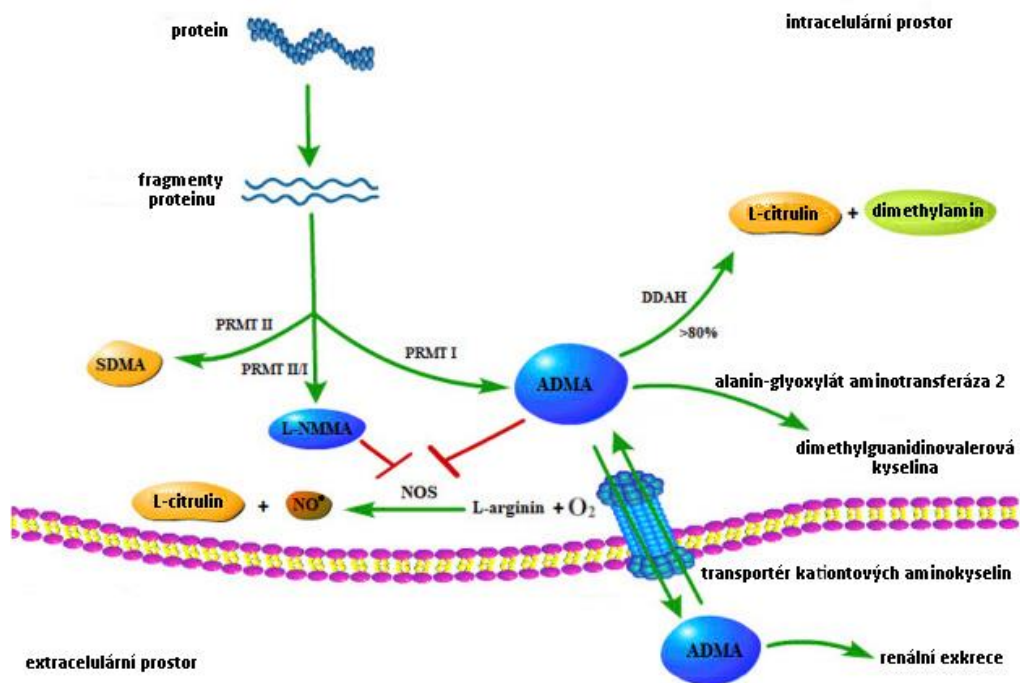
Při monitoringu intracelulárních koncentrací L-argininu se došlo k závěru, že jsou jeho koncentrace relativně podobné těm extracelulárním a intracelulární koncentraci ADMA převyšují mnohonásobně. U ADMA však byl zaznamenán markantní rozdíl mezi jeho intracelulární a extracelulární koncentrací, kdy intracelulární koncentrace ADMA

převyšovala tu extracelulární 5-20krát. Takový koncentrační rozsah intracelulárního ADMA je naproti extracelulárnímu rozsahu dostatečný pro tonickou inhibici NOS. Zdá se však, že rozhodující dopad na aktivitu NOS má poměr L-arginin/ADMA, nikoliv samotná intracelulární koncentrace ADMA. Tento předpoklad je v souladu s takzvaným L-argininovým paradoxem. Jeho podstatou bylo zjištění, že suplementace L-argininem vede ke zvýšení produkce  $\text{NO}^\bullet$  s pozitivním účinkem na cévní endotel in vivo, ačkoliv už fyziologická hladina L-argininu bez suplementace převyšuje 25-30krát konstantu Michaelis-Menteové pro endoteliální NOS, která byla vypočítána po extrakci a purifikaci endoteliální NOS in vitro. Přestože by tedy kapacita NOS měla být za fyziologických okolností substrátem nasycena a další zvýšení L-argininu by její aktivitu už nemělo ovlivnit, není tomu tak a zdá se, že poměr L-arginin/ADMA bude v tomto ohledu klíčový. Poměr L-arginin/ADMA může být regulován především aktivitou PRMT, DDAH, ale i dalšími enzymy podílejícími se na metabolismu L-argininu a ADMA. Důležitou roli v distribuci L-argininu a ADMA mezi intracelulárním a extracelulárním prostorem hrají také transportéry kationtových aminokyselin, jejichž exprese a aktivita může výrazně promlouvat do poměru L-arginin/ADMA. [13,14]

Třetí a spíše minoritní cestou regulace je degradace ADMA pomocí katalýzy enzymem alanin-glyoxylát aminotransferáza 2 (AGXT2). Jedná se o mitochondriální aminotransferázu exprimovanou primárně v ledvinách. Při degradaci pomocí AGXT2 dochází k transaminaci ADMA na  $N^G, N^G$ -dimethylguanidinovalerovou kyselinu. Také SDMA může být degradován pomocí AGXT2 za vzniku stejného produktu jako u ADMA. [1,2,4]

Lidská AGXT2 byla prostřednictvím adenovirového vektoru vpravena do buněk myších jater, kde byla zároveň zvýšena její exprese. Výsledkem tohoto pokusu bylo jak snížení intracelulární koncentrace ADMA v myších hepatocytech, tak snížení plazmatické koncentrace ADMA. Endotelové myší buňky byly zároveň chráněny před ADMA zprostředkovanou inhibicí produkce  $\text{NO}^\bullet$ . V jiném experimentu byla myším podávána infuze ADMA po dobu tří dnů, přičemž polovině z těchto myší byla provedena oboustranná nefrektomie. Následně, zvýšená koncentrace ADMA vedla k rapidnímu nárůstu koncentrace kyseliny  $N^G, N^G$ -dimethylguanidinovalerové, jakožto produktu metabolismu AGXT2 a to i u myší po nefrektomii. Zároveň bylo prokázáno, že ani infuze ADMA, ani oboustranná nefrektomie neměly vliv na změnu regulace exprese a aktivity AGXT2. Zdá se tedy, že tato metabolická dráha pro degradaci ADMA má velkou

kapacitu, která je za normálních okolností využita jen částečně, proto byla AGXT2 schopna dynamicky reagovat na zvýšené hladiny ADMA dokonce i po provedení oboustranné nefrektomie. AGXT2 by tak mohla hrát hlavní roli při korekci zvýšených hladin ADMA. [15,16]



Obrázek 5 Metabolismus asymetrického dimethylargininu, upraveno dle [4]

## 1.6 Klinický význam ADMA

Zhou a kolektiv zkoumali souvislost mezi koncentrací cirkulujícího ADMA a úmrtností ze všech příčin. Studie zahrnovala data z 34 studií s více než 35 000 účastníky, což tuto studii zařadilo mezi jednu z největších. Ačkoliv některé předchozí studie přinesly kontroverzní pohled na prediktivní hodnotu ADMA pro úmrtnost ze všech příčin, studie Zhou a kolektivu rozhodně naznačuje pozitivní asociaci mezi koncentrací cirkulujícího ADMA a mortalitou ze všech příčin. Tyto výsledky jsou také v souladu s publikovanou studií Schlesingera a kolektivu, který cirkulující ADMA rovněž považuje za nezávislý rizikový marker mortality ze všech příčin. [17,18]

Vysoké riziko úmrtnosti pak bylo shledáno především při asociaci mezi zvýšenou hladinou cirkulujícího ADMA a kardiovaskulárním onemocněním nebo onemocněním ledvin. Schlesinger a kolektiv například uvádí, že vyšší plazmatické koncentrace ADMA zvyšují riziko úmrtnosti u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním až o 33 %. Zhou a kolektiv také uvádí, že vysoké riziko úmrtnosti asociující se zvýšenou hladinou

ADMA vzniká nejen ve spojení s preexistujícím stabilizovaným kardiovaskulárním onemocněním, nýbrž také ve spojení s náhlými kardiovaskulárními příhodami. [17,18]

### 1.6.1 Biologické účinky ADMA

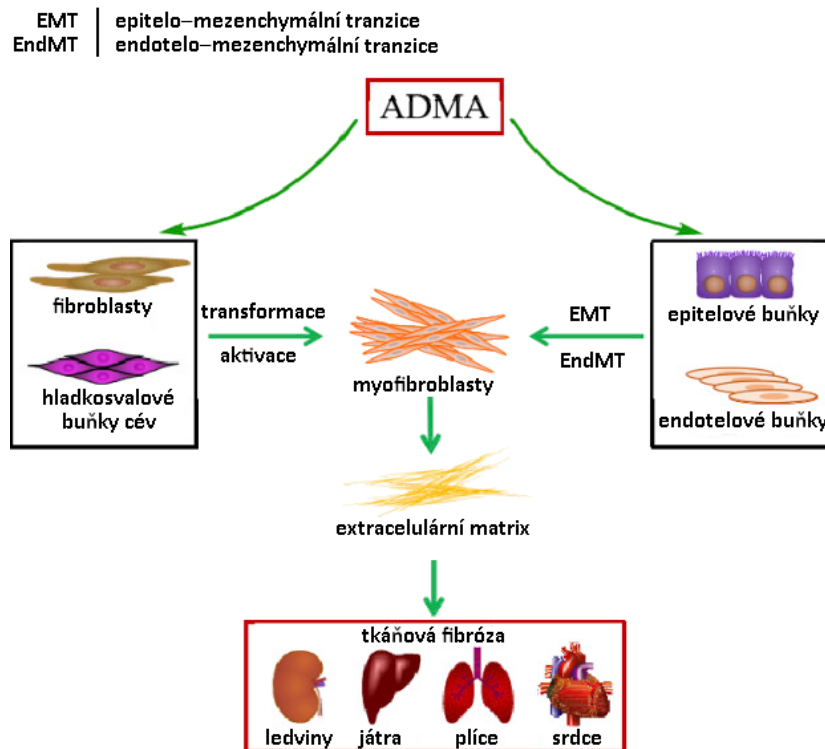
Nejvýznamnějším biologickým účinkem ADMA je inhibice NOS vedoucí ke snížení produkce NO<sup>•</sup>. Průběh syntézy NO<sup>•</sup> za fyziologických podmínek byl již popsán. Pokud se do aktivního místa na NOS naváže ADMA, NOS přijde o možnost vázat substrát a z něj generovat NO<sup>•</sup>. Tok elektronů z reduktázové do oxygenázové domény však nebude přerušeno, ale jejich jediným akceptorem se stane molekulární kyslík a místo NO<sup>•</sup> se na NOS začnou generovat reaktivní superoxidové radikály. V buňce začne vznikat oxidační stres, který dále povede k oxidaci kofaktoru tetrahydrobiopterinu na dihydrobiopterin a dimerní konformace NOS ztratí svou stabilitu. Podjednotky NOS se rozpojí. Vznikne tak monomerní konformace, která i nadále produkuje superoxidy. Superoxid může účinně zhaset superoxid dismutáza a přeměňovat jej na méně reaktivní peroxid vodíku. Pokud však syntéza superoxidu převýší antioxidační schopnost superoxid dismutázy, začne superoxid poškozovat buněčné struktury. Superoxid může také spontánně reagovat s molekulou NO<sup>•</sup> za vzniku mnohem reaktivnějšího a pro buňky toxičtějšího radikálu peroxinitritu. [2,8,9]

Studie in vitro na monocytární buněčné linii THP-1 prokázaly, že se ADMA, tím že generuje reaktivní kyslíkové formy, podílí na aktivaci monocytů a stimuluje jejich adhezi k endotelové výstelce. Aktivované monocyty navíc vykazovaly prokoagulační aktivitu. Po inkubaci buněčných linií THP-1 s ADMA byly v monocytech generovány reaktivní kyslíkové formy. Vzniklý oxidační stres v buňce následně aktivoval nukleární faktor kappa B, jenž je transkripčním faktorem ovlivňujícím expresi genů. Výsledkem byla aktivace monocytů s produkcí nejrůznějších cytokinů. Například exprese tkáňového faktoru může hrát důležitou roli v prokoagulační aktivitě monocytů při akutních koronárních syndromech. Inkubace endotelových buněk extrahovaných z pupečnickové žíly s ADMA vedla k expresi monocytárního chemoatraktivního proteinu 1, interleukinu 8 a tumor nekrotizujícího faktoru  $\alpha$ . Tyto cytokiny indukovaly adhezi monocytů k endotelovému povrchu a zároveň stimulovaly rozvoj zánětlivé reakce. [19,20,21]

Buněčná linie lidské monocytární leukémie HL-60 diferencovaná pomocí forbol-12-myristát-13-acétátu byla kultivována s přidavkem ADMA. Následně byla

technikou Western blot měřena exprese receptoru pro oxidovaný lipoprotein o nízké hustotě (LOX-1). Přídavek ADMA v koncentraci  $15 \mu\text{mol l}^{-1}$  způsobil maximální expresi receptoru LOX-1, která se oproti měření bez přídavku ADMA zvýšila o pozoruhodných 217 %. Receptor LOX-1 je vysoce exprimován v endotelových buňkách, makrofázích a hladkosvalových buňkách cév. Gen pro LOX-1 se řadí mezi takzvané geny okamžité-časné exprese a je exprimován v odpovědi na aktivaci nukleárního faktoru kappa B. Makrofág pomocí receptoru LOX-1 absorbuje oxidovaný lipoprotein o nízké hustotě. Zvýšená exprese receptorů LOX-1 vede k akumulaci oxidovaných lipoproteinů o nízké hustotě v makrofázích, což může být podkladem pro jejich přeměnu v takzvané pěníte buňky, které jsou charakteristickým nálezem v aterosklerotických plátech. [22]

Existují také studie, které poukazují na významnou roli ADMA v rozvoji a progresi fibrózy. Pro fibrózu je charakteristická aktivace myofibroblastů, které následně produkují velké množství komponent extracelulární matrix jako jsou fibrilární kolagen a mnohé nestrukturní proteiny. Nadměrně produkovaná extracelulární matrix se akumuluje ve tkáních a orgánech, což nakonec vede k jejich selhání. U aktivovaných myofibroblastů dochází k charakteristickému přechodu z klidového fenotypu do fenotypu aktivního, který se projevuje expresí stresových vláken obsahujících  $\alpha$ -hladkosvalový aktin. Dnes už je dobře známo, že epitelové nebo endotelové buňky mohou změnit svůj fenotyp a transformovat se v myofibroblasty prostřednictvím epitelu-mezenchymální nebo endotelo-mezenchymální tranzice. Za podmínek přispívajících k rozvoji fibrózy jako je zánět, hypoxie a oxidativní stres mohou být i jiné mezenchymální buňky potenciálními prekurzory myofibroblastů, například hladkosvalové buňky cév, nebo fibroblasty. ADMA stimulací tranzice buněk v aktivované myofibroblasty hraje důležitou roli v rozvoji fibrózy ledvin, jater a dalších orgánů. Vliv ADMA na tvorbu myofibroblastů znázorňuje obrázek 6. [1,4,23,24,25,26]

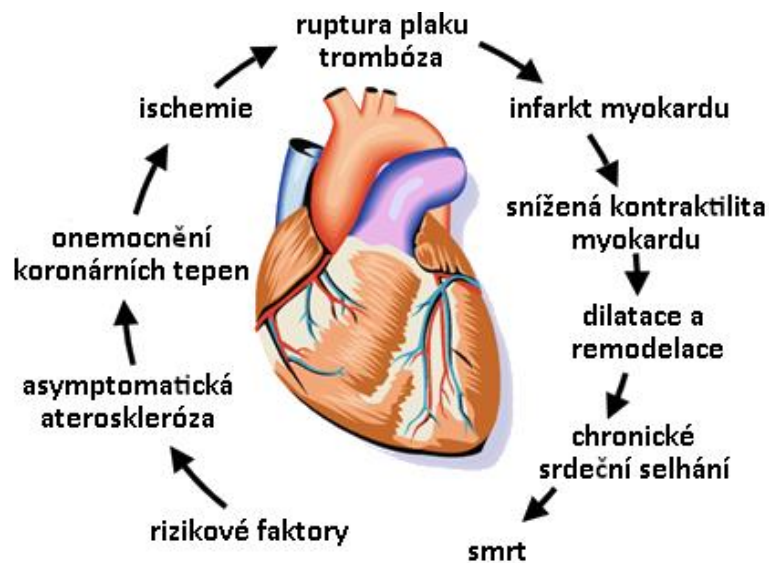


**Obrázek 6** Vliv ADMA na tvorbu myofibroblastů, upraveno dle [1]

Wang a kolektiv prokázali, že ADMA in vitro zvyšuje expresi transformujícího růstového faktoru  $\beta 1$  v lidských endotelových buňkách renálního glomerulu. Jako možný patofyziologický mechanismus Wang a kolektiv uvádí, že ADMA, jako potenciální producent reaktivních kyslíkových forem může aktivovat p38 MAP kinázu. Tato kináza patří do rodiny proteinových kináz aktivovaných mitogenem. Aktivovaná p38 MAP kináza následnou aktivací proteinu teplotního šoku umožní polymeraci aktinových vláken. Toto je možná cesta vzniku stresových vláken, zmíněných již u aktivovaných myofibroblastů. Stresová aktinová vlákna následně mohla usnadnit translokaci nukleárního faktoru kappa B, který po vazbě na DNA stimuloval zvýšení exprese transformujícího růstového faktoru  $\beta 1$  v lidských endotelových buňkách renálního glomerulu. Transformující růstový faktor  $\beta 1$  byl již dříve identifikován jako kauzální příčina rozvoje renální fibrózy. Hlavním biologickým účinkem transformujícího růstového faktoru  $\beta$  je regulace syntézy a akumulace extracelulární matrix. Transformující růstový faktor  $\beta$  také reguluje buněčnou proliferaci a diferenciaci a rozvoj imunitní odpovědi. [27,28,29]

### 1.6.2 ADMA ve vztahu ke kardiovaskulárním onemocněním

Kardiovaskulární onemocnění může být vnímáno jako kontinuum. Počínaje kardiovaskulárními rizikovými faktory u klinicky asymptomatických osob se může rozvinout v asymptomatickou aterosklerózu. Ateroskleróza může následně progredovat do onemocnění koronárních tepen vykazujícího klinické příznaky. Onemocnění koronárních tepen vedoucí k méně závažné ischemii myokardu může být po různě dlouhou dobu stabilizováno, v takovém případě se projevuje jako stabilní angina pectoris. Nakonec však narůstající složité aterosklerotické léze, nebo jejich ruptura způsobí tak závažnou ischemii, že se rozvine mnohdy život ohrožující stav, který nazýváme akutní koronární syndrom. Akutní koronární syndrom je klasifikován jako infarkt myokardu s elevací ST úseku na echokardiogramu (STEMI), nebo jako infarkt myokardu bez elevace ST úseku na echokardiogramu (NSTEMI), nebo jako nestabilní angina pectoris. Stanovení konkrétního typu akutního koronárního syndromu se opírá o vyhodnocení klinických příznaků ischemie, odchylek v ST úseku na echokardiogramu a laboratorního vyšetření se stanovením troponinu a dalších markerů. Zjizvení po infarktu myokardu má za následek snížení srdeční kontraktility. Srdce se takovou ztrátu snaží kompenzovat remodelací tkáně a dilatací srdečních oddílů doprovázenou kompenzační hypertrofií kardiomyocytů. V této fázi myokard vykazuje vysoké energetické nároky, srdce začíná chronicky selhávat a blíží se ke konečnému stádiu, ke smrti. ADMA přitom může mít podstatnou klinicky relevantní prediktivní a diagnostickou roli v několika fázích tohoto kontinuálního procesu. Kardiovaskulární onemocnění jako kontinuum přehledně znázorňuje obrázek 7. [5,30,31]



**Obrázek 7** Kardiovaskulární onemocnění znázorněné jako kontinuum, upraveno dle [5]

Rizikovým faktorem rozvoje kardiovaskulárního onemocnění může být kouření. Zhang a kolektiv zkoumali, jaký efekt má cigaretový kouř na biologickou dostupnost NO<sup>•</sup>. Současně byl v tomto kontextu zkoumán i metabolismus ADMA. Pokusy byly prováděny in vitro na lidských endotelových buňkách a na endotelových buňkách extrahovaných z hovězí aorty. Tyto buňky byly po kultivaci vystavovány různým dávkám takzvaného extraktu z cigaretového kouře. Extrakt z cigaretového kouře byl připraven spálením pěti cigaret, kterým byl odstraněn ochranný filtr. Každá cigareta vždy hořela asi 5 minut, přičemž cigaretový kouř byl nasáván a přiváděn speciální aparaturou s vakuovou pumpou do Eaglova média modifikovaného Dulbeccem. Tak vznikla suspenze, která byla po úpravě pH a přefiltrování použita pro pokusy. Výsledek byl následující. Expozice 10 % extraktu z cigaretového kouře významně ovlivnila metabolismus L-argininu. Intracelulární obsah produktu L-citrulinu se snížil na 81 %, meziproductu N-hydroxy-L-argininu na 57 % a substrátu L-argininu dokonce na 23 %, přičemž intracelulární hladina ADMA vzrostla na 129 %. Zároveň byla výrazně inhibována absorpce L-argininu do buňky snížením exprese CAT-1 o 34 %. Extrakt z cigaretového kouře také významně snížil aktivitu endoteliální NOS, což vedlo ke snížení produkce NO<sup>•</sup>. V endotelových buňkách zároveň stoupla produkce reaktivních kyslíkových forem. Kromě intracelulárních hladin ADMA in vitro, byly také změřeny plazmatické hladiny ADMA a dalších látek účastnících se metabolismu L-argininu u aktivních kuřáků. Získaná data se následně porovnávala s kontrolní skupinou zdravých nekuřáků. U aktivních kuřáků byla plazmatická koncentrace ADMA o 80 % vyšší než u nekuřáků, zatímco hladiny L-citrulinu a N-hydroxy-L-argininu byly naopak významně nižší oproti kontrole. Kouření může být tedy významným rizikovým faktorem zvyšujícím jak plazmatické, tak intracelulární hladiny ADMA. Následné snížení biologické dostupnosti NO<sup>•</sup> může vést k rozvoji endotelové dysfunkce a s ní spojenému rozvoji kardiovaskulárního onemocnění. [32]

Významem ADMA v rozvoji aterosklerózy se podrobněji zabývala má bakalářská práce a mnohé principy jsou popsány i zde. Ve stručnosti se ateroskleróza rozvíjí na podkladě endotelové dysfunkce. ADMA jako účinný endogenní inhibitor NOS snižuje biologickou dostupnost NO<sup>•</sup> a zároveň přispívá ke zvýšení oxidačního stresu v buňce. Snížená produkce NO<sup>•</sup> se vzhledem k multifunkčnosti této molekuly projeví na mnoha úrovních. Signalizace NO<sup>•</sup>/cGMP/PKG poklesne a s ní i vaskulární vazodilatace. Dysfunkční endotel bude vykazovat prokoagulační a prozánětlivé vlastnosti.



Bude stimulována adheze monocytů k endoteliálním povrchům a jejich vstup do mezibuněčného prostoru cévní stěny. Generované reaktivní kyslíkové radikály aktivují nukleární faktor kappa B, který reguluje expresi celé řady genů. Zvýší se exprese receptorů LOX-1, což usnadní hromadění oxidovaných lipoproteinových částic o nízké hustotě uvnitř tkáňových makrofágů a podpoří se tak jejich přeměna v pěníte buňky. ADMA stimuluje aktivaci hladkosvalových buněk cév a změnu jejich fenotypu v aktivované myofibroblasty. Spolu se zvýšenou expresí transformujícího růstového faktoru  $\beta 1$  a s akumulací extracelulární matrix bude fibróza v místě poškozeného endotelu progredovat. Popsané mechanismy budou měnit kvalitu a průsvit cévní stěny, což je základ pro rozvoj různě závažné ischemie tkání. [1,4,5,7,19,22,27]

Parikh a kolektiv zkoumali vliv zvýšené plazmatické koncentrace ADMA na koronární vazomotoriku. Koronární vazomotorická dysfunkce je možným klíčovým mechanismem pro rozvoj ischemie myokardu projevující se jako angina pectoris u pacientů s absencí obstrukční ischemické choroby srdeční. Studie zahrnovala 191 pacientů s typickou či atypickou anginou pectoris, u kterých byla femorální koronární angiografii prokázána absence obstrukční ischemické choroby srdeční. Typická angina pectoris byla definována jako nepříjemné pocity na hrudi, vyvolané námahou nebo emočním stresem, zmírněné odpočinkem nebo nitroglycerinem. Atypická angina pectoris byla označena jako projev alespoň dvou z výše jmenovaných charakteristik. Vazomotorická koronární funkce byla testována podáním acetylcholinu v dávce nejprve 50  $\mu\text{g}$  a poté 100  $\mu\text{g}$  do levé koronární artérie. V části levé koronární artérie zvané ramus interventricularis anterior byla následně ve všech třech segmentech změřena změna šířky lumen. Nakonec testu byl do artérie podán nitroglycerin. Plazmatická koncentrace ADMA byla stanovena pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. U kontrolní zdravé populace byla projevem normální vazomotorické funkce po podání acetylcholinu vazokonstrikce. Podání nitroglycerinu pak následně vedlo relaxaci hladké svaloviny a lumen artérie se opět rozšířilo. U testovaného vzorku 191 pacientů s anginou pectoris se však u 137 pacientů po podání acetylcholinu projevila abnormální vasomotorická funkce omezená buď na jeden, dva, nebo všechny tři segmenty ramus interventricularis anterior levé koronární artérie. Průměrná plazmatická koncentrace ADMA u zdravých subjektů byla 0,48  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , u pacientů s abnormální vazomotorickou funkcí v jednom segmentu 0,54  $\mu\text{mol l}^{-1}$  a u pacientů s abnormální vazomotorickou funkcí ve všech třech segmentech 0,55  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Bylo tedy

patrné, že plazmatická koncentrace ADMA vzrůstá s postupujícím rozsahem vazomotorické dysfunkce. V neupravené statistické analýze ADMA vysoce predikoval vazomotorickou dysfunkci a po úpravě analýzy o další faktory (např. index tělesné hmotnosti, hyperlipidémie, užívání tabáku, nitrátů či beta-blokátorů) ADMA neztratil na statistické významnosti. [33]

Ye a kolektiv se zaměřili na prognostickou hodnotu cirkulujícího ADMA u pacientů s ischemickou chorobou srdeční. Metanalýza byla provedena na základě vyhodnocení 11 studií zahrnujících 9496 pacientů s ischemickou chorobou srdeční. Ischemická choroba srdeční obvykle zahrnuje stabilní ischemickou chorobu srdeční a akutní koronární syndromy, mezi které patří nestabilní angina pectoris a infarkt myokardu. Na základě provedené metaanalýzy bylo zjištěno, že vysoce zvýšená hladina cirkulujícího ADMA přináší pacientům s ischemickou chorobou srdeční 2,49krát vyšší riziko úmrtí na kardiovaskulární onemocnění a 1,71krát vyšší riziko rozvoje závažných kardiovaskulárních příhod. Pro ilustraci, Schnabel a kolektiv uvádí naměřené sérové hladiny ADMA u pacientů s ischemickou chorobou srdeční v rozmezí 0,12–3,92  $\mu\text{mol l}^{-1}$  s průměrnou hodnotou 0,68  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Zajímavé bylo zjištění, že zvýšení sérové hladiny ADMA o jednu standardní odchylku přineslo pro tyto pacienty o 27 % vyšší riziko mortality. Měření hladin cirkulujícího ADMA by tak mohlo zlepšit klasifikaci rizika při ischemické chorobě srdeční. [34,35]

Pacientům s akutním infarktem myokardu byly na příjmu odebrány vzorky krve, které následně sloužily pro stanovení koncentrace ADMA v séru. Studie se zúčastnilo 249 pacientů. U pacientů, kteří po infarktu myokardu zemřeli, byla průměrná sérová koncentrace ADMA 1,23  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , zatímco u pacientů, kteří byli naživu po jednom roce sledování, byla tato hodnota daleko nižší 0,95  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Zdá se tedy, že kromě tradičních biomarkerů, může mít hladina cirkulujícího ADMA silnou prognostickou hodnotu pro úmrtnost po prodělání infarktu myokardu. Stejně tak Sen a kolektiv vysoké hladiny cirkulujícího ADMA spojují se zvýšeným rizikem úmrtí do jednoho roku po prodělání infarktu myokardu. Vysoké hladiny cirkulujícího ADMA byly navíc spojeny se zhoršenou perfuzí myokardu. [36,37]

Velká populační studie Lorin a kolektivu, čítající 612 pacientů hospitalizovaných pro akutní infarkt myokardu, našla silný inverzní vztah mezi sérovými hladinami ADMA a HDL cholesterolu. HDL cholesterol přitom vykazuje v kardiovaskulárním systému antiaterogenní, antioxidační a protizánětlivé účinky. Pacientům byly v den příjmu

odebrány vzorky krve, které se následně použily pro analýzu. Podle sérové hladiny HDL cholesterolu byly pacienti rozděleni do dvou skupin, s nízkým a vysokým HDL cholesterolem. Skupina s nízkým HDL cholesterolem byla definována jako koncentrace < 40 mg/dl u mužů a < 50 mg/dl u žen, nízký HDL cholesterol mělo 59% pacientů. Naměřená střední hodnota koncentrace ADMA byla výrazně vyšší u skupiny s nízkým HDL cholesterolem 0,69  $\mu\text{mol l}^{-1}$  oproti skupině s vysokým HDL cholesterolem 0,50  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Zajímavé také je, že hladiny SDMA a L-argininu, byly u obou skupin takřka stejné. Ve vícerozměrné regresní analýze hladiny ADMA silně korelovaly s nízkou hladinou HDL cholesterolu. [38,39]

Bergheanu a kolektiv poukázal na zjištění, že hladiny cirkulujícího ADMA u pacientů s akutním infarktem myokardu vykazují ranní maximum. Naměřené sérové koncentrace ADMA se pohybovaly v rozmezí 0,43–1,66  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Den byl rozdělen na 4 šestihodinové intervaly během kterých se zaznamenávala četnost pacientů, hlásících se na příjem. Nejčetnější frekvence pacientů na příjmu byla hlášena v intervalu 06:00-11:59 hodin. S tímto ranním maximem korespondovaly i získané střední hodnoty sérové koncentrace ADMA. Nejvyšší střední hodnota sérové koncentrace ADMA byla ve zmíněném ranní intervalu 06:00-11:59 hodin a to 0,84  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , pro srovnání střední hodnoty sérové koncentrace ADMA v dalších následujících šestihodinových intervalech byly 0,77; 0,74 a 0,66  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . [40]

Jako strategický léčebný postup u pacientů s akutním koronárním syndromem, především pak pro STEMI, se používá perkutánní koronární intervence (PCI). Po dramatickém snížení úmrtnosti spojené s užíváním PCI však úmrtnost z kardiovaskulárních příčin stále zůstává až na 40 %. [41]

Huang a kolektiv se zabývali studiem restenózy ve stentu po provedení PCI. Zdá se, že důležitým podkladem pro rozvoj restenózy ve stentu je neoateroskleróza. Zároveň bylo hlášeno, že rozvoj neoaterosklerózy souvisí se špatnou reendotelizací a dysfunkcí endotelu po zavedení koronárního stentu. [42,43,44]

Mnohé mechanismy působení ADMA při rozvoji aterosklerózy zde byly popsány. Gremmel a kolektiv navíc poukázali na silnou asociaci zvýšených hladin cirkulujícího ADMA se zvýšenou expresí a aktivací glykoproteinového komplexu IIb/IIIa po zavedení stentu. Aktivovaný glykoproteinový komplexu IIb/IIIa je citlivým markerem aktivace trombocytů. Krzanowski a kolektiv také uvedli, že hladiny cirkulujícího ADMA

pozitivně a nezávisle korelovaly se stupněm kalcifikace v radiální tepně předloktí u pacientů pokročilým onemocněním ledvin. [45,46]

Studie Huang a kolektivu se zaměřila se na vztah mezi morfologickými a kompozičními charakteristikami tkáňových lézí u restenózy ve stentu a plazmatickými hladinami ADMA. Studie se zúčastnilo 45 pacientů, u nichž byla prokázána restenóza definovaná jako zúžení lumen uvnitř stentu větší, nebo rovno 50 %. Střední hodnota časového horizontu rozvoje restenózy ve stentu byla 58 měsíců. U 17 pacientů byly použity holé kovové stenty, u 12 pacientů lékové stenty 1. generace a u 16 pacientů lékové stenty 2. generace. Stanovení plazmatické koncentrace ADMA bylo provedeno metodou ELISA. Pro hodnocení tkáňových charakteristik restenózy ve stentu in vivo byla použita optická koherentní tomografie. Parametry posuzované ve stentu v souvislosti s plazmatickou koncentrací ADMA byly homogenní neointima, neoateroskleróza (lipidem vyplněná neointima) a kalcifikace v neointimě. Homogenní neointima byla identifikována jako oblasti se silným signálem a nízkým útlumem, neoateroskleróza jako homogenní oblast s výrazným útlumem signálu a difuzní hranicí a kalcifikace v neointimě jako heterogenní oblast s nízkým útlumem signálu a ostře ohraničenou hranicí. Průměrná plazmatická koncentrace ADMA u pacientů s restenózou ve stentu byla  $1,05 \pm 0,22 \mu\text{mol l}^{-1}$ . 12 lézí bylo klasifikováno jako homogenní neointima a 33 jako neoateroskleróza. Pacienti s neoaterosklerózou ve stentu měli významně vyšší průměrnou plazmatickou koncentrací ADMA  $1,12 \pm 0,21 \mu\text{mol l}^{-1}$  v porovnání s pacienty s homogenní neointimou ve stentu  $0,83 \pm 0,08 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Obdobně tomu bylo i u pacientů s kalcifikací ve stentu, kteří měli významně vyšší průměrnou plazmatickou koncentrací ADMA  $1,19 \pm 0,19 \mu\text{mol l}^{-1}$  v porovnání s pacienty bez kalcifikace ve stentu  $0,88 \pm 0,11 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Skupiny pacientů s neoaterosklerózou nebo kalcifikací ve stentu byly navíc starší a měly také významně horší funkci ledvin. Studie prokázala, že zvýšené hladiny ADMA v plazmě jsou spojeny s rozvojem neoaterosklerózy a kalcifikace ve stentu. [42]

V souvislosti prevence restenózy ve stentu bylo navrženo jako prospěšné podávání L-argininu jakožto antagonisty ADMA v inhibici NOS. Značný preventivní a terapeutický potenciál přinesla i preklinická studie, kde transgenní myši nadměrně exprimující DDAH1 vykazovaly nižší plazmatické hladiny ADMA, což vedlo ke zrychlené endotelové regeneraci a snížené neointimální hyperplazii po denudaci endotelu a vaskulárním poškození. [47,48]

Pan a kolektiv informovali, že zvýšené hladiny ADMA jsou také významně spojeny s vyšším rizikem úmrtnosti a dalších nežádoucích účinků u pacientů s chronicky selhávajícím srdcem. Výchozí hladiny ADMA by tak mohly být prediktorem jak nemocniční úmrtnosti, tak dlouhodobé úmrtnosti u pacientů se srdečním selháním. [49]

### 1.6.3 ADMA ve vztahu k onemocnění ledvin

Ledviny jsou jedním z klíčových orgánů, které se podílí na degradaci a eliminaci ADMA. Jednak v ledvinách dochází k expresi DDAH a AGTX2, dvou ústředních enzymů pro degradaci ADMA, ale také jsou ledviny schopny i přímé eliminace ADMA močí prostřednictvím renální exkrece. Ledviny jsou dokonce tkáň s největší expresí DDHA1 a zároveň vykazují nejvyšší DDAH aktivitu. Je proto zřejmé, že onemocnění ledvin může do různé míry rozvrátit metabolismus ADMA a dynamickou rovnováhu v něm ustálenou. [1,2,4,50]

V roce 1992 Vallance a kolektiv prokázali, že u hemodialyzovaných pacientů v terminálním stádiu onemocnění ledvin byl ADMA signifikantně zvýšený oproti kontrolním vzorkům. Ačkoliv nízká molekulová hmotnost ADMA jej předurčuje k úspěšné eliminaci hemodialýzou, výsledky publikovaných studií už tak jednoznačné nejsou. Některé studie sice prokázaly signifikantní pokles plazmatické koncentrace ADMA po dialýze, jiné však významné snížení nenalezly. Kielstein a kolektiv zjistili, že se po standardní hemodialýze v dialyzátu nachází pouze asi 12% množství ADMA z celkové denní produkce. Data naznačují, že dialýzu, a tedy eliminaci ADMA dialýzou, brzdí skutečnost, že ADMA se v krvi může vázat na plazmatické proteiny. [2,51,52]

Vallance a kolektiv také zjistili, že je ADMA u pacientů s terminálním onemocněním ledvin schopen inhibovat produkci NO<sup>•</sup> a to jak in vitro, tak in vivo, což následně vedlo k nežádoucí vazokonstrikci, hypertenzi, dysfunkci imunitního systému a rozvoji dalších zejména kardiovaskulárních rizikových faktorů. Zoccali a kolektiv později plazmatickou koncentraci ADMA, u pacientů s terminálním onemocněním ledvin, spojili s predikcí kardiovaskulárních výsledků a úmrtnosti u těchto pacientů. [51,53]

S tím koresponduje i studie Tripepi a kolektivu, ti v kohortě 225 hemodialyzovaných pacientů pozorovali interakci mezi biomarkery zánětu a ADMA. Ve skupině, která měla jak zvýšenou hladinu cirkulujícího ADMA, tak zvýšenou hladinu C-reaktivního proteinu byla vyšší úmrtnost ve srovnání se skupinami, které měly zvýšený pouze jeden

ze zmíněných analytů. Autoři proto dospěli k závěru, že zánět může zvyšovat riziko úmrtí a kardiovaskulárních příhod u hemodialyzovaných pacientů s vysokými hladinami cirkulujícího ADMA. [54]

Evropská pracovní skupina pro uremický toxin dokonce zařadila ADMA i SDMA mezi uremické toxiny. Uremický syndrom je charakterizován retencí velkého počtu sloučenin, které však za normálních okolností zdravé ledviny vyloučí. Jako uremické toxiny jsou klasifikovány ty sloučeniny, které jsou při onemocnění ledvin nejen zadržovány, ale také negativně interagují s biologickou funkcí ledvin. ADMA i SDMA jsou zařazeny mezi ve vodě rozpustné sloučeniny s molekulovou hmotností nižší než 500 Daltonů. [55]

Následně další studie prokázaly nárůst plazmatické koncentrace ADMA u pacientů s chronickým onemocněním ledvin. Nárůst cirkulujícího ADMA u pacientů s chronickým onemocněním ledvin je pravděpodobně kombinovaným výsledkem snížené vylučovací kapacity ledvin pro ADMA a zároveň snížené exprese nebo aktivity enzymu DDAH1 v poškozených ledvinách. [50,56,57,58,59]

Eiselt a kolektiv zkoumali ADMA jako prognostický faktor na vývoj chronického onemocnění ledvin. Hladiny ADMA v séru byly měřeny spolu s dalšími proměnnými souvisejícími s oxidačním stresem jako jsou například produkty pokročilé glykace, nebo produkty pokročilé oxidace bílkovin. Studie se zúčastnilo 181 nedialyzovaných pacientů s chronickým onemocněním ledvin ve stádiu 3-5. Pacienti byli hodnoceni na začátku studie a následně 6 a 12 měsíců po jejím zahájení. Výsledky se porovnávaly se 46 zdravými kontrolami. ADMA byl zvýšený u všech pacientů v rozmezí koncentrací 0,79–0,98  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , ale v průběhu roku se jeho hladiny příliš nezměnily, stejně tak tomu bylo i u produktů pokročilé oxidace bílkovin. Zato u 164 pacientů, kteří studii dokončili poklesla odhadovaná glomerulární filtrace a vzrostly produkty pokročilé glykace. Po statistickém vyhodnocení se došlo k závěru, že zvýšená koncentrace ADMA spolu se zvýšenými markery oxidačního stresu byly silnými prediktory progresu chronického onemocnění ledvin u pacientů s odhadovanou glomerulární filtrací mezi 25-40 ml / min / 1,73m<sup>2</sup>, tedy na hranici 3-4 stádia chronického onemocnění ledvin. [60]

Emrich a kolektiv se také zaměřili na nehemodialyzované pacienty s mírným až středně těžkým chronickým onemocněním ledvin. Vzorky plazmy pro analýzu ADMA, SDMA a dalších methylargininů byly získány ze studie CARE FOR HOME

od 528 nedialyzovaných pacientů s diagnózou chronického onemocnění ledvin. Studie probíhala od roku 2008 až do roku 2015. U všech pacientů byla každoročně sledována progresse chronického onemocnění ledvin a výskyt aterosklerotických kardiovaskulárních příhod. V průběhu studie chronické onemocnění ledvin progredovalo u 80 pacientů a u 145 pacientů došlo k výskytu aterosklerotických kardiovaskulárních příhod. Po statistickém vyhodnocení v jednorozměrných Coxových regresních analýzách byly zvýšené plazmatické hladiny všech analytů včetně ADMA spojeny jak s progresí chronického onemocnění ledvin, tak s aterosklerotickým kardiovaskulárním onemocněním. Naproti tomu v plně upravených Coxových regresních analýzách prognostické důsledky ADMA, a dalších methylargininů značně klesly a vysokou korelaci s rizikem progresse chronického onemocnění ledvin a s výskytem aterosklerotických kardiovaskulárních příhod vykazoval pouze SDMA. [61]

Vedle významné korelace SDMA s progresí chronického onemocnění ledvin a s výskytem kardiovaskulárních příhod, může být SDMA také výborným ukazatelem funkce ledvin především proto, že je vylučován z více jak 90 % renální exkrecí. Některé studie navrhují SDMA přidat mezi endogenní markery funkce ledvin nebo přímo nahradit měření kreatininu měřením SDMA. [2,62,63]

Tutarel a kolektiv monitorovali funkci ledvin u pacientů s vrozeným onemocněním srdce. Jako referenční metoda pro posouzení funkce ledvin byl použit výpočet odhadované glomerulární filtrace pomocí Larssonovy rovnice. Tato rovnice využívá pro výpočet glomerulární filtrace hodnotu sérového cystatinu C, která je lepším a citlivějším markerem renální dysfunkce než plazmatická koncentrace kreatininu. Zmíněná referenční metoda byla následně porovnávána s jinými rovnicemi pro výpočet odhadované glomerulární filtrace a také s plazmatickými koncentracemi SDMA, které rovněž mohou sloužit jako výborný marker renální funkce. Plazmatická koncentrace SDMA byla měřena pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Odhadovaná glomerulární filtrace byla dále ještě vypočítána například podle rovnice MDRD z anglického *Modification of Diet in Renal Disease*, která byla navržena ve stejnojmenné studii, která se zabývala vlivem nízkoproteinové diety na rychlost progresse chronického onemocnění ledvin. Rovnice MDRD pro svůj výpočet zohledňuje hned několik parametrů, a to plazmatickou koncentraci kreatininu, močoviny a albuminu a dále parametry jako věk a pohlaví. Jiná rovnice pro výpočet odhadované glomerulární filtrace se nazývá CKD-EPI z anglického *Chronic Kidney Disease Epidemiology*

*Collaboration*. Tato rovnice byla navržena ve studii Levey a kolektivu, pro odhad glomerulární filtrace u pacientů s chronickým onemocněním ledvin. Rovnice CKD-EPI využívá pro výpočet glomerulární filtrace čtyři proměnné, a to sérovou koncentraci kreatininu, věk, pohlaví a rasovou příslušnost. Obě zmíněné rovnice, a především pak CKD-EPI jsou v praxi široce využívány. Studie Tutarela a kolektivu prokázala silnou korelaci mezi referenční metodou založenou na stanovení cystatinu C a metodami pro výpočet odhadované glomerulární filtrace MDRD a CKD-EPI. Pozoruhodné však bylo, že nejsilnější korelace byla vypočítána mezi stanovenými hodnotami SDMA a referenční metodou. SDMA tak překonal konvenčně používané metody MDRD a CKD-EPI a mohl by být do budoucna velmi slibným markerem pro hodnocení renální funkce. [64,65,66,67]

U pacientů s chronickým onemocněním ledvin je častou komplikací rozvoj anémie. Nedostatečná syntéza erythropoetinu v důsledku redukce renální tkáně a její funkce je nejčastější příčinou anémie u těchto pacientů. Pro léčbu anémie u chronického onemocnění ledvin se používá rekombinantní lidský erythropoetin už od roku 1986. Vedle léčebných účinků erythropoetinu byly však pozorovány také jeho vedlejší účinky. Často pozorovaným nepříznivým účinkem dlouhodobého podávání erythropoetinu je zvýšení arteriálního tlaku u pacientů a experimentálních zvířat s chronickým selháním ledvin. Wang a kolektiv následně prokázal, že erythropoetin u in vitro kultivovaných lidských endotelových buněk snižuje expresi endoteliální NOS a s ní je spojena snížená produkce NO<sup>•</sup>. Následně se objevily studie, poukazující na souvislost mezi erythropoetinem a ADMA. Scalera a kolektiv prokázal, že erythropoetin u in vitro kultivovaných endotelových buněk inhibuje syntézu NO<sup>•</sup>, což se projevilo rozvojem oxidačního stresu v buňce. V závislosti na dávce erythropoetinu došlo také k signifikantnímu nárůstu intracelulární koncentrace ADMA. Zároveň se také zjistilo, že nárůst oxidačního stresu způsobený dávkou erythropoetinu snižoval aktivitu enzymu DDAH v endotelové buňce, což vedlo k dalšímu nárůstu intracelulární koncentrace ADMA. Posléze bylo také in vivo pozorováno zvýšení plazmatické koncentrace ADMA u pacientů po prvotní léčbě erythropoetinem. V roce 2017 Yokoro a kolektiv poukázali na možnost, že zvýšené intracelulární koncentrace ADMA mohou přispívat ke zhoršení anémie. U pacientů v pokročilém stádiu chronického onemocnění ledvin byly jednak nižší koncentrace hemoglobinu spojeny s vyšší intracelulární koncentrací ADMA, ale také zvýšené intracelulární hladiny ADMA korelovaly se zvýšením indexu rezistence vůči



erythropoetinu. Pokusy na myších se následně měly přiblížit pokročilému stádiu chronického onemocnění ledvin provedením téměř úplně nefrektomie. Takové myši potom stejně jako u popsáných pacientů vykazovaly pokles hemoglobinu v erythrocytech doprovázený zvýšením intracelulární koncentrace ADMA. U myši divokého typu navíc byla prokázána snížená exprese genu pro receptor erythropoetinu. Zvýšené intracelulární koncentrace ADMA by tak mohly přispívat ke zhoršení odpovědi na léčbu erythropoetinem. [2,68,69,70,71]

## 1.7 Možnosti stanovení asymetrického dimethylargininu

Plazmatické koncentrace methylovaných argininů, tedy i ADMA, se u zdravých jedinců pohybují v submikromolárním rozmezí a nanejvýš v několika jednotkách mikromol u nemocných. Koncentrace ostatních aminokyselin jsou o dva až tři řády vyšší. Je tedy zřejmé, že kvantifikace ADMA v plazmě s sebou přináší určitou analytickou výzvu. [4,72]

Většina publikovaných metod využívá pro stanovení ADMA vzorky plazmy nebo séra s požadavkem na objem v rozmezí 0,02–1,5 ml. U vzorků plazmy se jako antikoagulans používá ethylendiamintetraoctová kyselina nebo heparin. Použití citrátu sodného se nedoporučuje, neboť relativně velký objem tohoto roztoku ve zkumavce může odebranou krev značně naředit. Vzorky plazmy se mohou uchovávat při teplotě -70 °C a nižší neomezeně dlouhou dobu. Několik let skladování plazmy při teplotě -20 °C taktéž nepřineslo změny v koncentracích methylovaných argininů. Bylo také prokázáno, že opakované cykly zmrazení a rozmrazení koncentrace ADMA a SDMA neovlivní. K výrazným změnám plazmatických koncentrací ADMA a SDMA nedošlo ani při pokojové teplotě během 24 hodin. [72,73]

Pro simultánní stanovení ADMA a dalších dimethylargininů se využívají především chromatografické separační metody, a to zejména vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) ve spojení s fluorescenční detekcí. Velké oblibě se v posledních letech těší také kapalinová a plynová chromatografie ve spojení s detekcí hmotnostní. Enzymoimunoanalýza (ELISA), kterou řadíme mezi metody imunochemické, se díky své nenáročnosti často používá v rutinní praxi. U této metody je však vyloučena simultánní analýza. ADMA se podařilo také stanovit pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí a pomocí kapilární elektroforézy, tyto metody jsou však využívány spíše minoritně. [4,74]

### 1.7.1 HPLC s UV a fluorescenční detekcí

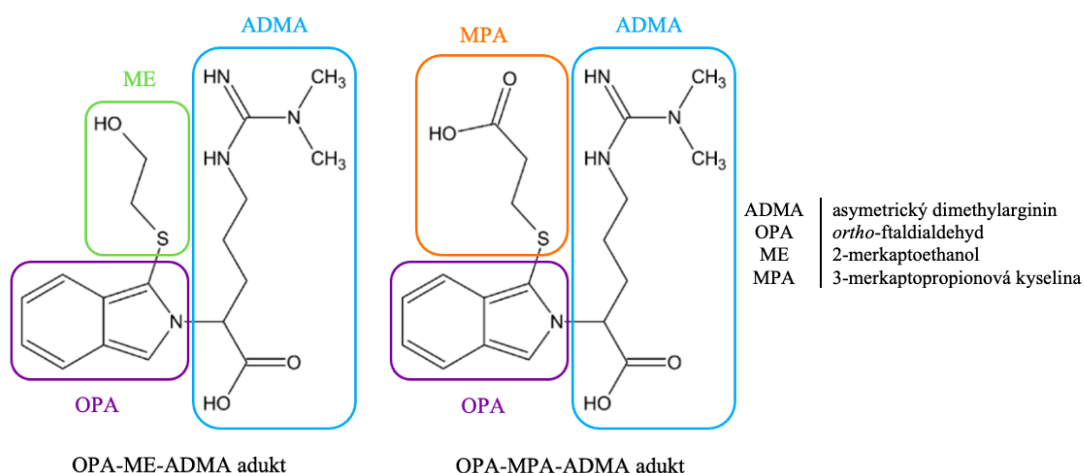
Analýza aminokyselin se standardně prováděla pomocí iontově výměnné chromatografie s derivatizací za kolonou. Takto bylo možné vedle základních aminokyselin stanovit i posttranslačně modifikované aminokyseliny, včetně ADMA. Aby však bylo získáno dobré rozlišení, vyžadovala tato metoda velmi dlouhou dobu analýzy, což není výhodné pro měření většího množství vzorků. Zkrátit dobu analýzy se podařilo použitím HPLC s obrácenou fází a derivatizací před kolonou. V současnosti se pro stanovení ADMA hojně využívá metoda HPLC s fluorescenční detekcí. [4,72]

Před samotnou chromatografickou separací je vhodné nejprve vzorek plazmy či séra vyčistit, čímž se jednak eliminuje převážná část složek matrice a taktéž se vzorek zakoncentruje. Většina metod v současné době spoléhá na propracované vyčištění vzorku pomocí extrakce na pevné fázi (SPE). Pro tyto účely se nejčastěji používají kolonky s iontově výměnnou fází na bázi polymeru, jako například Oasis MCX od firmy Waters nebo Strata<sup>TM</sup>-X-C od firmy Phenomenex, méně potom kolonky na bázi oxidu křemičitého. Kolonky na bázi polymeru jsou sice stejně efektivní jako kolonky na bázi oxidu křemičitého, vzorek se však před jejich použitím už nemusí upravovat a mezi jednotlivými kroky SPE mohou kolonky vyschnout. Čištění vzorku pomocí SPE zahrnuje dílčí kroky jako je kondicionace a ekvilibrace kolonky, samotné nanesení vzorku a jeho následné promytí a eluce. Po nanesení vzorku na kolonku se jeho složky zachytí v pevné fázi. Promytím se z pevné fáze uvolní převážná část složek matrice jako jsou neutrální a kyselé aminokyseliny. Elucí se z pevné fáze nakonec uvolní přečištěný vzorek, který obsahuje bazické aminokyseliny, kam patří i ADMA a další methylované argininy. K promytí a eluci se používají rozpouštědla o specifickém pH v závislosti na konkrétně zvoleném typu SPE kolonky. Kromě toho by eluční rozpouštědlo mělo nejen narušit interakci mezi analytem a pevnou fází, ale také by mělo analyty dobře rozpouštět a být těkavé povahy, aby se z eluátu dalo nakonec odpařit. Nejčastější složkou elučního rozpouštědla bývá 25% amoniak ve směsi s methanolem. Z výše uvedeného je patrné, že vyčištění vzorku je poměrně pracné, postup je však možné plně automatizovat. Zároveň jsou dostupné i miniaturní SPE kolonky ve formátu mikrotitrační destičky, které umožňují vyčištění daleko většího počtu vzorků než klasický SPE manifold. [4,72]

UV detekce hladin methylargininů jakožto aminokyselin je často založena na absorpci světla karboxylové skupiny při vlnové délce 200–210 nm. Kromě aminokyselin však poskytuje většina organických molekul silnou UV absorpci na vlnových délkách menších

než 210 nm. Stanovení nederivatizovaných aminokyselin s dostatečnou citlivostí a selektivitou v UV detektorech je proto velmi obtížné a většina HPLC metod se dnes spoléhá spíše na fluorescenční detekci s použitím derivatizačních činidel. [75]

Derivatizace před kolonou je velmi přínosná, protože reakcí ADMA s derivatizačním činidlem dojde k jeho přeměně na adukt, který lze detekovat s daleko vyšší citlivostí. Derivatizace také zvyšuje hydrofóbnost velmi polárních aminokyselin, což je činí vhodnějšími pro separaci pomocí HPLC s obrácenou fází. Derivatizačních činidel užívaných pro stanovení ADMA byla popsána celá řada, zdaleka nejpoužívanější je však *ortho*-ftaldialdehyd (OPA). Důležitými výhodami OPA jsou okamžité vytvoření aduktu s aminokyselinou při pokojové teplotě a fakt, že samotné činidlo není fluorescenční. Vznikají tak relativně čisté chromatogramy. Aby však OPA s primární aminoskupinou aminokyseliny reagoval je pro vznik vazby potřebná thiolová skupina. Jedněmi z nejčastějších thiolových činidel jsou buď 2-merkptoethanol nebo 3-merkptopropionová kyselina. Aduky OPA s 3-merkptopropionovou kyselinou jsou stabilnější a zároveň polárnější, kvůli přítomnosti další karboxylové skupiny. Vazba ADMA s OPA obsahující 2-merkptoethanol nebo 3-merkptopropionovou kyselinu je znázorněna na obrázku 4. Derivatizační činidlo může u aminokyselin také významně zvýšit jejich selektivitu tím, že se naváže na nějakou reaktivní funkční skupinu, čímž danou aminokyselinu selektivně označí. Selektivní činidla pro derivatizaci ADMA a dalších methylovaných argininů však popsána zatím nebyla, a proto se za účelem zvýšení selektivity nejčastěji používá extrakce na pevné fázi. Mezi další popsaná derivatizační činidla patří například naftalen-2,3-dikarboxaldehyd, 6-aminochinolylyl-*N*-hydroxysukcinimidyl karbamát nebo-li AccQ-Fluor<sup>TM</sup>, 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol, nebo fenyliothioiokyanát, která poskytují buď stabilnější deriváty nebo vyšší citlivost analýzy v porovnání s OPA. Například u derivatizace pomocí naftalen-2,3-dikarboxaldehyd je potřebná delší doba inkubace. Derivatizací AccQ-Fluor<sup>TM</sup> vzniknou deriváty stabilní až jeden týden při pokojové teplotě, ale doba analýzy se s jeho použitím prodlouží až na 50 minut. Asi nejlepší výsledek přináší 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol s potřebnou dobou inkubace 3 minuty a stabilitou vzniklých derivátů až 3 dny při pokojové teplotě. [4,72,76,77,78,79]



**Obrázek 8** Aduktý ADMA po derivatizační reakci s OPA, upraveno dle [72]

Aby se předešlo náhodným chybám, které vznikají při čištění a derivatizaci vzorku, je třeba použít vnitřní standard. Vhodný vnitřní standard by měl být podobný stanovovanému analytu do té míry, aby byla zároveň umožněna jeho dostatečná separace s plným chromatografickým rozlišením. Interní standard by se měl eluovat při SPE s bazickými aminokyselinami, měl by obsahovat primární aminoskupinu pro umožnění derivatizace a měl by mít podobnou polaritu jako ostatní derivatizované analyty. Pokud je to možné, neměl by se endogenně vůbec vyskytovat. Pokud však toto nelze zajistit, měla by koncentrace vnitřního standardu být alespoň signifikantně vyšší než předpokládaná koncentrace stanovovaných analytů. Z endogenní látek se jako vnitřní standard nejčastěji používá  $N^G$ -monomethyl-L-arginin, méně potom L-homoarginin. Úspěšně byl také použit jako neendogenní vnitřní standard  $N^{\omega}$ -propyl-L-arginin. [72,76,77,78,80]

Chromatografická separace methylovaných argininů se obvykle provádí pomocí HPLC s obrácenou fází za použití izokratické nebo gradientové eluce. ADMA a SDMA jakožto enantiomery jsou si velmi podobné, proto je jejich vzájemná separace ze všech methylovaných argininů nejnáročnější. Separace se konvenčně provádí na kolonách C18. Další možností je použití kolon fenylových. Na kolonách C18 se ADMA zpravidla eluuje dříve než SDMA, u kolon fenylových tomu bývá naopak. Celková doba separace se na těchto kolonách pohybuje kolem 30 minut a více. Použití monolitických kolon na bázi oxidu křemičitého, například Chromolith Performance HPLC RP18-e od firmy Merck, přineslo výrazné zkrácení doby separace, protože ji lze provozovat při vysokém

průtoku se zachováním dobré separační účinnosti a nižším protitlakem, oproti konvenčním kolonám. [72,81]

Ravula a kolektiv přišli s jednoduchou metodou stanovení ADMA, SDMA a L-homocysteinu v plazmě, nebo séru pomocí HPLC s UV detekcí. Metoda zahrnovala jednoduchou úpravu vzorku precipitací proteinu pomocí trichloroctové kyseliny. Následně byl po centrifugaci získán čirý supernatant, ke kterému se přidalo derivatizační činidlo fenylizothiokyanát. Chromatografická separace byla provedena na koloně C18 s obrácenou fází, při průtoku 1 ml/min a teplotě 37 °C. Mobilní fáze sestávala z acetátového pufru, ke kterému byl lineárním gradientem přidáván acetonitril ve vodě. Fenylizothiokyanátové deriváty byly detekovány při 256 nm pomocí fotodiodového detektoru. Analýza trvala 30 minut. Metoda byla lineární v rozmezí koncentrací 0.3–3.75  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , s limitem detekce 17,6  $\text{pmol l}^{-1}$ . Průměrná koncentrace ADMA naměřená u zdravých subjektů byla  $0.65 \pm 0.29 \mu\text{mol l}^{-1}$ . [79]

Schou-Pedersen a kolektiv stanovovali L-arginin, ADMA a SDMA v lidské plazmě metodou HPLC s fluorescenční detekcí a zaměřili se na porovnání tří postupů úpravy vzorku, před jeho vlastní analýzou. První postup byl zaměřen na precipitaci proteinu pomocí kyseliny trichloroctové ve vodném roztoku. Druhý postup opět vedl k precipitaci proteinu tentokrát pomocí směsi amoniaku s acetonitrem. Třetí postup byl proveden extrakcí na pevné fázi. U postupu SPE se při promývacích krocích použil nejprve methanol a poté kyselina chlorovodíková. Eluce byla provedena pomocí elučního činidla obsahujícího 25 % amoniak, vodu, methanol a hydroxid sodný. Očištěný vzorek se následně derivatizoval pomocí derivatizačního činidla obsahujícího OPA a 2-merkptoethanol. Chromatografická separace proběhla na koloně C18 izokratickou elucí, při průtoku 1,2 ml/min. Mobilní fáze byla složená z fosfátového pufru se 14 % acetonitrem. Detekce proběhla při vlnové délce excitační 340 nm a emisní 455 nm. Analýza trvala 30 minut. Metoda byla lineární s koeficientem determinace pro ADMA 0,994, limit detekce byl 0,012  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Průměrná plazmatická koncentrace ADMA u zdravých jedinců byla  $0.40 \pm 0.013 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Výtěžnost pro první a třetí postup úpravy vzorku byla srovnatelná, pro oba postupy nad 90 %, výtěžnost pro druhý postup byla méně než 75 %. Vzhledem k jednoduchosti a rychlosti provedení prvního postupu, byl tento doporučen. [82]

HPLC metody s UV a fluorescenční detekcí jsou pro stanovení ADMA často využívány především kvůli jejich nenáročnosti na laboratorní vybavení. Jejich použití

však skýtá řadu nevýhod. Jednak se mohou vyskytnout problémy s citlivostí a vysokou polaritou analyzovaných látek, ale ty se dají odstranit použitím vhodného derivatizačního činidla. Špatná stabilita vzniklých derivátů je však i dnes stále aktuální. Nevýhodou také je, že separace enantiomerů ADMA a SDMA lze dosáhnout pouze chromatograficky, a navíc je tato separace obtížná a poměrně časově náročná. [75]

### 1.7.2 HPLC s elektrochemickou detekcí

Kleparnik a kolektiv vyvinuli a validovali metodu HPLC s elektrochemickou detekcí pro simultánní stanovení L-argininu, ADMA a SDMA v plazmě. Pro analýzu byla použita krev od hypertenzních pacientů s akutním infarktem myokardu (n=40). Vzorky krve byly odebrány do zkumavek s ethylendiamintetraoctovou kyselinou, zcentrifugovány a vzorky separované plazmy byly následně vyčištěny pomocí SPE popsanou de Jong a kolektivem s menšími modifikacemi. Konkrétně, polymerní SPE kolonky byly kondicionovány s 1 ml elučního činidla složeného z 25 % amoniaku, vody, methanolu a hydroxidu sodného. Následovala ekvilibrace s 1 ml vody. Vzorek plazmy se smíchal s roztokem vnitřního standardu  $N^G$ -monomethyl-L-argininem a s fosfátem pufovaným fyziologickým roztokem (PBS) a poté se nanesl 1 ml takto připraveného vzorku na kolonku. Následovaly kroky promývací, nejprve 1 ml HCl a poté 1 ml methanolu. Pomocí 1 ml elučního činidla byl získán eluát, který se nakonec vysušil pod proudem dusíku při teplotě 70 °C. Derivatizační reakce byla opět provedena podle metody popsané de Jong a kolektivem. Vysušené vzorky byly rozpuštěny v derivatizačním činidle, které obsahovalo OPA a 3-merkaptopropionovou kyselinu. Následovala inkubace po dobu 10 minut při pokojové teplotě a poté se vzorky neutralizovaly přidáním roztoku dihydrogenfosforečnanu draselného. Chromatografická separace byla provedena za izokratických podmínek na koloně s obrácenou fází SynergiHydro RP při 25 °C. Mobilní fáze sestávala z fosforečnanového pufru obsahujícího 10 % acetonitrilu. Rychlost průtoku byla nastavena na 1 ml/min a coulometrická detekce byla provedena při potenciálu +320 mV. ADMA se separoval před SDMA a jejich oddělení vykazovalo rozlišení  $R_S = 1,35$ . Celá analýza trvala 32 minut. Metoda byla lineární v rozmezí koncentrací 0,1–20  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , limit detekce byl pro ADMA 0,012  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Absolutní výtěžnost naměřená u všech analytů se pohybovala od 85 do 88 %. Naměřená koncentrace ADMA ve vzorcích plazmy se pohybovala v rozmezí 0,29–1,05  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . [4,81,83]

Suzuki a kolektiv se taktéž zabývali stanovením ADMA a SDMA a dalších methylargininů pomocí kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí. Inovace, se kterou přišli, spočívala v použití elektrochemicky aktivnějšího thiolového činidla 6-ferrocenyl-1-hexanthiolu, který s OPA a ADMA poskytoval daleko stabilnější adukt v porovnání s 2-merkptoethanolem. Zatímco 2-merkptoethanol vyžadoval rychlou derivatizaci při teplotě 4 °C, adukty s 6-ferrocenyl-1-hexanthiolem byly stabilní 6 hodin při pokojové teplotě. Analýza byla provedena na vzorcích lidské plazmy od urologických pacientů. Pro zlepšení identifikace píků a selektivity byla použita duální elektrochemická a fluorescenční detekce. Vzorky heparinované plazmy byly vyčištěny SPE postupem, téměř identicky jako popisuje Teerling a kolektiv nebo Horowitz a Heresztyn. Polymerní SPE kolonky byly kondicionovány 1ml methanolu a ekvilibrovány 2 ml vody. Vzorek plazmy se smíchal s vnitřním standardem *N*<sup>ω</sup>-propyl-L-argininem a s PBS. Takto připravený 1 ml vzorku se nanas na SPE kolonky. Následovalo promytí, nejprve 1 ml HCl, poté 1 ml methanolu. Methylargininy byly eluovány pomocí 1 ml elučního činidla, které obsahovalo koncentrovaný amoniak, vodu, methanol a 2-propanol. Eluát byl následně vysušen pod proudem dusíku při teplotě 60 °C. Po vysušení byl vzorek opět resuspendován ve fosfátovém pufru a pro derivatizační reakci bylo přidáno OPA činidlo obsahující OPA a 6-ferrocenyl-1-hexanthiol. Inkubace proběhla při pokojové teplotě a trvala 10 min. Chromatografická separace byla provedena na koloně Wako Combi ODS. Mobilní fáze sestávala z fosforečnanového pufru a acetonitrilu, průtok byl nastaven na 0,8 ml/min. Elektrochemická detekce proběhla při potenciálu +1000 mV, u fluorescenční detekce byla zvolena vlnová délka pro excitaci 340 nm a pro emisi 455 nm. Metoda byla lineární do 150 μmol l<sup>-1</sup>, detekční limit byl pro dimethylargininy 0,5 pmol l<sup>-1</sup> u elektrochemické detekce a 2 pmol l<sup>-1</sup> u fluorescenční detekce. Suzuki a kolektiv uvedl, že se citlivost u fluorescenční detekce zvýšila asi desetkrát a u elektrochemické detekce dokonce více než třicetkrát ve srovnání s MacAllisterem a kolektivem, který místo 6-ferrocenyl-1-hexanthiolu použil 2-merkptoethanol. Selektivita se s duální detekcí také zlepšila. Výťažnost naměřená u všech analytů se pohybovala od 89,1±7,2 do 91±7,5 % pro elektrochemickou detekci a pro fluorescenční detekci od 86,6±8 do 91±8,2 %. Naměřená koncentrace ADMA ve vzorcích plazmy se pohybovala v rozmezí 0,49–0,75 μmol l<sup>-1</sup>. [4,72,84,85]

### 1.7.3 Kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí

Detekce pomocí hmotnostní spektrometrie poskytuje daleko vyšší selektivitu než detekce pomocí UV absorbance nebo fluorescence. Metody využívající hmotnostní detekci proto nevyžadují tak pracnou přípravu vzorku jako metody s UV, fluorescenční nebo elektrochemickou detekcí, a přesto přináší spolehlivé výsledky. Kromě charakteristických retenčních časů je zde i další dimenze selektivity spočívající v identifikaci látek na základě charakteristického poměru molekulové hmotnosti k náboji ( $m/z$ ) respektive na základě záznamu relativních intenzit stanovovaných analytů po ionizaci. U hmotnostní spektrometrie v kombinaci s kapalinovou chromatografií se nejčastěji využívají měkké ionizační techniky probíhající za atmosférického tlaku jako ionizace elektrosprejem či chemická ionizace. Achillovou patou ionizačních technik v hmotnostní spektrometrii je však vznik takzvaných matricových efektů. Ty jsou typické pro analýzy ze vzorků plazmy a jiných biologických tekutin se složitou matricí, tedy obsahem složité směsi nejrůznějších látek. Matricový efekt pravděpodobně vzniká tehdy, pokud se stanovovaným analytem koeluuje ještě nějaká jiná nezjištěná matricová složka. Taková koeluce následně může vést k zeslabení nebo naopak zesílení ionizace stanovovaného analytu, ovlivnit odezvu detektoru a vést tak k nepřesným výsledkům. Matricový efekt je navíc nepředvídatelný a může se lišit mezi analýzou různých vzorků i při opakované analýze stejného vzorku. Matricové efekty lze minimalizovat zdokonalením úpravy vzorku se získáním co nejčistších extraktů, optimalizací chromatografického postupu k oddělení stanovovaných analytů od matricových složek a změnou ionizačních podmínek nebo kombinací výše uvedeného. Nejúčinnějším způsobem pro potlačení matricového efektu je však použití stabilního izotopicky značeného vnitřního standardu odvozeného od stanovovaného analytu. [86,87,88,89]

Boelaert a kolektiv stanovovali ADMA a SDMA v lidském séru pomocí extrémně účinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Koncentrace ADMA a SDMA byly stanovovány u kontrolní skupiny zdravých jedinců a u hemodialyzovaných pacientů s chronickým onemocněním ledvin. K vzorku séra se přidal vnitřní standard  $d_7$ -ADMA. Následovala deproteinace pomocí tepelné denaturace s šokovým ochlazením a následnou ultrafiltrací. Ultrafiltrát byl poté derivatizován pomocí kyseliny chlorovodíkové a 1-butanolu. Chromatografická separace proběhla na koloně C18 s gradientovou elucí při průtoku 0,25 ml/min. Mobilní fáze obsahovala kyselinu octovou a methanol. Detekce proběhla po ionizaci elektrosprejem



na tandemovém kvadrupólovém hmotnostním spektrometru. Analýza trvala pouhých 10 min. Metoda byla lineární v rozmezí koncentrací 0,1–4,94  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , limit detekce byl 7,9  $\text{nmol l}^{-1}$ . Průměrná sérová koncentrace ADMA u zdravé kontrolní skupiny byla  $0,52 \pm 0,07 \mu\text{mol l}^{-1}$  a u hemodialyzovaných pacientů s chronickým onemocněním ledvin  $0,84 \pm 0,19 \mu\text{mol l}^{-1}$ . [90]

Fleszar a kolektiv také stanovovali ADMA, SDMA, L-arginin a L-citrulin v lidském séru pomocí extrémně účinné kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Sérum bylo získáno z krve od zdravých dobrovolníků ( $n=73$ ). K vzorku séra se přidaly vnitřní standardy, pro ADMA vnitřní standard  $d_7$ -ADMA a extrakce a derivatizace byla provedena v jediném kroku pomocí acetonitrilu v kombinaci s benzoylchloridem. Po centrifugaci byl odebrán čirý supernatant, který byl následně použit pro analýzu. Chromatografická separace proběhla na koloně s reverzní fází při průtoku 0,25 ml/min. Mobilní fáze sestávala z kyseliny mravenčí ve vodě. Detekce proběhla po ionizaci elektrosprejem na kvadrupólovém hmotnostním spektrometru. Celkový čas analýzy byl 10 minut. Metoda byla lineární v rozmezí koncentrací 0,05–2,5  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , limit detekce byl 0,03  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Průměrná koncentrace ADMA v séru od zdravých dobrovolníků byla  $0,38 \pm 0,05 \mu\text{mol l}^{-1}$ . [91]

I Sotgia a kolektiv stanovovali ADMA a další methylargininy pomocí extrémně účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Pro analýzu byly použity vzorky plazmy od zdravých dobrovolníků mužského pohlaví ( $n=20$ ). K vzorku plazmy byl přidán vnitřní standard  $d_6$ -ADMA. Deproteinace byla provedena pomocí tepelné koagulace plazmy. Jako derivatizační činidlo byl přidán diethylpyrokarbonát a po centrifugaci byl získán čirý supernatant připravený k použití pro analýzu. Chromatografická separace proběhla na koloně C18 s reverzní fází a izokratickou elucí při průtoku 0,8 ml/min. Mobilní fáze sestávala z kyseliny mravenčí v kombinaci s acetonitrilem. Detekce proběhla na tandemovém hmotnostním spektrometru po ionizaci elektrosprejem. Celkový čas analýzy byl 10 minut. Metoda byla lineární v rozmezí koncentrací 0,31–5,0  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , limit detekce byl 0,01  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Průměrná koncentrace ADMA v séru od zdravých dobrovolníků byla  $0,612 \pm 0,140 \mu\text{mol l}^{-1}$ . [92]

Spojením extrémně účinné kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií vynikají atraktivní metody charakteristické rychlou analýzou s jednoduchou a poměrně

levnou úpravou vzorku. Zejména tehdy, pokud se jako vnitřní standard používají analogy označené stabilním izotopem, jsou tyto metody vysoce selektivní, citlivé, spolehlivé, opakovatelné a reprodukovatelné. Dnes se tyto metody považují za zlatý standard a jsou vhodné pro použití v rutinní praxi. Zároveň pečlivé používání těchto metod může připravit cestu ke konzistentnějším výsledkům v klinických studiích. [86,90,91,92]

#### 1.7.4 Plynová chromatografie s hmotnostní detekcí

Analýza ADMA a ostatních methylargininů pomocí plynové chromatografie není bez derivatizace možná, neboť jsou tyto látky jakožto aminokyseliny polární, tepelně labilní a netěkavé. [86]

Albsmeier a kolektiv stanovovali ADMA v lidské plazmě od zdravých subjektů pomocí plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Pro analýzu byl nasyntetizován vnitřní standard [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA jiným označením  $\text{d}_6$ -ADMA. Syntéza vnitřního standardu proběhla na základě modifikovaného postupu Pundaka s Wilchekem. Zjednodušeně byla syntéza provedena reakcí L-ornitinu upevněného na bromkyanoagaróze s dimethylaminem. Vzorek plazmy byl obohacen [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA a pro deproteinaci byl přidán aceton. Po centrifugaci byl získán supernatant vysušen pod proudem dusíku a resuspendován v derivatizačním činidlo kyselině pentafluorpropionové. Vzniklé deriváty byly následně analyzovány. Chromatografická separace proběhla na koloně Optima-17, jako nosný plyn bylo použito helium při konstantním průtoku 1 ml/min. Pro detekci ADMA byla použita hmotnostní spektrometrie s chemickou ionizací, kterou byly získány specifické iontové fragmenty  $m/z$  634 pro ADMA a  $m/z$  640 pro [ $^2\text{H}_6$ ]-ADMA. Metoda byla lineární v rozmezí koncentrací 0,0–2,0  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , limit detekce byl 2 fmol  $\text{l}^{-1}$ . Průměrná koncentrace ADMA u zdravých subjektů byla 0,60  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . [93,94]

Tsikas a kolektiv v roce 2003 přišli s postupem de novo syntézy vnitřního standardu  $\text{d}_3\text{Me-ADMA}$  pro stanovení ADMA v plazmě a moči pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. V té době nebyly komerčně dostupné žádné analogy ADMA značené stabilním izotopem. Stručně de novo syntéza  $\text{d}_3\text{Me-ADMA}$  zahrnuje tyto dílčí kroky. Samostatnou *O*-methylaci karboxylové skupiny endogenního ADMA v plazmatickém vzorku pomocí kyseliny chlorovodíkové v methanolu a samostatnou *O*-methylaci karboxylové skupiny syntetického ADMA pomocí kyseliny chlorovodíkové v deuterovaném methanolu. Po methylaci byli endogenní a syntetický ADMA spojeni

do jediné matrice, která byla následně připravena pro derivatizaci pomocí kyseliny pentafluorpropionové. V roce 2007 se stal komerčně dostupným vnitřní standard pro analýzu ADMA značený deuteriem [ $^2\text{H}_7$ ]-ADMA neboli  $d_7$ -ADMA. Tsikas následně srovnává použití těchto dvou vnitřních standardů při analýze ADMA pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Oba vnitřní standardy byly vyhodnoceny jako vhodné pro analýzu ADMA. Nevýhodou  $d_3\text{Me}$ -ADMA a obecně de novo syntetizovaných analogů značených stabilním izotopem je, že musí být připraveny v matrici odlišné od biologického vzorku. Syntézou de novo v laboratoři se však získá přesná koncentrace vnitřního standardu. Na druhou stranu komerčně dostupný vnitřní standard značně zjednoduší postup celé analýzy a jeho použití umožňuje spolehlivější srovnání analytických výsledků a technik. Tsikas však varuje, že použití komerčních vnitřních standardů nemusí být vždy bezpečné. Komerční vnitřní standardy mohou obsahovat nečistoty. Navíc u komerčně získaného  $d_7$ -ADMA bylo odhaleno kolem více jak 20 % nadbytečného množství  $d_7$ -ADMA, než deklaroval výrobce. [95,96]

Bollenbach a kolektiv stanovovali ADMA v lidském séru pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí, metoda byla již dříve validována. Poukázali však na zajímavé zjištění, že ADMA je přítomen v lidské krvi nejen ve volné formě, nýbrž část z celkové plazmatické koncentrace ADMA je vázána na zatím bližší nespecifikované plazmatické proteiny. Běžně se stanovují koncentrace volného ADMA a proto celková plazmatická koncentrace ADMA může být zkreslená. Proto Bollenbach a kolektiv přišli s metodou, která je založená na dvou kvantitativních měřeních. Zprv kvantifikace volného ADMA v séru a zadruhé kvantifikace celkového ADMA (volný ADMA + vázaný ADMA) ve stejném vzorku séra po hydrolýze sérových proteinů kyselinou chlorovodíkovou. Koncentrace vázaného ADMA se následně vypočítá z rozdílu mezi oběma kvantitativními měřeními. Obě kvantitativní analýzy se provádějí paralelně. Vzorky séra byly získány od starších zdravých subjektů ( $n=27$ ). U kvantitativního stanovení volného ADMA se proteiny vysráží ledově chladnou kyselinou chlorovodíkovou v methanolu a odstraní se centrifugací. Získaný supernatant se následně úplně odpaří. Poté se provede esterifikace opět pomocí kyseliny chlorovodíkové v methanolu. Následně se přidají vnitřní standard  $d_3\text{Me}$ -ADMA a po odpaření vzorku do sucha se provede N-acylace anhydridem pentafluorpropionové kyseliny v ethylacetátu. Deriváty se následně extrahují toluenem. U kvantitativní analýzy vázaného ADMA se provede nejprve hydrolýza sérových proteinů zahřátím na  $110^\circ\text{C}$

s koncentrovanou kyselinou chlorovodíkovou v těsně uzavřených skleněných lahvičkách po dobu 20 hodin. Následující kroky jsou stejné jako u kvantitativní analýzy volného ADMA. Chromatografická separace byla provedena na koloně Optima 17, jako nosný plyn bylo použito helium při konstantní průtoky 1,0 ml/min. Detekce byla provedena na jedноступňovém kvadrupólovém hmotnostním spektrometru s použitím chemické ionizace. Průměrná koncentrace volného ADMA v séru byla  $0,47 \mu\text{mol l}^{-1}$  a u vázaného ADMA  $90 \text{ nmol l}^{-1}$  u starších zdravých subjektů. Poměr volného ADMA k vázanému ADMA byl stanoven na přibližně 6 : 1. Pro srovnání, v předchozí studii byla průměrná koncentrace vázaného ADMA v séru zdravých mladých subjektů  $121 \text{ nmol l}^{-1}$ . [97,98]

### 1.7.5 Kapilární elektroforéza

Caussé a kolektiv měřili cirkulující koncentrace L-argininu, ADMA a SDMA v lidském séru pomocí kapilární elektroforézy. Sérum bylo získáno od hemodialyzovaných pacientů s projevem ischemické choroby srdeční nebo bez něj. Před elektroforetickou analýzou byl vzorek séra derivatizován fluorescein-5-isothiokyanátem a následně inkubován ve tmě přes noc při pokojové teplotě. Na druhý den vždy proběhla jeho analýza. Jako vnitřní standard byl použit L-homoarginin. Elektroforetická separace v kapiláře byla provedena při pH 10 a napětí +20 kV (35  $\mu\text{A}$ ), pozitivní elektroda byla umístěna na straně nástřiku. Při zásaditém pH mají methylargininy tři náboje. Dva negativní jsou dány fluoresceinovým jádrem a karboxylovou skupinou a pozitivní vychází z guanidinu. Výsledný náboj je tedy -2 v důsledku čehož se tyto bazické aminokyseliny eluují před neutrálními aminokyselinami s celkovým nábojem -3 a kyselými aminokyselinami s celkovým nábojem -4. Tato skutečnost umožňuje velmi rychlou analýzu, která se pohybovala kolem 10 minut. Protože mají dimethylargininy stejný náboj, jejich vzájemné rozdělení závisí na odlišných molekulových hmotnostech. Detekce proběhla pomocí laserem indukované fluorescence, s použitím argonového laseru emitujícího záření o vlnové délce 488 nm. Metoda byla lineární s koeficientem determinace 0,998 pro ADMA, limit detekce byl  $0,05 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Výťažnost metody se pohybovala kolem 100 %. Průměrná koncentrace ADMA byla  $0,343 \pm 0,022 \mu\text{mol l}^{-1}$  u kontrolních vzorků, u hemodialyzovaných pacientů bez projevu ischemické choroby srdeční  $0,950 \pm 0,217 \mu\text{mol l}^{-1}$  a u hemodialyzovaných pacientů s projevem ischemické choroby srdeční  $1,205 \pm 0,201 \mu\text{mol l}^{-1}$ . [99]

Zinellu a kolektiv vylepšil svou metodu z roku 2007 pro stanovení methylargininů v plazmě pomocí kapilární elektroforézy. Pro předchozí metodu bylo potřeba velké množství vzorku a několik předanalytických kroků k eliminaci proteinu a zakoncentrování vzorku před nadávkováním do kapiláry. Nyní byla předúprava vzorku omezena pouze na přidání vnitřního standardu L-homoargininu a precipitaci proteinu pomocí acetonitrilu s amoniakem. Oddělený supernatant mohl být následně použit pro analýzu. Pro dosažení vyšší citlivosti detekce při zachování vysokého rozlišení byla použita technika zakoncentrování vzorku s elektrokinetickým dávkováním. Separace proběhla v roztoku základního elektrolytu trisfosfátu o pH 2,3 při 15 °C s normální polaritou a napětím +12 kV (68  $\mu$ A) s následným použitím UV absorpčního detektoru. Doba analýzy se pohybovala kolem 22 minut. Metoda byla lineární s koeficientem determinace 0,997 a limitem detekce 10 nM pro ADMA. Výtěžnost se pro ADMA pohybovala v rozmezí 99-104% a průměrná koncentrace ADMA ve vzorcích plazmy byla  $0.463 \pm 0.107 \mu\text{mol l}^{-1}$ . [100]

Desiderio a kolektiv také použili pro stanovení L-argininu, *N*<sup>G</sup>-monomethyl-L-argininu, ADMA s SDMA v lidské plazmě od zdravých subjektů metodu kapilární elektroforézy tentokrát však v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Metoda zahrnovala jednoduchou předúpravu vzorku precipitací pomocí kyseliny mravenčí a acetonitrilu zastudena. K supernatantu se následně přidal vnitřní standard d<sub>7</sub>-ADMA. Aby se dosáhlo detekční citlivosti vhodné pro analýzu ADMA a SDMA, zvolila se technika zakoncentrování vzorku s využitím elektrokinetického dávkování. Separace proběhla v kapiláře naplněné základním elektrolytem s kyselinou mravenčí při napětí +23 kV. Za těchto podmínek byly analyzované sloučeniny pozitivně nabitě a migrovaly ke katodě v krátkém čase. Pomocí tandemové spektrometrie s iontovou pastí byla provedena detekce MS<sup>2</sup> specifických fragmentů sledovaných analytů. Doba analýzy se pohybovala kolem 15 minut. Metoda byla lineární s koeficientem determinace 0,991 a limitem detekce 20 nmol l<sup>-1</sup> pro ADMA. Metoda měla dobrou výtěžnost. Průměrná koncentrace ADMA u zdravých subjektů byla  $0,42 \pm 0,05 \mu\text{mol l}^{-1}$ . [101]

### 1.7.6 ELISA

V roce 2004 vyvinul Schulze a kolektiv ELISA metodu pro stanovení ADMA v lidském séru, plazmě a jiných biologických tekutinách. Metoda byla validována a dnes

je komerčně dostupná ve formě ELISA kitů u celé řady společností, například DLD Diagnostika se sídlem v německém Hamburku. Metoda zahrnuje ošetření vzorku pomocí acylace a samotnou kompetitivní ELISU. Metoda obsahuje tyto dílčí kroky. Do jamek reakční mikrotitrační destičky se napipetují vzorky séra či plazmy a přidá se acylační činidlo. Následuje inkubace 20 minut při pokojové teplotě za stálého třepání. Alikvoty takto ošetřených vzorků se následně přepipetují do nové mikrotitrační destičky, jejíž jamky jsou potaženy ADMA. Do jamek s ošetřeným vzorkem se následně přidá antisérum obsahující králičí primární anti-N-acyl-ADMA protilátky. Acylovaný ADMA z předem ošetřených vzorků a navázaný ADMA na stěně mikrotitrační destičky spolu soutěží o omezený počet vazebných míst na protilátkách v přidaném antiséru. Následuje inkubace 90 minut při pokojové teplotě za stálého třepání, pro dosažení rovnováhy v reakci antigenu s protilátkou. Po ukončení inkubace se promývacím roztokem odstraní komplex antigen-protilátka, který není vázán na destičku. Po promytí se přidá enzymový konjugát obsahující sekundární anti-králičí IgG protilátku s navázaným enzymem křenová peroxidáza. Opět následuje inkubace 30 minut při pokojové teplotě za stálého třepání. Po ukončení inkubace se destičky znovu promyjí. V dalším kroku se přidá substrát tetramethylbenzidin a opět se inkubuje 25 minut při pokojové teplotě za stálého třepání. Po přidání substrátu proběhne enzymatická reakce zprostředkovaná křenovou peroxidázou, která se projeví barevnou změnou. Po ukončení inkubace se do všech jamek přidá zastavovací roztok obsahující kyselinu sírovou. Nakonec se mikrotitrační destička vloží do automatické čtečky a změří optická hustota při 450 nm. Intenzita vyvinuté barvy odpovídá množství primární protilátky navázané na jamku mikrotitrační destičky a je nepřímo úměrná množství ADMA ve vzorku. [102,103]

Výrobce uvedl, že metoda je lineární v rozmezí koncentrací 0,23–1,53  $\mu\text{mol l}^{-1}$  s limitem detekce 0,03  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Referenční rozmezí v séru či plazmě je  $0,40 \pm 0,75 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Metoda ELISA má s metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí dobrou korelaci, s korelačním koeficientem 0,983. Schulze a kolektiv uvádí také porovnání ELISA metody s plynovou chromatografií s hmotnostní detekcí, kde je také velmi dobrá korelace s korelačním koeficientem 0,991. [102,103]

Výše popsané metody HPLC s elektrochemickou detekcí od Kleparnika a kolektivu, nebo Suzukiho a kolektivu přináší rozporuplné výsledky. Zatímco Suzuki a kolektiv uvádí poměrně uspokojivou korelaci s metodou ELISA s korelačním koeficientem 0,880, Kleparnik a kolektiv vypočítali velmi slabou korelaci s metodou ELISA s korelačním

koeficientem 0,185. Výše popsaná studie Boelaerta a kolektivu, který měřil koncentrace ADMA pomocí kapalinové chromatografie ve spojení tandemovou hmotnostní spektrometrií uvádí pouze mírnou korelaci s metodou ELISA s korelačním koeficientem 0,780. [83,84,90]

## 1.8 Referenční hodnoty ADMA

Németh a kolektiv provedli v roce 2017 velké srovnání referenčních plazmatických koncentrací ADMA. S přihlédnutím k nejpoužívanějším metodám měření byly porovnávány pouze studie využívající buď kapalinovou chromatografii s fluorescenční a hmotnostní detekcí, nebo studie využívající metodu ELISA. Do srovnávací analýzy bylo zahrnuto 66 studií, 24 s použitím ELISA a 42 s použitím kapalinové chromatografie uvádějící celkový počet 5528 studovaných dospělých objektů bez diabetu, hypertenze, obezity a bez jakékoli léčby. Jednalo se o 3178 mužů a 2350 žen s průměrným věkem  $41,6 \pm 16,9$  let. Referenční rozsah ADMA měřený pomocí kapalinové chromatografie ( $n = 4093$ ) se pohyboval v rozmezí koncentrací  $0,34\text{--}1,10 \mu\text{mol l}^{-1}$  s průměrnou hodnotou  $0,71 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Referenční rozsah ADMA měřený metodou ELISA ( $n = 1435$ ) se pohyboval v rozmezí koncentrací  $0,25\text{--}0,92 \mu\text{mol l}^{-1}$  s průměrnou hodnotou  $0,57 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Autor dále uvádí, že celkové výsledky měly vysokou heterogenitu, což naznačuje i porovnání referenčních hodnot ADMA ve zmíněném výčtu metod zde v diplomové práci. [104]

## **2 CÍL PRÁCE**

Cílem diplomové práce bylo vypracovat metodu pro stanovení asymetrického dimethylargininu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí a pokusit se ji optimalizovat tak, aby byla použitelná pro stanovení tohoto parametru v lidské plazmě. Následně se měly zhodnotit získané výsledky vzhledem k výsledkům publikovaným v literatuře.



## 3 PRAKTICKÁ ČÁST

### 3.1 Chemikálie, přístroje a použitý materiál

#### 3.1.1 Chemikálie

$N^G, N^G$ -dimethyl-L-arginin dihydrochlorid (ADMA),  $\geq 98$  % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; MW: 275,18 g/mol)

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

$N^G$ -methyl-L-arginin acetát (MMA)  $\geq 98$  % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; MW: 248,28 g/mol)

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

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

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

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

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

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

boritan draselný tetrahydrát,  $\geq 99,5$  % (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; MW: 305,50 g/mol)

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

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

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

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

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

### 3.1.2 Materiál a soupravy

Chromatografická kolona Nucleosil® C18, 5,0 µm 250 mm × 4,6 mm (Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

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

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

Vakuový SPE manifold Visiprep™ (Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

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

### 3.1.3 Přístroje

Systém HPLC s elektrochemickou detekcí sestával z:

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

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

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

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

### 3.1.4 Software

Microsoft Excel (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA)

Chromatografický software Clarity (DataApex, Praha, Česká republika)

### **3.1.5 Ostatní materiál a pomůcky**

Orbitální třepačka, pipety, skleněné zkumavky, plastové mikrozukavky, odměrné válce, skleněné baňky a kádinky, předvážky, analytické váhy, injekční stříkačky, filtrační systém na filtraci roztoků pro kapalinovou chromatografii, hamiltonka, stlačený plynný dusík o čistotě 4.6, vakuová pumpa.

## **3.2 Příprava roztoků**

### **3.2.1 Roztoky standardních látek**

#### **Zásobní roztoky standardních látek**

Ze standardních látek ADMA, SDMA a vnitřního standardu monomethylargininu (MMA) byly připraveny zásobní roztoky jejich rozpuštěním v 10 mmol l<sup>-1</sup> HCl. Zásobní roztok ADMA byl připraven o koncentraci 726,80 μmol l<sup>-1</sup>. Zásobní roztok SDMA byl připraven o koncentraci 658,92 μmol l<sup>-1</sup>. Zásobní roztok vnitřního standardu MMA byl připraven o koncentraci 2013,90 μmol l<sup>-1</sup>. Takto připravené zásobní roztoky se rozpipetovaly v alikvotních podílech do mikrozukavek a byly uchovávány při teplotě -20 °C.

#### **Pracovní roztoky standardních látek**

Ze zásobních roztoků jednotlivých standardních látek se připravily roztoky pracovní o koncentraci 40 μmol l<sup>-1</sup> pro ADMA, SDMA i MMA. Pracovní roztoky ADMA a SDMA se ředily 10 mmol l<sup>-1</sup> HCl, pracovní roztok vnitřního standardu MMA se ředil pufrům PBS. Pracovní roztoky všech standardních látek se uchovávaly při teplotě 4 °C.

#### **Směsný standardní roztok**

Směsný standardní roztok ADMA a SDMA byl připraven smícháním pracovních roztoků ADMA a SDMA v poměru 1 : 1 na požadovanou koncentraci 20 μmol l<sup>-1</sup>. Směsný standardní roztok byl uchováván při teplotě 4 °C.

#### **Vnitřní standard MMA**

Vnitřní standard MMA o koncentraci 8 μmol l<sup>-1</sup> byl připraven naředěním pracovního roztoku MMA pomocí PBS pufru. Roztok vnitřního standardu byl uchováván při teplotě 4 °C.

## **Roztoky pro kalibraci**

Jednotlivé koncentrace směšného standardního roztoku ADMA a SDMA pro kalibraci byly připraveny z pracovního směšného standardního roztoku ADMA a SDMA naředěním pomocí  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  HCl individuálně na požadované koncentrace. Zvolené koncentrace pro kalibraci se pohybovaly v intervalu  $0,1\text{--}20 \text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ . Kalibrační roztoky byly uchovávány při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  až do analýzy.

### **Roztok HCl**

Roztok HCl o koncentraci  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  byl připraven naředěním  $100 \text{ mmol l}^{-1}$  roztoku HCl pomocí ultračisté vody a byl uchováván při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## **3.2.2 Roztoky pro extrakci na pevné fázi**

### **Fosfátem pufrovaný fyziologický roztok**

Fosfátem pufrovaný fyziologický roztok (PBS) o pH 8 a celkovém objemu 500 ml obsahoval fosfátový pufr o koncentraci  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  a NaCl o koncentraci  $140 \text{ mmol l}^{-1}$ . PBS pufr se připravil rozpuštěním 4,091 g NaCl v 500 ml fosfátového pufru o pH 8 a koncentraci  $10 \text{ mmol l}^{-1}$ . PBS pufr byl uchováván při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **Fosfátový pufr**

Pro přípravu fosfátového pufru o pH 8 a koncentraci  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  bylo nejprve potřeba připravit dva zásobní roztoky A a B. Zásobní roztok A obsahoval hydrogenfosforečnan sodný a zásobní roztok B obsahoval dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát. Zásobní roztok A o koncentraci  $0,2 \text{ mol l}^{-1}$  byl připraven rozpuštěním 2,839 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve 100 ml ultračisté vody. Zásobní roztok B o koncentraci  $0,2 \text{ mol l}^{-1}$  byl připraven rozpuštěním 3,120 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ve 100 ml ultračisté vody. Následně byl připraven pracovní roztok fosfátového pufru o pH 8 a koncentraci  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  tak, že se smíchalo 47,35 ml roztoku A s 2,65 ml roztoku B a smíchané roztoky se doplnily ultračistou vodou na výsledným objem 100 ml. Následně se 50 ml pracovního roztoku fosfátového pufru o pH 8 a koncentraci  $0,1 \text{ mol l}^{-1}$  smíchalo se 450 ml ultra čisté vody. Tak byl získán fosfátový pufr o pH 8 a koncentraci  $10 \text{ mmol l}^{-1}$  v celkovém objemu 500 ml, tento pufr byl uchováván při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **Eluční činidlo**

Eluční činidlo bylo připraveno v celkovém objemu 100 ml smícháním 10 ml 25 % amoniaku se 40 ml ultračisté vody s 50 ml methanolu a s 0,5 ml NaOH o koncentraci  $1 \text{ mol l}^{-1}$ . Eluční činidlo bylo uchováváno při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **Roztok NaOH**

Roztok NaOH o koncentraci  $1 \text{ mol l}^{-1}$  byl připraven rozpuštěním 5 g NaOH v 50 ml ultračisté vody a byl uchováván při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **Roztok HCl**

Roztok HCl o koncentraci  $100 \text{ mmol l}^{-1}$  byl připraven odpipetováním  $821 \text{ } \mu\text{l}$  z 37 % HCl a doplněním do 100 ml ultračistou vodou. Roztok HCl o koncentraci  $100 \text{ mmol l}^{-1}$  byl uchováván při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

## **3.2.3 Roztoky pro derivatizaci**

### **Derivatizační činidlo**

Derivatizační činidlo obsahovalo *ortho*-ftaldialdehyd o koncentraci  $18,7 \text{ mmol l}^{-1}$ , kyselinu 3-merkaptopropionovou o koncentraci  $28,7 \text{ mmol l}^{-1}$ , 5 objemových % methanolu a boritanový pufr o koncentraci  $200 \text{ mmol l}^{-1}$ . Derivatizační činidlo v celkovém objemu 4 ml bylo připraveno rozpuštěním 0,010 g *ortho*-ftaldialdehydu v  $200 \text{ } \mu\text{l}$  methanolu smíchaných s 3,8 ml boritanového pufru a  $10 \text{ } \mu\text{l}$  kyseliny 3-merkaptopropionové. Připravené derivatizační činidlo bylo následně ještě přefiltrováno pomocí polytetraflourethylenového stříkačkového filtru. Derivatizační činidlo bylo uchováváno při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **Boritanový pufr**

Boritanový pufr o koncentraci  $200 \text{ mmol l}^{-1}$  obsahoval boritan draselný tetrahydrát. Pufr byl připraven rozpuštěním 3,055 g  $\text{K}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  v 50 ml ultračisté vody. Výsledné pH pufru bylo 9,21 a nebylo dále upravováno. Boritanový pufr byl uchováván při teplotě  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### **Neutralizační činidlo**

Neutralizační činidlo obsahovalo dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát o koncentraci  $200 \text{ mmol l}^{-1}$ . Činidlo bylo připraveno v celkovém objemu 5 ml, rozpuštěním 0,157 g  $\text{H}_2\text{NaO}_4\text{P} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  v 5 ml ultračisté vody. Připravené neutralizační činidlo bylo následně

ještě přefiltrováno pomocí polytetrafluorethylenového stříkačkového filtru. Neutralizační činidlo bylo uchovááno při teplotě 4 °C.

### **3.2.4 Mobilní fáze**

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

#### **Mobilní fáze A**

Mobilní fáze A o pH 6,1 obsahovala fosforečnan draselný o koncentraci 25 mmol l<sup>-1</sup> a 9,5 objemových % acetonitrilu. Mobilní fáze o celkovém objemu 1000 ml byla připravena rozpuštěním 3,900 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O v 95 ml acetonitrilu a doplněna do celkového objemu 1000 ml ultračistou vodou. Počáteční pH mobilní fáze A bylo 4,75 a na pH 6,1 bylo upraveno s pomocí přenosného pH metru postupným přidáváním roztoku NaOH. Po přefiltrování a odvzdušnění v ultrazvukové lázni byla mobilní fáze A uchovávána při teplotě 4 °C až do analýzy.

#### **Mobilní fáze B**

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

#### **Roztok NaOH**

Roztok NaOH byl připraven rozpuštěním 15 peciček NaOH v 50 ml ultračisté vody. Pro dosažení pH 6,1 u mobilní fáze A bylo přidáno několik set mikrolitrů tohoto roztoku. Roztok NaOH byl uchováván při pokojové teplotě.

## **3.3 Biologické vzorky**

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

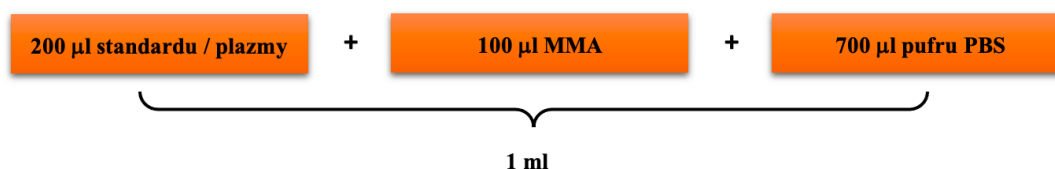
Krev od pacientů, za účelem získání plazmy, byla odebrána do sterilních zkumavek s protisrážlivým činidlem vždy před a v různých intervalech po zákroku PCI. Během transportu byly vzorky krve uchovávány u ledu. Po transportu se krev ve zkumavkách zpracovala centrifugací po dobu 10 minut při 3500 otáčkách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

### 3.4 Metodika

Asymetrický dimethylarginin byl stanovován pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí po extrakci na pevné fázi a derivatizaci *ortho*-ftaldialdehydem s 3-merkaptopropionovou kyselinou.

#### 3.4.1 Příprava standardního nebo plazmatického vzorku

Vzorky plazmy byly rozmrazeny. Následně bylo smícháno 200  $\mu$ l plazmy nebo 200  $\mu$ l standardního roztoku se 100  $\mu$ l vnitřního standardu MMA o koncentraci 8  $\mu$ mol l<sup>-1</sup> a s 700  $\mu$ l pufru PBS na výsledný objem 1 ml. Přípravu standardního nebo plazmatického vzorku přehledně znázorňuje obrázek 9.

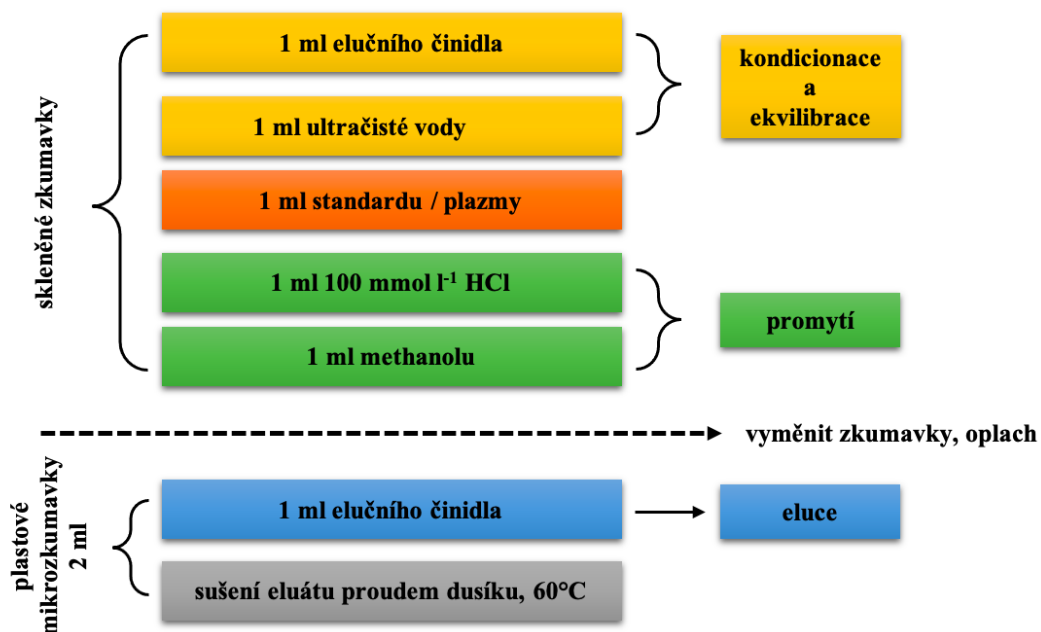


Obrázek 9 Postup přípravy standardního nebo plazmatického vzorku

#### 3.4.2 Extrakce na pevné fázi

Pro extrakci na pevné fázi byly použity SPE kolonky Strata<sup>TM</sup>-X-C od firmy Phenomenex s kapacitou 30 mg. Tyto kolonky byly umístěny na vakuový SPE manifold Visiprep<sup>TM</sup> od firmy Supelco, ke kterému byla napojena vakuová pumpa. Kolonky byly nejprve kondicionovány 1 ml elučního činidla a následně ekvilibrovány 1 ml redestilované vody. Poté byl na kolonky nanesen 1 ml předpřipraveného standardního, nebo plazmatického vzorku. ADMA a další methylargininy obsažené ve vzorku se na pevné fázi kolonky zachytily. Následovaly kroky eliminující převážnou část matrice ze vzorku. Nejprve promytí 1 ml 100 mmol l<sup>-1</sup> HCl, poté promytí 1 ml methanolu. Po promývacích krocích se vyměnily skleněné zkumavky, které doposud sloužily

na jímání složek matrice za plastové mikrozkušavky a hadičky, přivádějící extrahovanou směs do zkumavek se řádně opláchly ultračistou vodou. Poté byl na kolonky nanesen 1 ml elučního činidla. Bazické methylargininy se tak uvolnily z pevné fáze obsažené v kolonkách. Získaný eluát v plastových mikrozkušavkách byl následně vysušen pod proudem dusíku o čistotě 4.6 při teplotě 60 °C. Vysušení eluátu trvalo asi 75 minut. Postup pro extrakci na pevné fázi přehledně shrnuje obrázek 10.



Obrázek 10 Postup pro extrakci na pevné fázi

### 3.4.3 Derivatizace

Pro derivatizaci bylo použito derivatizační činidlo obsahující OPA a 3-merkaptopropionovou kyselinu. Vysušený eluát byl resuspendován ve 100  $\mu$ l derivatizačního činidla a následně se vzorek nechal se inkubovat 10 minut při pokojové teplotě. Po inkubaci se derivatizovaný vzorek zneutralizoval 100  $\mu$ l neutralizačního činidla obsahujícího dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát. Takto připravený vzorek byl ihned dávkován pomocí hamiltonky do manuálního dávkovacího ventilu na kolonu a byla spuštěna analýza.

### 3.4.4 Chromatografická separace s elektrochemickou detekcí

Chromatografická separace v systému HPLC byla provedena na chromatografické koloně ARION® Polar C18. Tato kolona měla délku 150 mm, průměr 4,6 mm a velikost částic 3,0  $\mu$ m.



Nástřik derivatizovaného a následně zneutralizovaného vzorku byl 10  $\mu\text{l}$ . Chromatografická separace probíhala za izokratických podmínek s použitím mobilní fáze A o pH 6,1, která obsahovala fosforečnan draselný o koncentraci 25  $\text{mmol l}^{-1}$  a 9,5 objemových % acetonitrilu. Průtok byl 1 ml/min. Termostat pro separační kolonu udržoval konstantní teplotu kolony 30  $^{\circ}\text{C}$ . Po eluci posledního analytu byla analýza ukončena a kolona promyta mobilní fází B, která obsahovala 70 objemových % acetonitrilu v ultračisté vodě. Po promytí následovala ekvilibrace kolony na výchozí podmínky. Jedna analýza trvala 38 minut.

Elektrochemická detekce proběhla na detektoru Coulochem® III. Pro detekci byla zvolena citlivější coulometrická detekce. Na elektrochemickou celu detektoru bylo aplikováno napětí +320 mV. Zvolená citlivost detekce byla 500 nA.

#### **3.4.5 Vyhodnocení a výpočty**

Kvantifikace vycházela z vyhodnocení chromatogramů vytvořených chromatografickým softwarem Clarity. Chromatogramy znázorňovaly závislost proudové odezvy detektoru na čase a u získaných píků pro stanovované analyty byla určena jejich plocha pod křivkou (AUC). Kvantifikace byla následně provedena metodou jednoho standardu, pro výpočet byla použita plocha pod křivkou analytu, která byla vztažena k ploše pod křivkou vnitřního standardu. Výpočty byly provedeny v programu MS Excel.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSE

Základ pro experimentální část diplomové práce zaměřené na stanovení ADMA v lidské plazmě pomocí HPLC s elektrochemickou detekcí nám poskytla vědecká publikace Kleparnika a kolektivu z roku 2013. Tato publikace jednak vyhovovala možnostem naší laboratoře pro vytvoření sestavy HPLC s elektrochemickým detektorem a byla jednou z mála a zároveň nejnovější, která stanovení ADMA pomocí elektrochemické detekce diskutovala. Metodu jsme následně částečně modifikovali a přizpůsobili našim možnostem. [83]

Elektrochemickou detekci jsme si vybrali, ačkoliv se pro stanovení ADMA, v porovnání s fluorescenční či hmotnostní detekcí, příliš nevyužívá. Rozhodující pro nás však byla vysoká citlivost elektrochemického detektoru, která je pro stanovení ADMA velmi žádoucí, jelikož se v plazmě vyskytuje pouze v submikromolárním rozmezí u zdravých jedinců a nanejvýš v několika jednotkách mikromol u nemocných. Většinou jsou však rozdíly v koncentracích ADMA mezi zdravými a nemocnými pouze malé a stejně tak jsou většinou i malé rozdíly u jednotlivých stádií onemocnění. I přesto, že jsou tyto rozdíly malé, jsou však signifikantní, pokud jsou měřeny u většího počtu pacientů.

Například Németh a kolektiv vypočítali průměrnou referenční hodnotu cirkulujícího ADMA stanovenou ELISA metodou na  $0,57 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Ve studii Huang a kolektivu byla také měřena hladina cirkulujícího ADMA pomocí metody ELISA u pacientů s restenózou ve stentu. U pacientů, u kterých byla restenóza ve stentu klasifikována jako homogenní neointima byla průměrná plazmatická koncentrace ADMA  $0,83 \pm 0,08 \mu\text{mol l}^{-1}$  a u restenózy ve stentu klasifikované jako neoateroskleróza  $1,12 \pm 0,21 \mu\text{mol l}^{-1}$ . [42,104]

Náš konkrétní model elektrochemického detektoru, Coulochem® III od firmy ESA, umožňuje jak amperometrickou, tak coulochemickou detekci. Při amperometrické detekci eluované látky unášené mobilní fází proudí podél povrchu elektrody. V tomto provedení dochází k tomu, že je pouze určitá frakce eluovaných elektroaktivních látek, řádově 5–15 %, oxidována či redukována a zbytek s povrchem elektrody nereaguje. Naproti tomu při coulochemické detekci proudí eluované elektroaktivní látky přímo skrz porézní grafitovou elektrodu, což extrémně zvětšuje reakční plochu elektrody. V tomto provedení jsou prakticky všechny elektroaktivní látky protékající elektrodou oxidovány

či redukovány, čímž se snižuje poměr signálu k šumu a dosahuje se daleko vyšší citlivosti. Z tohoto důvodu jsme také coulometrickou detekci zvolili. Produkovaný proud následně přímo souvisel s koncentrací sledovaného analytu. [105]

Do budoucna je také cílem porovnat naši metodu s metodou, která pro stanovení ADMA využívá HPLC ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Na této metodě se v současnosti na katedře ve skupině klinické biochemie pracuje.

#### **4.1 Zavedení metody na koloně Nucleosil® C18**

Protože se ve většině metod pro separaci aduktů vzniklých po reakci s OPA využívá chromatografická kolona C18, první pokusy jsme provedli na konvenční chromatografické koloně Nucleosil® C18 od firmy Supelco, která byla v naší laboratoři dostupná. Tato kolona měla délku 250 mm, průměr 4,6 mm, velikost částic 5,0  $\mu\text{m}$  a stacionární fáze byla tvořena oktadecylsilikagelem se zbytkovými silanolovými skupinami. Zároveň jsme také věděli, že nebude možné použít gradientovou eluci, protože elektrochemický detektor je obecně velmi citlivý na změnu chemického složení mobilní fáze, dokonce i na změnu její viskozity. [83]

Stejně tak i Kleparnik a kolektiv ve své metodě použili izokratickou eluci, avšak jejich zvolená chromatografická kolona byla jiná, konkrétně SynergiHydro RP od firmy Phenomenex s délkou 150 mm, průměrem 4,6 mm a velikostí částic 4  $\mu\text{m}$ . Tato kolona se od té naší lišila délkou a velikostí částic, ale především vyšší polaritou. [83]

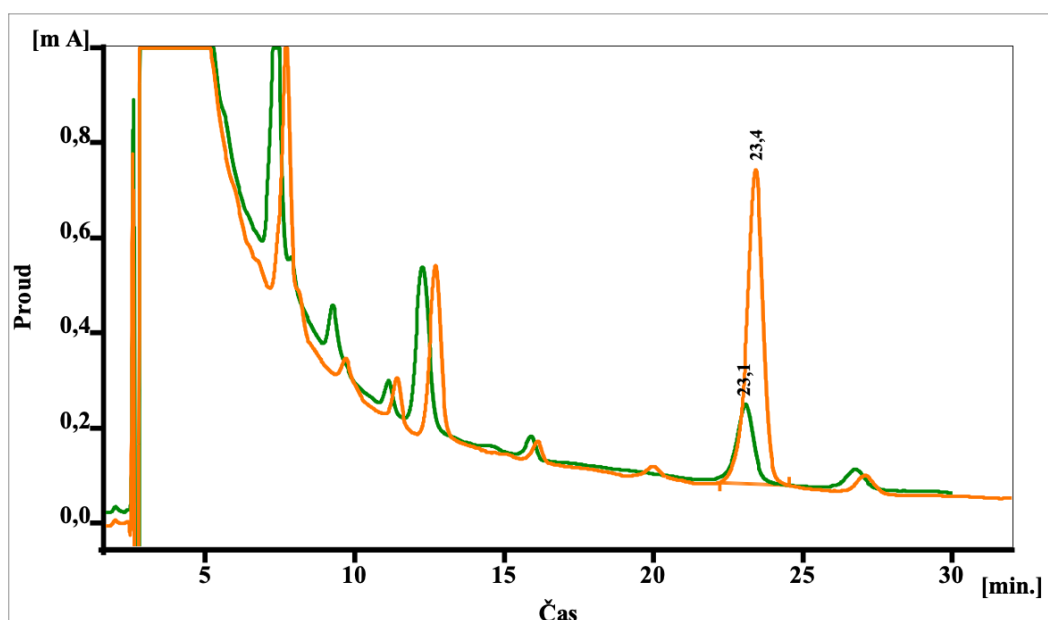
Bylo proto třeba vyzkoušet, jaké možné separace jsme na koloně Nucleosil® C18 schopni dosáhnout i přes to, že jsme věděli, že separace enantiomerů ADMA a SDMA bude na naší koloně obtížná.

V první fázi nás zajímalo, jak se za podobných podmínek jako v práci Kleparnika a kolektivu budou na naší koloně chovat standardní roztoky ADMA a SDMA jednotlivě. Použili jsme standardní roztoky ADMA a SDMA bez extrakce na pevné fázi, které byly derivatizovány při pokojové teplotě, nechaly se inkubovat 10 minut a hned po neutralizaci byly dávkovány na chromatografickou kolonu. Objem nástřiku standardního roztoku byl 10  $\mu\text{l}$ . Separace byla provedena při 37 °C, průtoku 1 ml/min s mobilní fází obsahující 10 objemových % acetonitrilu. Koncentrace standardních roztoků ADMA a SDMA se pohybovaly v rozmezí 0,1 - 20  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Zkoušeli jsme dávkovat různé koncentrace, abychom mohli posoudit, jak jsou dimethylargininy po derivatizaci pro detektor

rozpoznatelné a mohli jsme tak nastavit jeho optimální citlivost. Jako nejlepší jsme vyhodnotili citlivost 500 nA při napětí +320 mV vloženém na analytickou buňku detektoru. Píky ADMA i SDMA byly dobře viditelné a získaly jsme zároveň elementární přehled o retenčních časech ( $t_R$ ) těchto látek, a to přibližně  $t_R = 23$  minut pro ADMA a  $t_R = 25$  minut pro SDMA.

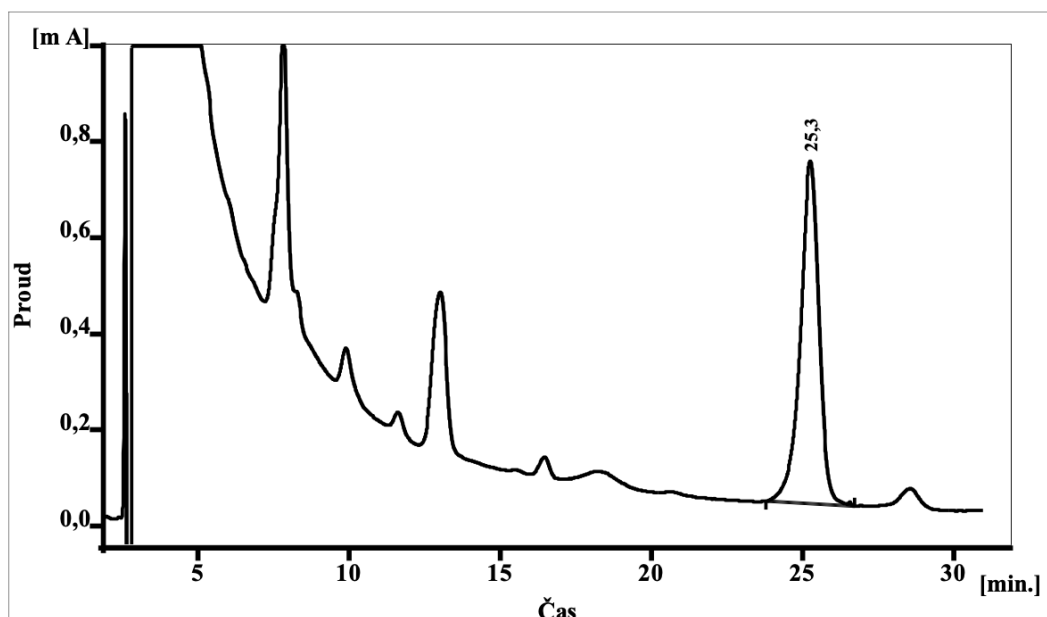
Zároveň jsme potřebovali ověřit čistotu standardních látek, kterou výrobce deklaroval pro ADMA  $\geq 98$  % a pro SDMA  $\geq 99$  % stanovenou tenkovrstvou kapalinovou chromatografií. Určitou obavu jsme měli z toho, že je SDMA v požadované čistotě dodáván ve formě sulfonátu, který je zbarven do žluta. Nebylo proto jasné, jestli toto nebude mít nějaký rušivý vliv při stanovení. Obavy se však nepotvrdily, chromatografický záznam byl relativně čistý a nezaznamenali jsme žádné větší rušivé píky, které by naznačovali nějaké znečištění.

Obrázek 11 znázorňuje chromatogram, kde je ADMA v koncentraci 5 a 20  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , s píky v  $t_R = 23,1$  a 23,4 minut. Plocha píku při koncentraci 20  $\mu\text{mol l}^{-1}$  je zhruba čtyřnásobkem plochy píku při koncentraci 5  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , což byl bez použití vnitřního standardu povzbudivý výsledek. Obrázek 12 znázorňuje chromatogram, kde je SDMA v koncentraci 20  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , s píkem v  $t_R = 25,3$  minut.



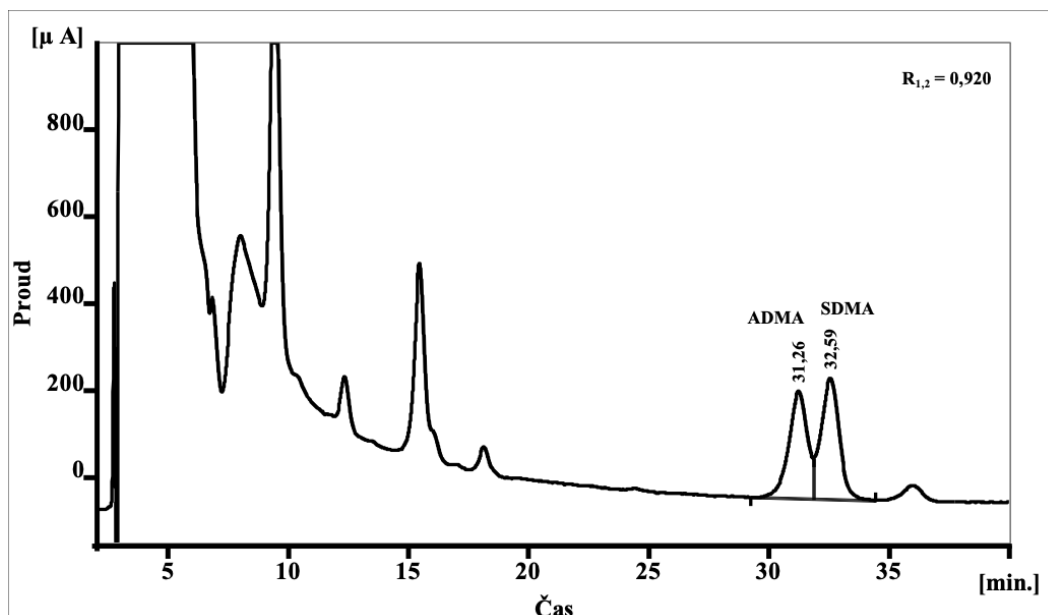
**Obrázek 11** Standardní roztok ADMA o koncentraci 5 a 20  $\mu\text{mol l}^{-1}$

zelená barva - ADMA o koncentraci 5  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ; oranžová barva - ADMA o koncentraci 20  $\mu\text{mol l}^{-1}$



*Obrázek 12 Standardní roztok SDMA o koncentraci 20  $\mu\text{mol l}^{-1}$*

ADMA a SDMA jakožto enantiomery jsou si velmi podobné, proto je jejich vzájemná separace obtížná, což naznačují i zmíněné podobné retenční časy těchto sloučenin. Prvotní analýza směšného standardu ADMA a SDMA byla provedena opět při teplotě 37 °C a průtoku 1 ml/min s mobilní fází obsahující 10 objemových % acetonitrilu, rozdělení píků však bylo nedokonalé s rozlišením ( $R_{1,2}$ ) = 0,654. Celková analýza trvala 27 minut. Následovala tedy série pokusů, kdy jsme se snažili měnit různé podmínky analýzy, abychom rozlišení vylepšili. Ukázalo se, že průtok ani změna teploty rozlišení příliš neovlivní, tyto parametry hrají roli především v délce analýzy. Co však mělo velký vliv na rozlišení byla změna procentuálního zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi. Například při teplotě 25 °C, průtoku 1 ml/min a 7 objemových % acetonitrilu v mobilní fázi se rozlišení výrazně zlepšilo na hodnotu  $R_{1,2}$  = 1,359. I tak však nedošlo k dokonalému rozdělení píků, za které jsme považovali hodnotu  $R_{1,2}$  > 1,500. Celkový čas analýzy navíc přesáhl 60 minut. Toto rozlišení bylo také patrně umožněno délkou kolony, na kratší koloně by k separaci ADMA a SDMA možná vůbec nedošlo. Zároveň doba analýzy přesahující 60 minut není výhodná pro stanovení většího množství vzorků a co víc, s prodlužující analýzou se snižovala i její citlivost. Jako nejlepší kompromis mezi délkou analýzy a rozlišením jsme proto vyhodnotili analýzu při teplotě 37 °C, průtoku 1 ml/min a s 9 objemovými % acetonitrilu v mobilní fázi. Píky ADMA a SDMA byly rozděleny s rozlišením  $R_{1,2}$  = 0,920 a celkový čas analýzy byl 35 minut. Tuto analýzu shrnuje chromatogram na obrázku 13.



*Obrázek 13 Směsný standardní roztok ADMA a SDMA o koncentraci 10  $\mu\text{mol l}^{-1}$*

Jak je však patrné, rozlišení v tomto kompromisu bylo stále neuspokojivé, a tak jsme dospěli k závěru, že na konvenční koloně Nucleosil® C18 není možné v rozumném čase enantiomery ADMA a SDMA dostatečně odseparovat. Proto jsme hledali jinou možnost a naskytla se nám příležitost vyzkoušet novou polárnější chromatografickou kolonu ARION® Polar C18 od českého výrobce Chromservis.

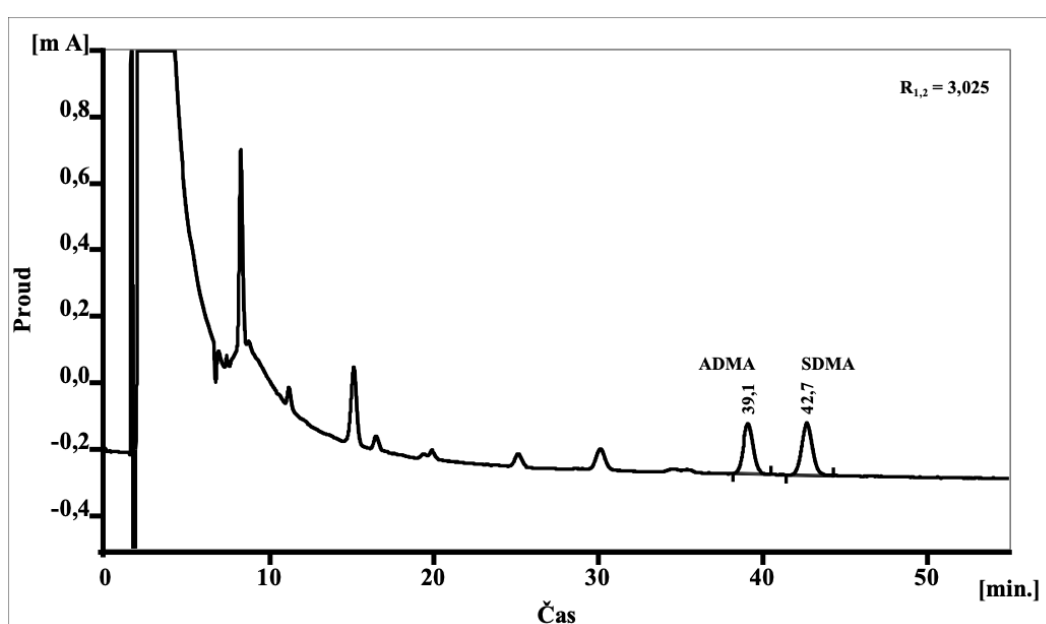
## 4.2 Zavedení metody na koloně ARION® Polar C18

Chromatografická kolona ARION® Polar C18 od firmy Chromservis nám byla nejprve zapůjčena na zkoušku a po slibných měřeních jsme se rozhodli ji zakoupit. Tato kolona měla délku 150 mm, průměr 4,6 mm a velikost částic 3,0  $\mu\text{m}$ . Výhodné bylo, že s chromatografickou kolonou SynergiHydro RP z článku Kleparníka a kolektivu měla mnohé společné. Obě kolony měly stejnou délku i průměr, ale především byla podobná jejich polarita. Jak SynergiHydro RP, tak ARION® Polar C18 měli totiž stacionární fázi tvořenou oktadecylsilikagelem s vodným endcappingem. Kolona ARION® Polar C18 byla také v porovnání s kolonou SynergiHydro RP cenově dostupnější.

Firma Chromservis uvedla chromatografickou kolonu ARION® Polar C18 na trh v roce 2020, jedná se tedy o relativní novinku. Výrobce zároveň poukazuje na vysokou kvalitu silikagelových částic, tvořících výplň chromatografické kolony, nazvaných ARION®. Tyto částice se co nejvíce blíží sférickému tvaru a mají unikátně hladký povrch. Tyto vlastnosti částic následně umožňují jejich lepší plnění do HPLC kolon

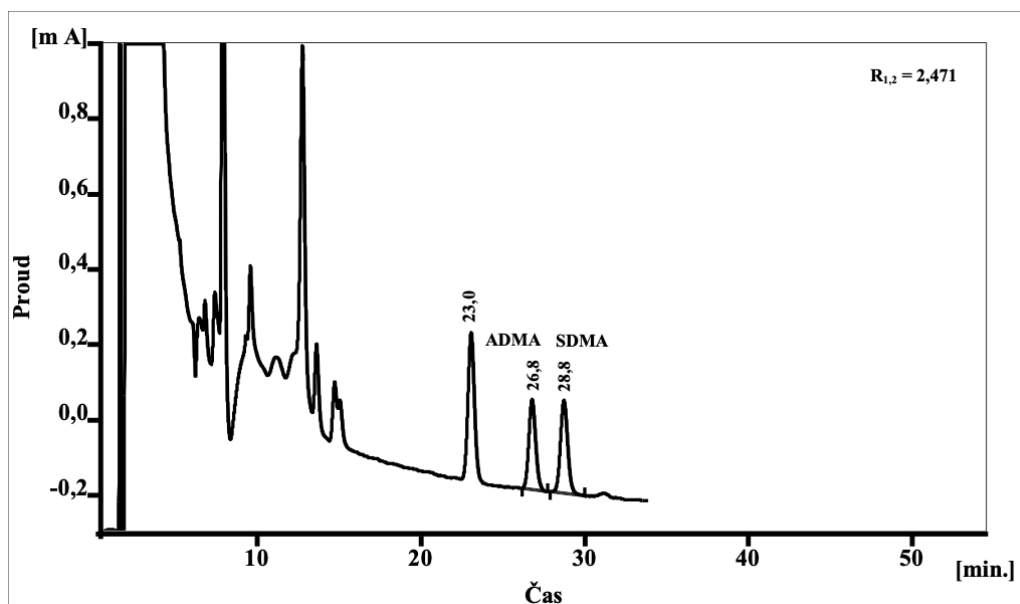
a těsnou distribuci, čímž je zajištěna vysoká separační síla a dobrá reprodukovatelnost seprace. [106]

První pokusy na koloně ARION® Polar C18 proběhly s použitím směšného standardního roztoku ADMA a SDMA za podmínek, u kterých jsme skončili na koloně Nucleosil® C18, tj. při teplotě 37 °C, průtoku 1 ml/ min a s 9 objemovými % acetonitrilu v mobilní fázi. Tuto analýzu znázorňuje obrázek 14. Analýza trvala 45 minut a píky ADMA a SDMA byly k naší velké radosti dokonale oddělené s rozlišením  $R_{1,2} = 3,025$ . Zdá se tedy, že vyšší polarita nové kolony hraje klíčovou roli pro separaci enantiomerů ADMA a SDMA.



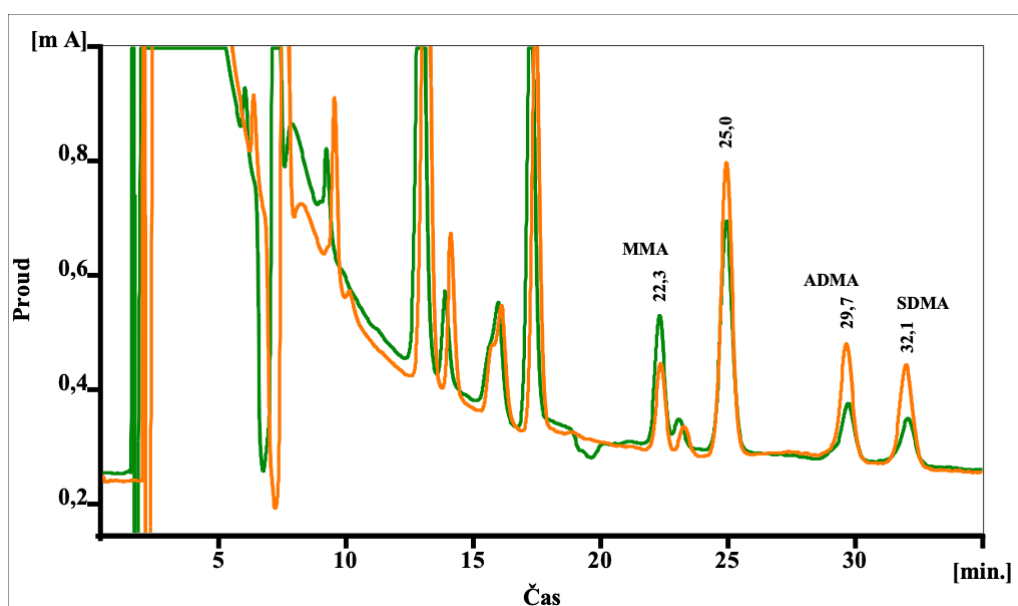
**Obrázek 14** Směsný standardní roztok ADMA a SDMA o koncentraci 5  $\mu\text{mol l}^{-1}$

Protože se však tato analýza, v porovnání s poslední analýzou na koloně Nucleosil® C18, prodloužila o 10 minut (z 35 minut na 45 minut), snažili jsme se změnit podmínky tak, aby se čas analýzy opět zkrátil. Pokus se směsným standardním roztokem ADMA a SDMA při teplotě 37 °C, průtoku 1 ml/ min a s 10 objemovými % acetonitrilu v mobilní fázi znázorňuje obrázek 15. Analýza trvala 30 minut a píky ADMA a SDMA byly stále dobře rozděleny s rozlišením  $R_{1,2} = 2,471$ . Objevil se zde však neidentifikovaný pík v  $t_R = 23$  minut, u kterého jsme měli obavu, že tato látka eluuje v podobném čase jako byl náš odhadovaný retenční čas pro vnitřní standard MMA, který jsme následně pro další analýzy chtěli použít.



**Obrázek 15** Směsný standardní roztok ADMA a SDMA o koncentraci  $5 \mu\text{mol l}^{-1}$

Dvě analýzy směsného standardního roztoku ADMA a SDMA s přidáním vnitřním standardem MMA znázorňuje obrázek 16. Obě analýzy proběhly za stejných podmínek při teplotě  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , průtoku  $1 \text{ ml/ min}$  a s 10 objemovými % acetonitrilu v mobilní fázi. Oranžová barva znázorňuje analýzu směsného standardního roztoku ADMA a SDMA o koncentraci  $10 \mu\text{mol l}^{-1}$  s přidáním vnitřním standardem MMA o koncentraci  $5 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Zelená barva znázorňuje analýzu směsného standardního roztoku ADMA a SDMA o koncentraci  $5 \mu\text{mol l}^{-1}$  s přidáním vnitřním standardem MMA o koncentraci  $8 \mu\text{mol l}^{-1}$ .



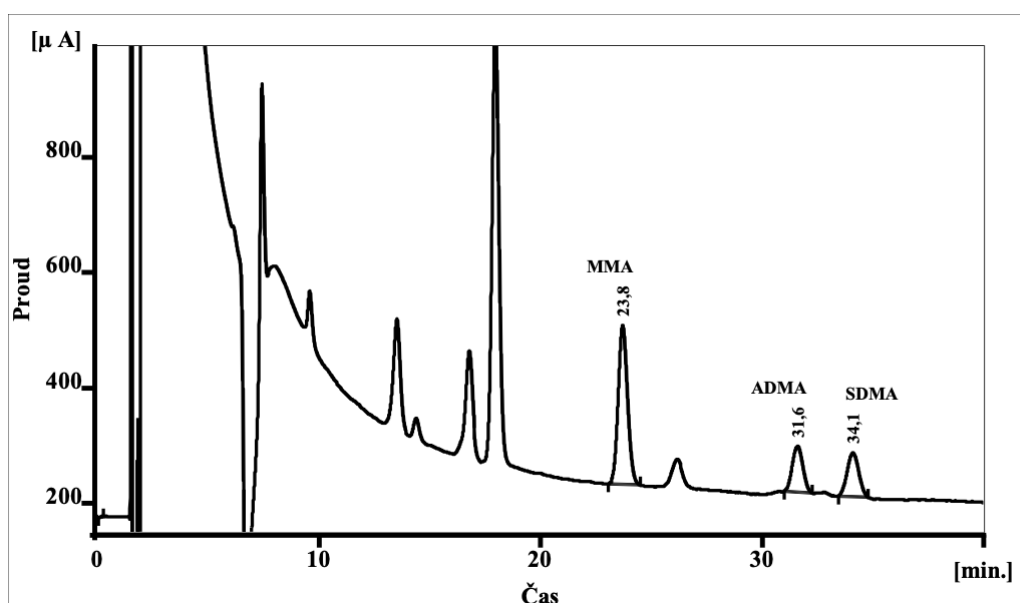
**Obrázek 16** Porovnání záznamů s použitím MMA o koncentraci  $5$  a  $8 \mu\text{mol l}^{-1}$

oranžová barva - analýza s MMA o koncentraci  $5 \mu\text{mol l}^{-1}$ ; zelená barva - analýza s MMA o koncentraci  $8 \mu\text{mol l}^{-1}$



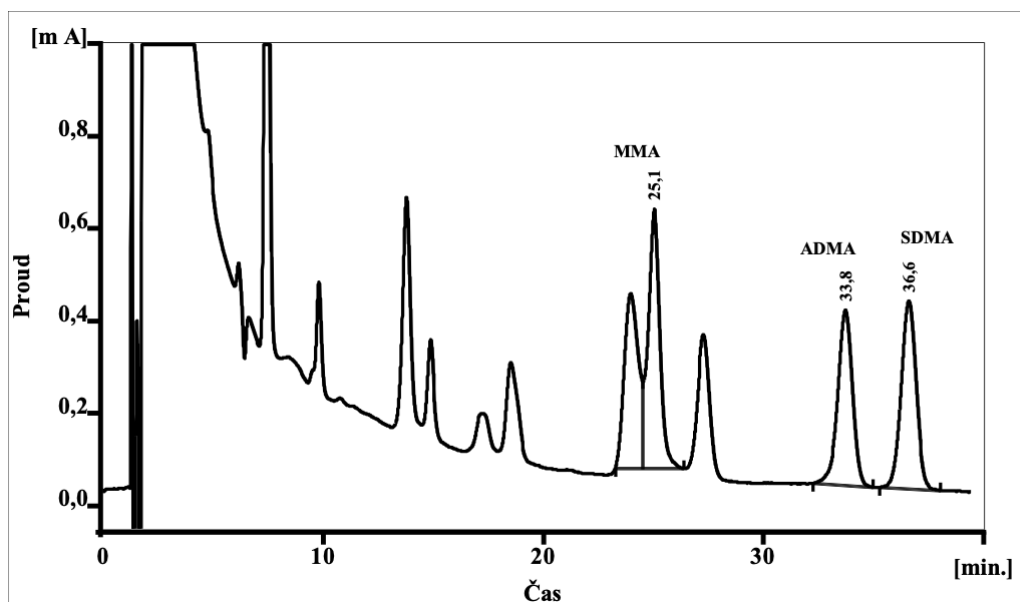
Změnami koncentrací jsme si ověřili, že se vnitřní standard MMA nachází v  $t_R = 22,3$  minut. Vnitřní standard však měl ve své blízkosti pík neznámého původu a dříve zmíněný neidentifikovaný pík byl také stále přítomen v  $t_R = 25$  minut.

Při analýze směsného standardního roztoku ADMA a SDMA o koncentraci  $5 \mu\text{mol l}^{-1}$  s přidaným vnitřním standardem MMA o koncentraci  $8 \mu\text{mol l}^{-1}$ , kdy jsme teplotu snížili na  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  a průtok ponechali na  $1 \text{ ml/min}$  i mobilní fázi obsahující  $10$  objemových % acetonitrilu, už byl chromatografický záznam daleko čistší a všechny píky, které nás zajímali, byly dobře odděleny. Znázorňuje jej obrázek 17.



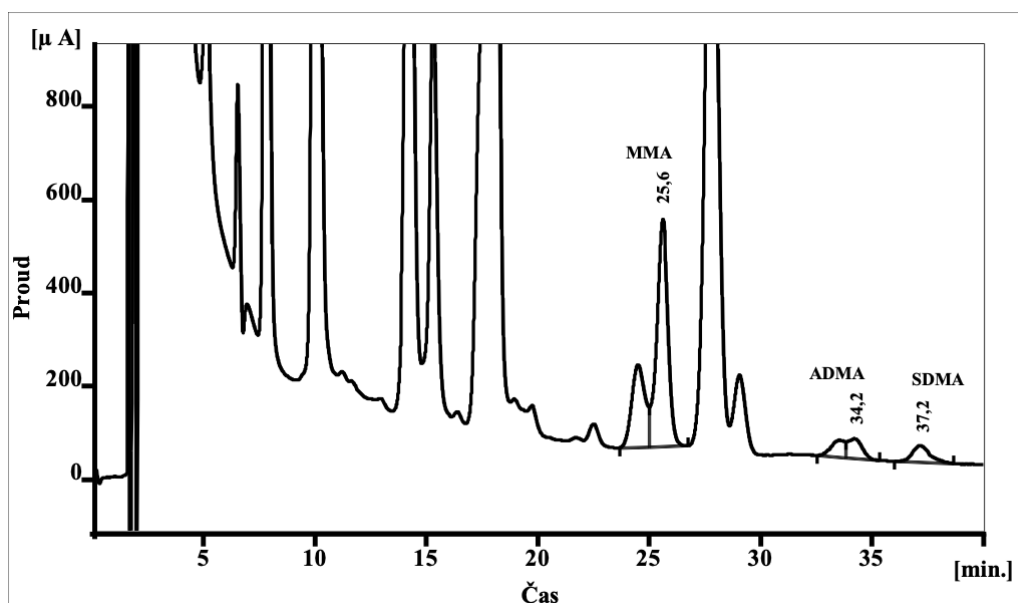
*Obrázek 17 Směsný standardní roztok ADMA a SDMA o koncentraci  $5 \mu\text{mol l}^{-1}$  s MMA*

Záznam standardního vzorku po extrakci na pevné fázi znázorňuje obrázek 18. Standardní vzorek byl vytvořen smícháním  $200 \mu\text{l}$  směsného standardního roztoku ADMA a SDMA o koncentraci  $5 \mu\text{mol l}^{-1}$  se  $100 \mu\text{l}$  vnitřního standardu MMA o koncentraci  $8 \mu\text{mol l}^{-1}$  a se  $700 \mu\text{l}$  pufru PBS. Poté byla provedena SPE. Nejlepší záznam jsme získali při teplotě  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , průtoku  $1 \text{ ml/min}$  a s  $9,5$  objemovými % acetonitrilu v mobilní fázi. Jak je patrné, pík vnitřního standardu MMA není úplně odseparován od předchozího píku.



*Obrázek 18 Záznam standardního vzorku po extrakci na pevné fázi*

Záznam plazmatického vzorku po extrakci na pevné fázi znázorňuje obrázek 19. Plazmatický vzorek byl vytvořen jako tzv. poolová plazma, která vznikla smícháním 15-ti alikvotů plazmy, získaných od kardiologických pacientů, kteří podstoupili zákrok PCI. Následně se 200  $\mu\text{l}$  poolové plazmy smíchalo se 100  $\mu\text{l}$  vnitřního standardu MMA o koncentraci  $8 \mu\text{mol l}^{-1}$  a se 700  $\mu\text{l}$  pufru PBS. Poté byla provedena SPE. Analýza byla opět provedena při teplotě  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , průtoku  $1 \text{ ml/min}$  a s 9,5 objemovými % acetonitrilu v mobilní fázi. V záznamu nově s píkem ADMA koeluoval neznámý analyt.

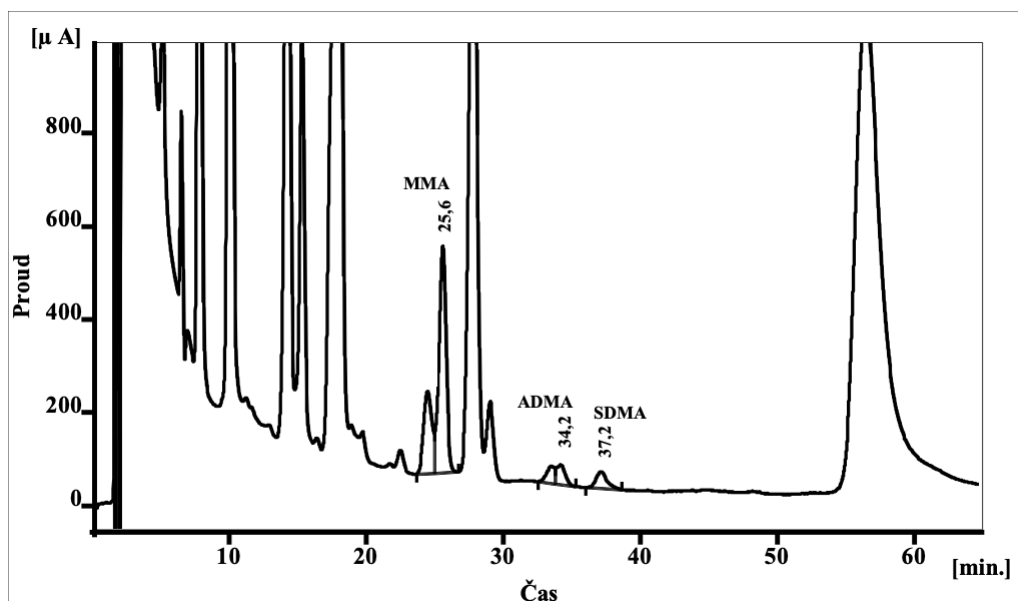


*Obrázek 19 Záznam plazmatického vzorku po extrakci na pevné fázi*

Jak je patrné, na chromatografické koloně ARION® Polar C18 nebyl problém v rozumném čase enantiomery ADMA a SDMA úplně rozdělit, zmíněná vyšší polarita této kolony, zdá se, hraje klíčovou roli pro separaci. U vzorků po extrakci na pevné fázi je však do budoucna potřeba se zbavit koelujícího píku v čase ADMA. Analyt koelující s ADMA nemusí být přítomen v každém vzorku a může být důsledkem použití poolové plazmy. Tato domněnka se však musí potvrdit, nebo vyvrátit řadou dalších měření.

Nevýhodou kolony ARION® Polar C18 byla její daleko větší citlivost v porovnání s chromatografickou kolonou Nucleosil® C18. Proto jsme museli dbát na velmi precizní odvodušnění mobilních fází.

Značná prodleva mezi jednotlivými analýzami plazmatického vzorku vznikla proto, že se kolona vždy po eluci posledního analytu, tedy SDMA, musela promývat. Obrázek 20 znázorňuje velký pík v  $t_R = 56$  minut, kvůli kterému musel být promývací krok zařazen.

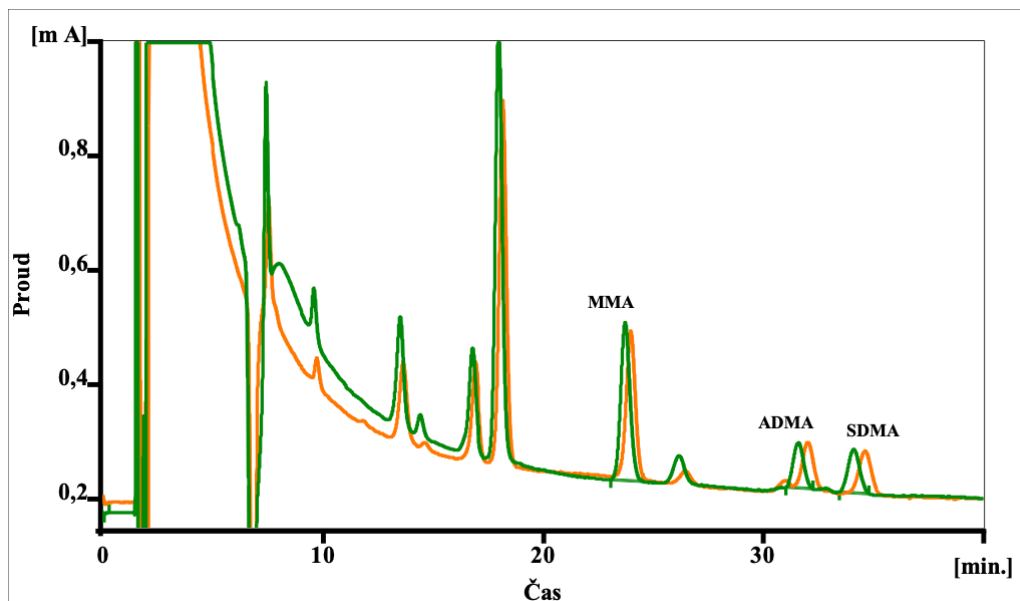


Obrázek 20 Záznam znázorňující nutnost promývání po každé analýze plazmatického vzorku

### 4.3 Stabilita použitých činidel a roztoků

Vedle separace ADMA a SDMA jsme pozorovali stabilitu derivatizačního činidla a zjistili jsme, že úplně čerstvé činidlo poskytuje nejlepší signál. Po dobu alespoň 6 dnů poskytuje uspokojivý signál a při stáří 21 dní a více už žádný signál neposkytne. Obrázek 21 ukazuje dvě analýzy směsného standardního roztoku ADMA a SDMA s přidaným vnitřním standardem MMA, které proběhly za stejných podmínek pouze s rozdílem ve stáří derivatizačního činidla. Zelená barva v chromatogramu znázorňuje

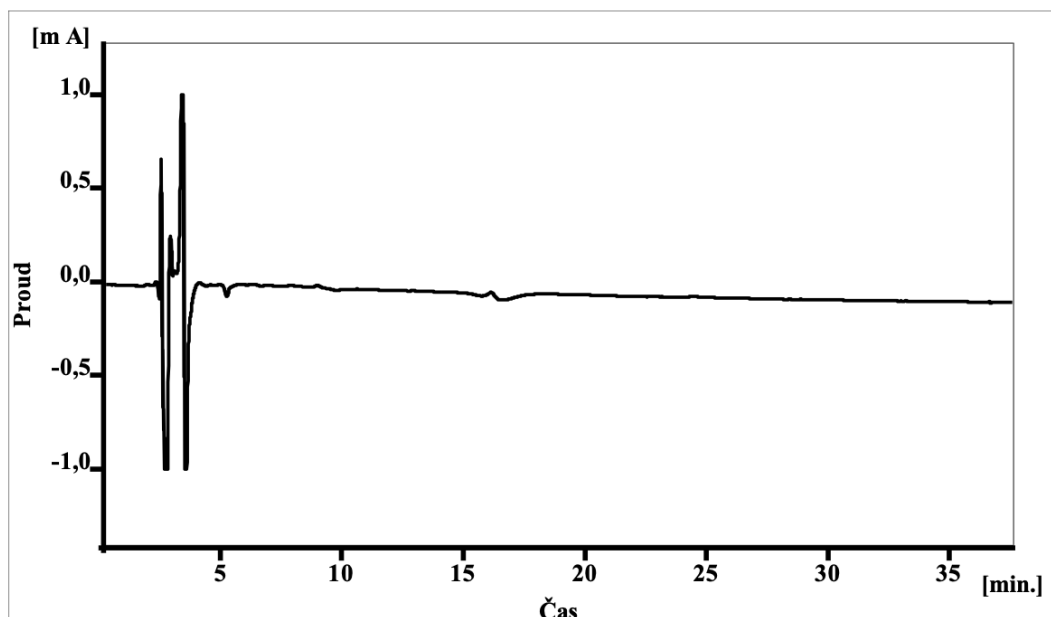
analýzu s derivatizačním činidlem starým 1 den a oranžová barva analýzu s derivatizačním činidlem starým 6 dní. Na tomto záznamu je patrné, že plochy píků po použití derivatizačního činidla starého 6 dní jsou o trochu menší. Takto staré derivatizační činidlo však stále poskytuje dobrý signál a malé rozdíly v plochách píků způsobené stářím derivatizačního činidla by měly být vykompenzovány použitím vnitřního standardu. Na základě tohoto zjištění není proto dle našeho názoru nutné míchat každý den derivatizační činidlo nové.



*Obrázek 21 Porovnání záznamů s použitím derivatizačního činidla starého 1 a 6 dní*

zelená barva - analýza s derivatizačním činidlem starým 1 den; oranžová barva - analýza s derivatizačním činidlem starým 6 dní

Obrázek 22 ukazuje, že ADMA o koncentraci  $20 \mu\text{mol l}^{-1}$  derivatizovaný činidlem starým 21 dní neposkytuje už žádný signál. Tímto jsme si zároveň ověřili, že detekce ADMA a dalších methylargininů bez použití derivatizačního činidla není možná.



*Obrázek 22 Záznam s použitím derivatizačního činidla starého 21 dní*

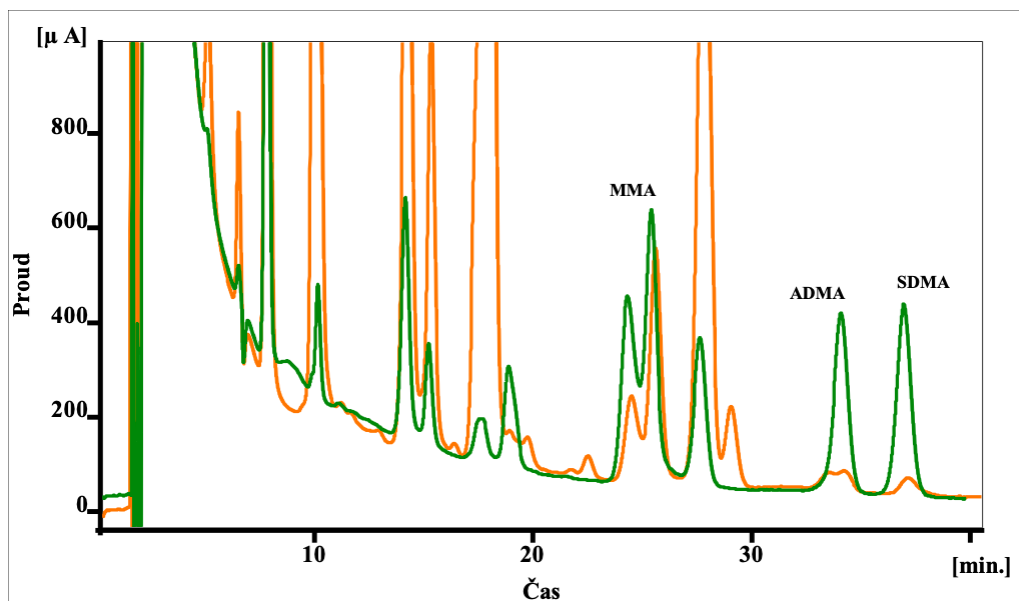
Dále jsme pozorovali, že alikvoty standardních látek zamražené při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  byly v průběhu roku stabilní. Pokud jsme je následně rozmrazili a skladovali v lednici při teplotě  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , jejich stabilita se v průběhu jednoho měsíce nezměnila.

Stejně tak jsme pozorovali, že činidla obsahující pufr, jako neutralizační činidlo, boritanový pufr, nebo PBS pufr byly stabilní v řádu jednoho měsíce, poté jsme vždy míchali činidla nová.

Odpařené eluáty po extrakci na pevné fázi, které byly následně zamraženy na  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  zůstaly stabilní po dobu minimálně jednoho týdne.

#### **4.4 Zhodnocení metody**

Pro předběžné stanovení koncentrace ADMA a SDMA v plazmatickém vzorku jsme použili metodu jednoho standardu. Pro lepší názornost slouží obrázek 23. Zelená barva znázorňuje analýzu standardního vzorku po SPE o koncentraci ADMA a SDMA  $5\text{ }\mu\text{mol l}^{-1}$ . Oranžová barva znázorňuje analýzu plazmatického vzorku po SPE vytvořeného z poolové plazmy pacientů, kteří podstoupili zákrok PCI.



**Obrázek 23** Záznamy sloužící pro předběžný odhad koncentrace ADMA a SDMA ve vzorku

zelená barva - záznam standardního vzorku o koncentraci ADMA a SDMA  $5 \mu\text{mol l}^{-1}$ ;  
oranžová barva - záznam plazmatického vzorku vytvořeného z poolové plazmy

Na základě metody jednoho standardu, kdy jsme AUC analytu vztáhly k AUC vnitřního standardu MMA, jsme vypočítali předběžné orientační koncentrace ADMA a SDMA v plazmatickém vzorku. Pro ADMA je to hodnota  $0,783 \mu\text{mol l}^{-1}$  a pro SDMA  $0,662 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Tyto hodnoty přitom nejsou v rozporu s hodnotami publikovanými v literatuře.

Například Schnabel a kolektiv uvádí průměrnou hodnotu cirkulujícího ADMA u pacientů s ischemickou chorobou srdeční  $0,68 \mu\text{mol l}^{-1}$ . [35]

Studie Zeller a kolektivu uvádí průměrnou hodnotu cirkulujícího ADMA u pacientů, kteří byli naživu po jednom roce od prodělaného akutního infarktu myokardu  $0,95 \mu\text{mol l}^{-1}$  a u těch, co do jednoho roku zemřeli  $1,23 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Analogicky byly naměřené hodnoty pro SDMA  $0,46$  a  $0,76 \mu\text{mol l}^{-1}$ . [36]

Referenční hodnota cirkulujícího SDMA zde nebyla diskutována, proto ji pro názornost uvádíme. Atzler a kolektiv stanovili střední hodnotu cirkulujícího SDMA na  $0,43 \mu\text{mol l}^{-1}$ , vypočítanou ve skupině 1359 zdravých dobrovolníků. [107]

Protože plazmatické vzorky byly od pacientů odebírány i v delším intervalu po zákroku PCI, uvádíme zde i hodnoty ze studie Huang a kolektiv, která stanovovala hladiny cirkulujícího ADMA u pacientů s restenózou ve stentu. Průměrná plazmatická

koncentrace ADMA u pacientů s restenózou ve stentu klasifikovanou jako homogenní neointima byla  $0,83 \pm 0,08 \mu\text{mol l}^{-1}$ , jako neoateroskleróza  $1,12 \pm 0,21 \mu\text{mol l}^{-1}$  a jako kalcifikace ve stentu  $1,19 \pm 0,19 \mu\text{mol l}^{-1}$ . [42]

Výhodou naší metody a obecně HPLC metod je možnost simultánní analýzy, kdy je možné vedle ADMA stanovit i koncentrace dalších cirkulujících methylargininů, jako je SDMA, L-arginin a další. Stejně tomu tak je i u kapilární elektroforézy. [82,83,91,99]

Naproti tomu u metody ELISA, která je hojně využívána pro studie s velkým počtem vzorků, je možné stanovit koncentraci pouze jednoho zvoleného analytu. [102,103]

Simultánní analýza L-argininu a jeho methylderivátů je velmi výhodná, protože je možné zhodnotit vzájemný poměr těchto látek, což může přinést daleko komplexnější představu o aktuálním stavu v lidském organismu. Například poměr L-arginin/ADMA může hrát klíčovou roli v tom, která z těchto látek vyhraje soutěž o vazebné místo na enzymu NOS. I zdánlivě vyšší koncentrace ADMA totiž může být kompenzována vyšší hladinou L-argininu. [13,14]

Další výhodou naší metody je také již zmiňovaná vysoká citlivost elektrochemického detektoru při použití coulometrické detekce. Díky tomu je možné stanovit poměrně nízké hodnoty cirkulujícího ADMA, které se pohybují většinou v submikromolárním rozmezí a zároveň je také možné odlišit malé koncentrační rozdíly mezi zdravými a nemocnými subjekty, či dokonce rozlišit malé rozdíly v koncentracích u jednotlivých stádií sledovaného onemocnění.

Nevýhodou naší metody je nemožnost využití gradientové eluce, protože elektrochemický detektor je obecně velmi citlivý na změnu chemického složení mobilní fáze, dokonce i na změnu její viskozity. Gradientová eluce by přitom mohla být velmi nápomocná pro snadnější rozdělení enantiomerů ADMA a SDMA. Například u metod HPLC s fluorescenční detekcí je gradientová eluce hojně využívána. [79,83]

Ačkoliv byl zmíněný problém vyřešen konstrukcí multikanálového CoulArray detektoru, který obsahuje sady 4, 8, 12 nebo 16 tříelektrodových elektrochemických článků zapojených do série, kdy je softwarově řízena kompenzace driftu během gradientní eluce, naše laboratoř neměla tento konkrétní model zařízení k dispozici. [83]

Naše metoda zároveň patří mezi ty náročnější, vzhledem k přípravě vzorku pomocí extrakce na pevné fázi. Například Schou-Pedersen a kolektiv poukázali na jednoduchý

postup přípravy vzorku pro stanovení ADMA metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Tento postup byl zaměřen na precipitaci proteinu pomocí vodného roztoku kyseliny trichloroctové. Výtěžnost tohoto postupu byla nad 90 % a byla srovnatelná s metodou SPE. [82]

Také metody využívající hmotnostní detekci vyžadují méně pracnou přípravu vzorku. Například Boelaert a kolektiv omezili přípravu vzorku pro kapalinovou chromatografii s hmotnostní detekcí na deproteinaci vzorku pomocí tepelné denaturace s šokovým ochlazením a jeho následnou ultrafiltrací. Fleszar a kolektiv omezili přípravu vzorku na deproteinaci pomocí acetonitrilu v kombinaci s benzoylchloridem. [90,91]

Doba jedné naší analýzy pro stanovení plazmatického vzorku byla 38 minut. S možností využití extrémně účinné kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií je dnes už možné dostat se na čas jedné analýzy pohybující se kolem 10 minut. [90,91]



## ZÁVĚR

Vypracovali jsme a pokusili jsme se optimalizovat metodu pro stanovení asymetrického dimethylargininu v plazmě pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie s elektrochemickou detekcí.

Dle našeho názoru je vypracovaná metoda nadějná a do budoucna použitelná pro stanovení tohoto parametru ve vzorcích lidské plazmy. Je však třeba ještě vyřešit oddělení píku, který koeluuje s ADMA.

Promytí kolony po analýze plazmatického vzorku je nutné, proto je třeba použít přepínač mobilních fází pro značné zjednodušení a urychlení promývacího kroku. Zároveň je třeba dbát na precizní odzdušnění mobilních fází.

I přes to, že s ADMA koeluuje ještě jiný analyt, SDMA se podařilo rozdělit a stanovit úspěšně. SDMA má přitom svůj potenciál a vysokou výpovědní hodnotu, neboť může být velmi senzitivním markerem funkce ledvin.

## POUŽITÁ LITERATURA

- [1] W.-C. Zhao *et al.*, “Asymmetric dimethylarginine: An crucial regulator in tissue fibrosis,” *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 854, pp. 54–61, Jul. 2019.
- [2] E. Oliva-Damaso *et al.*, “Asymmetric (ADMA) and Symmetric (SDMA) Dimethylarginines in Chronic Kidney Disease: A Clinical Approach,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, no. 15, p. 3668, Jul. 2019.
- [3] Y. Kakimoto and S. Akazawa, “Isolation and Identification of  $N^G, N^G$ - and  $N^G, N^G$ -Dimethylarginine,  $N'$ -Mono-, Di-, and Trimethyllysine, and Glucosylgalactosyl- and Galactosyl- $\delta$ -hydroxylysine from Human Urine,” *The J. of Biolog. Chem.*, vol. 245, no. 21, pp. 5751–5758. May 1970.
- [4] A. Runčíková, “Význam asymterického dimethylargininu v ateroskleróze,” Pardubice, 2019. 45 s. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická. Vedoucí práce Mgr. Pavla Žáková, Ph.D.
- [5] R. H. Böger, “All about ADMA: A novel risk factor is discovered,” [online]. Hamburg: DLD Diagnostika GmbH, 2008 [cit. 2021-05-14]. Dostupné z: [https://www.dld-diagnostika.de/uploads/DLD\\_Brochure-ADMA\\_english\\_2008\\_2.pdf](https://www.dld-diagnostika.de/uploads/DLD_Brochure-ADMA_english_2008_2.pdf).
- [6] J. T. Groves and C. C.-Y. Wang, “Nitric oxide synthase: models and mechanisms,” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, vol. 4, no. 6, pp. 687–695, Dec. 2000.
- [7] X. Liu *et al.*, “Effect of asymmetric dimethylarginine (ADMA) on heart failure development,” *Nitric Oxide*, vol. 54, pp. 73–81, Apr. 2016.
- [8] V. Gebhart *et al.*, “Site and mechanism of uncoupling of nitric-oxide synthase: Uncoupling by monomerization and other misconceptions,” *Nitric Oxide*, vol. 89, pp. 14–21, Aug. 2019.
- [9] G. H. Oliveira-Paula *et al.*, “Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms,” *Gene*, vol. 575, no. 2, pp. 584–599, Jan. 2016.
- [10] R. H. Böger, “The emerging role of asymmetric dimethylarginine as a novel cardiovascular risk factor.,” *Cardiovasc. Res.*, vol. 59, no. 4, pp. 824–33, Oct. 2003.

- [11] A. J. Pope *et al.*, “Role of dimethylarginine dimethylaminohydrolases in the regulation of endothelial nitric oxide production.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 51, pp. 35338–47, Dec. 2009.
- [12] X. Hu *et al.*, “Dimethylarginine dimethylaminohydrolase-1 is the critical enzyme for degrading the cardiovascular risk factor asymmetrical dimethylarginine.,” *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 31, no. 7, pp. 1540–6, Jul. 2011.
- [13] T. Teerlink *et al.*, “Cellular ADMA: Regulation and action,” *Pharmacol. Res.*, vol. 60, no. 6, pp. 448–460, Dec. 2009.
- [14] S. M. Bode-Böger *et al.*, “The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio.,” *Pharmacol. Ther.*, vol. 114, no. 3, pp. 295–306, Jun. 2007.
- [15] R. N. Rodionov *et al.*, “Human alanine-glyoxylate aminotransferase 2 lowers asymmetric dimethylarginine and protects from inhibition of nitric oxide production.,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 8, pp. 5385–91, Feb. 2010.
- [16] R. N. Rodionov *et al.*, “Role of alanine:glyoxylate aminotransferase 2 in metabolism of asymmetric dimethylarginine in the settings of asymmetric dimethylarginine overload and bilateral nephrectomy.,” *Nephrol. Dial. Transplant*, vol. 29, no. 11, pp. 2035–42, Nov. 2014.
- [17] S. Zhou *et al.*, “Asymmetric dimethylarginine and all-cause mortality: a systematic review and meta-analysis.,” *Sci. Rep.*, vol. 7, p. 44692, 2017.
- [18] S. Schlesinger *et al.*, “Asymmetric and Symmetric Dimethylarginine as Risk Markers for Total Mortality and Cardiovascular Outcomes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Prospective Studies.,” *PLoS One*, vol. 11, no. 11, p. e0165811, 2016.
- [19] M. Chen *et al.*, “ADMA induces monocyte adhesion via activation of chemokine receptors in cultured THP-1 cells,” *Cytokine*, vol. 43, no. 2, pp. 149–159, Aug. 2008.
- [20] D.-J. Jiang *et al.*, “Asymmetric dimethylarginine induces tissue factor expression in monocytes via NF-kappaB-dependent pathway: Role in acute coronary syndromes.,” *Atherosclerosis*, vol. 205, no. 2, pp. 554–60, Aug. 2009.

- [21] G.-G. Zhang *et al.*, “Asymmetric dimethylarginine induces TNF- $\alpha$  production via ROS/NF- $\kappa$ B dependent pathway in human monocytic cells and the inhibitory effect of reinoside C,” *Vascul. Pharmacol.*, vol. 48, no. 2–3, pp. 115–121, Feb. 2008.
- [22] I. V. Smirnova *et al.*, “Asymmetric dimethylarginine upregulates LOX-1 in activated macrophages: role in foam cell formation,” *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.*, vol. 287, no. 2, pp. H782–H790, Aug. 2004.
- [23] I. A. Darby *et al.*, “The myofibroblast, a key cell in normal and pathological tissue repair,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 73, no. 6, pp. 1145–1157, Mar. 2016.
- [24] I. Jayachandran *et al.*, “Association of circulatory asymmetric dimethylarginine (ADMA) with diabetic nephropathy in Asian Indians and its causative role in renal cell injury,” *Clin. Biochem.*, vol. 50, no. 15, pp. 835–842, Oct. 2017.
- [25] L. Shi *et al.*, “Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase 1 Deficiency Induces the Epithelial to Mesenchymal Transition in Renal Proximal Tubular Epithelial Cells and Exacerbates Kidney Damage in Aged and Diabetic Mice,” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 27, no. 16, pp. 1347–1360, Dec. 2017.
- [26] Y. Zhou *et al.*, “Rho/ROCK Signal Cascade Mediates Asymmetric Dimethylarginine-Induced Vascular Smooth Muscle Cells Migration and Phenotype Change,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, pp. 1–9, 2014.
- [27] L. Wang *et al.*, “Actin cytoskeleton-dependent pathways for ADMA-induced NF- $\kappa$ B activation and TGF- $\beta$  high expression in human renal glomerular endothelial cells,” *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, vol. 44, no. 11, pp. 918–923, Nov. 2012.
- [28] K. Tamaki *et al.*, “TGF- $\beta$ 1 in glomerulosclerosis and interstitial fibrosis of adriamycin nephropathy,” *Kidney International*, vol. 45, pp. 525–536, 1994.
- [29] F. H. Epstein *et al.*, “Transforming Growth Factor  $\beta$  in Tissue Fibrosis,” *N. Engl. J. Med.*, vol. 331, no. 19, pp. 1286–1292, Nov. 1994.
- [30] K. Koivula *et al.*, “Long-term outcome of pre-specified ECG patterns in acute coronary syndrome,” *J. Electrocardiol.*, vol. 62, pp. 178–183, Sep. 2020.
- [31] C. Povýšil a I. Šteiner, “*Speciální patologie*,” 2. dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, c2007. ISBN 978-80-7262-494-2.

- [32] W.-Z. Zhang *et al.*, “Adverse Effects of Cigarette Smoke on NO Bioavailability,” *Hypertension*, vol. 48, no. 2, pp. 278–285, Aug. 2006.
- [33] R. V. Parikh *et al.*, “Asymmetric dimethylarginine predicts impaired epicardial coronary vasomotion in patients with angina in the absence of obstructive coronary artery disease,” *Int. J. Cardiol.*, vol. 299, pp. 7–11, Jan. 2020.
- [34] J. Ye *et al.*, “Prognostic value of asymmetric dimethylarginine in patients with coronary artery disease: A meta-analysis,” *Nitric Oxide*, vol. 109–110, pp. 50–56, May 2021.
- [35] R. Schnabel *et al.*, “Asymmetric Dimethylarginine and the Risk of Cardiovascular Events and Death in Patients With Coronary Artery Disease,” *Circ. Res.*, vol. 97, no. 5, Sep. 2005.
- [36] M. Zeller *et al.*, “Impact of Asymmetric Dimethylarginine on Mortality After Acute Myocardial Infarction,” *Arter. Thromb Vasc Biol*, vol. 28, pp. 954–960, 2008.
- [37] N. Sen *et al.*, “Elevated plasma asymmetric dimethylarginine level in acute myocardial infarction patients as a predictor of poor prognosis and angiographic impaired reperfusion,” *Atherosclerosis*, vol. 219, no. 1, pp. 304–310, Nov. 2011.
- [38] J. Lorin *et al.*, “High Levels of Asymmetric Dimethylarginine Are Strongly Associated with Low HDL in Patients with Acute Myocardial Infarction,” *PLoS One*, vol. 8, no. 6, p. e64796, Jun. 2013.
- [39] C. Besler *et al.*, “Molecular mechanisms of vascular effects of High-density lipoprotein: alterations in cardiovascular disease.,” *EMBO Mol. Med.*, vol. 4, no. 4, pp. 251–68, Apr. 2012.
- [40] S. C. Bergheanu *et al.*, “Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) Levels Display a Morning Peak in Patients with Acute Myocardial Infarction,” *Dis. Markers*, vol. 30, no. 5, p. 245, 2011.
- [41] J. M. Stolker *et al.*, “Mode of death after contemporary percutaneous coronary intervention: A report from the Evaluation of Drug Eluting Stents and Ischemic Events registry,” *Am. Heart J.*, vol. 162, no. 5, pp. 914–921, Nov. 2011.

- [42] W.-C. Huang *et al.*, “Association between asymmetric dimethylarginine and in-stent restenosis tissue characteristics assessed by optical coherence tomography,” *Int. J. Cardiol.*, vol. 289, pp. 131–137, Aug. 2019.
- [43] G. Nakazawa *et al.*, “The Pathology of Neoatherosclerosis in Human Coronary Implants: Bare-Metal and Drug-Eluting Stents,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 57, no. 11, pp. 1314–1322, Mar. 2011.
- [44] F. Otsuka *et al.*, “The importance of the endothelium in atherothrombosis and coronary stenting,” *Nat. Rev. Cardiol.*, vol. 9, no. 8, pp. 439–453, Aug. 2012.
- [45] T. Gremmel *et al.*, “Interleukin-6 and asymmetric Dimethylarginine are associated with platelet activation after percutaneous angioplasty with stent implantation,” *PLoS One*, vol. 10, no. 3, p. e0122586, Mar. 2015.
- [46] M. Krzanowski *et al.*, “Asymmetric dimethylarginine represents a precious risk indicator for radial artery calcification in patients with advanced kidney disease,” *Polish Arch. Intern. Med.*, Feb. 2018.
- [47] H. L. Gornik and M. A. Creager, “Arginine and Endothelial and Vascular Health,” *J. Nutr.*, vol. 134, no. 10, pp. 2880S–2887S, Oct. 2004.
- [48] H. Konishi *et al.*, “Dimethylarginine Dimethylaminohydrolase Promotes Endothelial Repair After Vascular Injury,” *J. Am. Coll. Cardiol.*, vol. 49, no. 10, pp. 1099–1105, Mar. 2007.
- [49] W. Pan *et al.*, “Prognostic Value of Asymmetric Dimethylarginine in Patients with Heart Failure: A Systematic Review and Meta-analysis,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2020, p. 6960107, 2020.
- [50] X. Liu *et al.*, “Asymmetric dimethylarginine (ADMA) as an important risk factor for the increased cardiovascular diseases and heart failure in chronic kidney disease,” *Nitric Oxide*, vol. 78, pp. 113–120, Aug. 2018.
- [51] P. Vallance *et al.*, “Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure,” *Lancet (London, England)*, vol. 339, no. 8793, pp. 572–5, Mar. 1992.
- [52] J. T. Kielstein *et al.*, “Low dialysance of asymmetric dimethylarginine (ADMA) - in vivo and in vitro evidence of significant protein binding,” *Clin. Nephrol.*, vol. 62, no. 10, pp. 295–300, Oct. 2004.

- [53] C. Zoccali *et al.*, “Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study,” *Lancet*, vol. 358, no. 9299, pp. 2113–2117, Dec. 2001.
- [54] G. Tripepi *et al.*, “Inflammation and Asymmetric Dimethylarginine for Predicting Death and Cardiovascular Events in ESRD Patients,” *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 6, no. 7, pp. 1714–1721, Jul. 2011.
- [55] R. Vanholder *et al.*, “Review on uremic toxins: Classification, concentration, and interindividual variability,” *Kidney Int.*, vol. 63, no. 5, pp.1934–1943, 2003.
- [56] J. T. Kielstein *et al.*, “Marked Increase of Asymmetric Dimethylarginine in Patients with Incipient Primary Chronic Renal Disease,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 13, no. 1, pp. 170–176, Jan. 2002.
- [57] T. Osanai *et al.*, “Relationship between Salt Intake, Nitric Oxide and Asymmetric Dimethylarginine and Its Relevance to Patients with End-Stage Renal Disease,” *Blood Purif.*, vol. 20, no. 5, pp. 466–468, 2002.
- [58] S. Mochizuki *et al.*, “Systemic Nitric Oxide Production Rate during Hemodialysis and Its Relationship with Nitric Oxide-Related Factors,” *Blood Purif.*, vol. 23, no. 4, pp. 317–324, 2005.
- [59] M. I. Yilmaz *et al.*, “The Determinants of Endothelial Dysfunction in CKD: Oxidative Stress and Asymmetric Dimethylarginine,” *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 47, no. 1, pp. 42–50, Jan. 2006.
- [60] J. Eiselt *et al.*, “Asymmetric Dimethylarginine and Progression of Chronic Kidney Disease - a One-Year Follow-Up Study,” *Kidney Blood Press. Res.*, vol. 39, no. 1, pp. 50–57, 2014.
- [61] I. E. Emrich *et al.*, “Symmetric dimethylarginine (SDMA) outperforms asymmetric dimethylarginine (ADMA) and other methylarginines as predictor of renal and cardiovascular outcome in non-dialysis chronic kidney disease,” *Clin. Res. Cardiol.*, vol. 107, no. 3, pp. 201–213, Mar. 2018.
- [62] S. M. Bode-Böger *et al.*, “Symmetrical Dimethylarginine: A New Combined Parameter for Renal Function and Extent of Coronary Artery Disease,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 17, no. 4, pp. 1128–1134, Apr. 2006.

- [63] J. T. Kielstein *et al.*, “Symmetric dimethylarginine (SDMA) as endogenous marker of renal function—a meta-analysis,” *Nephrol. Dial. Transplant.*, vol. 21, no. 9, pp. 2446–2451, Sep. 2006.
- [64] O. Tutarel *et al.*, “Symmetrical Dimethylarginine Outperforms CKD-EPI and MDRD-Derived eGFR for the Assessment of Renal Function in Patients with Adult Congenital Heart Disease,” *Kidney Blood Press. Res.*, vol. 34, no. 1, pp. 41–45, 2011.
- [65] A. S. Levey *et al.*, “A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 150, no. 9, p. 604, 2009.
- [66] A. S. Levey, “A More Accurate Method To Estimate Glomerular Filtration Rate from Serum Creatinine: A New Prediction Equation,” *Ann. Intern. Med.*, vol. 130, no. 6, p. 461, Mar. 1999.
- [67] A. Larsson *et al.*, “Calculation of glomerular filtration rate expressed in mL/min from plasma cystatin C values in mg/L,” *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, vol. 64, no. 1, pp. 25–30, Feb. 2004.
- [68] N. D. Vaziri, “Mechanism of erythropoietin-induced hypertension,” *Am. J. Kidney Dis.*, vol. 33, no. 5, pp. 821–828, May 1999.
- [69] X. Q. Wang and N. D. Vaziri, “Erythropoietin Depresses Nitric Oxide Synthase Expression by Human Endothelial Cells,” *Hypertension*, vol. 33, no. 3, pp. 894–899, Mar. 1999.
- [70] F. Scalera *et al.*, “Erythropoietin increases asymmetric dimethylarginine in endothelial cells: role of dimethylarginine dimethylaminohydrolase,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 16, no. 4, pp. 892–8, Apr. 2005.
- [71] M. Yokoro *et al.*, “Asymmetric Dimethylarginine Contributes to the Impaired Response to Erythropoietin in CKD-Anemia,” *J. Am. Soc. Nephrol.*, vol. 28, no. 9, pp. 2670–2680, Sep. 2017.
- [72] T. Teerlink, “HPLC analysis of ADMA and other methylated l-arginine analogs in biological fluids,” *J. Chromatogr. B*, vol. 851, no. 1–2, pp. 21–29, May 2007.
- [73] P. Valtonen *et al.*, “Comparison of HPLC method and commercial ELISA assay for asymmetric dimethylarginine (ADMA) determination in human serum,” *J. Chromatogr. B*, vol. 828, no. 1–2, pp. 97–102, Dec. 2005.



- [74] E. Schwedhelm, "Quantification of ADMA: analytical approaches.," *Vasc. Med.*, vol. 10 Suppl 1, pp. S89-95, Jul. 2005.
- [75] A. Unlu *et al.*, "HPLC and LC-MS/MS measurement methods for the quantification of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and related metabolites," *Turkish J. Biochem.*, vol. 0, no. 0, Aug. 2020.
- [76] M. Marra *et al.*, "High-performance liquid chromatographic assay of asymmetric dimethylarginine, symmetric dimethylarginine, and arginine in human plasma by derivatization with naphthalene-2,3-dicarboxaldehyde," *Anal. Biochem.*, vol. 318, no. 1, pp. 13–17, Jul. 2003.
- [77] T. Heresztyn *et al.*, "Determination of L-arginine and NG,NG- and NG,NG'-dimethyl-L-arginine in plasma by liquid chromatography as AccQ-Fluor™ fluorescent derivatives," *J. Chromatogr. B*, vol. 805, no. 2, pp. 325–329, Jun. 2004.
- [78] S. Nonaka *et al.*, "Determination of NG,NG-dimethyl-L-arginine in rat plasma and dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity in rat kidney using a monolithic silica column," *J. Chromatogr. B*, vol. 843, no. 2, pp. 170–174, Nov. 2006.
- [79] V. Ravula and S. Annapurna Singh, "A simple reversed-phase HPLC method for the estimation of dimethylarginines and homocysteine in plasma and serum," *Sep. Sci. Plus*, vol. 1, no. 6, pp. 404–410, Jun. 2018.
- [80] J. Pi *et al.*, "Improved method for simultaneous determination of L-arginine and its mono- and dimethylated metabolites in biological samples by high-performance liquid chromatography.," *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, vol. 742, no. 1, pp. 199–203, May 2000.
- [81] S. de Jong and T. Teerlink, "Analysis of asymmetric dimethylarginine in plasma by HPLC using a monolithic column," *Anal. Biochem.*, vol. 353, no. 2, pp. 287–289, Jun. 2006.
- [82] A. M. V. Schou-Pedersen and J. Lykkesfeldt, "Comparison of Three Sample Preparation Procedures for the Quantification of L-Arginine, Asymmetric Dimethylarginine, and Symmetric Dimethylarginine in Human Plasma Using HPLC-FLD.," *J. Anal. Methods Chem.*, vol. 2018, p. 6148515, 2018.

- [83] M. Kleparnik *et al.*, “Determination of asymmetric and symmetric dimethylarginines in human plasma by HPLC with electrochemical detection,” *J. Sep. Sci.*, vol. 36, no. 23, pp. 3696–3701, Dec. 2013.
- [84] K. Suzuki *et al.*, “The stable o-phthalaldehyde-ferrocene/6-ferrocenyl-1-hexanethiol pre-column derivatization high-performance liquid chromatography of dimethylarginine by novel dual fluorescence and electrochemical detector,” *Biomed. Chromatogr.*, vol. 27, no. 4, pp. 535–538, Apr. 2013.
- [85] J. D. Horowitz and T. Heresztyn, “An overview of plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in health and disease and in clinical studies: Methodological considerations,” *J. Chromatogr. B*, vol. 851, no. 1–2, pp. 42–50, May 2007.
- [86] J. Martens-Lobenhoffer and S. M. Bode-Böger, “Chromatographic-mass spectrometric methods for the quantification of l-arginine and its methylated metabolites in biological fluids,” *J. Chromatogr. B*, vol. 851, no. 1–2, pp. 30–41, May 2007.
- [87] P. J. Taylor, “Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry,” *Clin. Biochem.*, vol. 38, no. 4, pp. 328–334, Apr. 2005.
- [88] S. Souverain *et al.*, “Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1058, no. 1–2, pp. 61–66, Nov. 2004.
- [89] B. K. Matuszewski *et al.*, “Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS,” *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 13, pp. 3019–30, Jul. 2003.
- [90] J. Boelaert *et al.*, “Determination of Asymmetric and Symmetric Dimethylarginine in Serum from Patients with Chronic Kidney Disease: UPLC-MS/MS versus ELISA,” *Toxins (Basel)*, vol. 8, no. 5, 2016.
- [91] M. G. Fleszar *et al.*, “Quantitative Analysis of l-Arginine, Dimethylated Arginine Derivatives, l-Citrulline, and Dimethylamine in Human Serum Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometric Method,” *Chromatographia*, vol. 81, no. 6, pp. 911–921, 2018.

- [92] S. Sotgia *et al.*, “A diethylpyrocarbonate-based derivatization method for the LC-MS/MS measurement of plasma arginine and its chemically related metabolites and analogs,” *Clin. Chim. Acta*, vol. 492, pp. 29–36, May 2019.
- [93] J. Albsmeier *et al.*, “Determination of NG,NG-dimethyl-L-arginine, an endogenous NO synthase inhibitor, by gas chromatography-mass spectrometry,” *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 809, no. 1, pp. 59–65, Sep. 2004.
- [94] S. Pundak and M. Wilchek, “Synthesis of guanidino-N-alkylarginines by the use of polymeric pseudoureas,” *J. Org. Chem.*, vol. 46, no. 4, pp. 808–809, Feb. 1981.
- [95] D. Tsikas *et al.*, “Quantitative determination of circulating and urinary asymmetric dimethylarginine (ADMA) in humans by gas chromatography-tandem mass spectrometry as methyl ester tri(N-pentafluoropropionyl) derivative,” *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 798, no. 1, pp. 87–99, Dec. 2003.
- [96] D. Tsikas, “De novo synthesis of trideuteromethyl esters of amino acids for use in GC-MS and GC-tandem MS exemplified for ADMA in human plasma and urine: standardization, validation, comparison and proof of evidence for their aptitude as internal standards,” *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, vol. 877, no. 23, pp. 2308–20, Aug. 2009.
- [97] A. Bollenbach *et al.*, “Utility of homoarginine in the GC-MS quantification of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in human serum proteins,” *Anal. Biochem.*, vol. 563, pp. 67–70, 2018.
- [98] D. Tsikas *et al.*, “Asymmetric dimethylarginine (ADMA) is present in plasma proteins of healthy subjects at the low nmol-per-g-level,” *Nitric Oxide*, vol. 22, no. 4, pp. 316–317, May 2010.
- [99] E. Caussé *et al.*, “Determination of asymmetrical dimethylarginine by capillary electrophoresis-laser-induced fluorescence,” *J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.*, vol. 741, no. 1, pp. 77–83, Apr. 2000.
- [100] A. Zinellu *et al.*, “Improved method for plasma ADMA, SDMA, and arginine quantification by field-amplified sample injection capillary electrophoresis UV detection,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 399, no. 5, pp. 1815–21, Feb. 2011.

- [101] C. Desiderio *et al.*, “Analysis of arginine and methylated metabolites in human plasma by field amplified sample injection capillary electrophoresis tandem mass spectrometry,” *Electrophoresis*, vol. 31, no. 11, pp. 1894–902, Jun. 2010.
- [102] F. Schulze *et al.*, “Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay,” *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 42, no. 12, pp. 1377–83, 2004.
- [103] “ADMA fast ELISA.,” [online]. Hamburg: DLD Diagnostika GmbH, 2020 [cit. 2021-05-26]. Dostupné z: [https://www.dld-diagnostika.de/uploads/uploads/Admafa-e\\_6.pdf](https://www.dld-diagnostika.de/uploads/uploads/Admafa-e_6.pdf).
- [104] B. Németh *et al.*, “The issue of plasma asymmetric dimethylarginine reference range - A systematic review and meta-analysis,” *PLoS One*, vol. 12, no. 5, p. e0177493, 2017.
- [105] “Coulochem® III Reference Manual.,” [online]. Chelmsford: ESA, Inc., 2004 [cit. 2021-06-13]. Dostupné z: [http://www.vtpup.cz/common/manual/PrF\\_elanmlab\\_ESA\\_Coulochem\\_manual2\\_EN.pdf](http://www.vtpup.cz/common/manual/PrF_elanmlab_ESA_Coulochem_manual2_EN.pdf).
- [106] “Arion Up Close.,” Arion Chromatography [online]. 2021 [cit. 2021-06-25]. Dostupné z: <https://arionchromatography.com/arion-up-close.html>.
- [107] D. Atzler *et al.*, “Serum reference intervals of homoarginine, ADMA, and SDMA in the study of health in Pomerania.,” *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 52, no. 12, pp. 1835–42, Dec. 2014.

## **PŘÍLOHY**

<b>Příloha A</b> Stanovisko etické komise 1. část .....	85
<b>Příloha A</b> Stanovisko etické komise 2. část .....	86
<b>Příloha B</b> Informovaný souhlas.....	87

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

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

---

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

434/13.12.2013

▪ MUDr. Vojtěch Novotný, lékař kardiologického odd. PKN, a.s., požádal členy EK o souhlas s prováděním studie s názvem „**Zánětlivá odpověď po implantaci absorbovatelných koronárních stentů**“. Studie je zaměřená na sledování zánětlivé reakce, nových markerů oxidačního stresu a dalších biochemických parametrů u pacientů s ischemickou chorobou srdeční a uskuteční se v rámci spolupráce Pardubické krajské nemocnice, a.s., Kardiologického centra Agel, a.s. a Univerzity Pardubice na Kardiologickém oddělení s vědomím a pod dohledem prim. MUDr. Petra Vojtíška, CSc. a MUDr. Iva Varvařovského, Ph.D. Studie nemá komerční charakter a rozšiřuje již probíhající studii, schválenou Etickou komisí při PKN, a.s. dne 11.5.2012. Získaná data využije MUDr. Vojtěch Novotný k sepsání disertační práce v rámci doktorského studijního programu (Ph.D.) na Lékařské fakultě Univerzity Karlovy v Hradci Králové, školitelem je doc. MUDr. Josef Štásek, Ph.D.

Na studii se budou podílet:

Kardiologické oddělení: prim. MUDr. P. Vojtíšek, CSc., MUDr. V. Novotný

Kardiologické centrum Agel, a.s.: MUDr. I. Varvařovský, Ph.D., MUDr. J. Matějka, Ph.D., MUDr. V. Rozsival, CSc., MUDr. V. Novotný.

Oddělení klinické biochemie a diagnostiky: prim. PharmDr. J. Skalický, Ph.D., Mgr. J. Kovařík  
Univerzita Pardubice: MUDr. V. Mužáková, Ph.D., Mgr. P. Žáková, Ph.D., Doc. Mgr. R. Kandár, Ph.D.

Byly předloženy dokumenty: protokol studie, informovaný souhlas, patientský dotazník, informovaný souhlas s provedením koronarografie /PCI, informace výrobců o stentech.

Členové EK studii po prostudování předložených dokumentů – v souladu s ICH GCP – schválili.

V Pardubicích 13. 12. 2013

Zapsala: Ivana Faiklová

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

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



MUDr. Josef Hájek, CSc.

předseda Etické komise při Pardubické krajské nemocnici, a. s


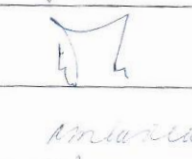
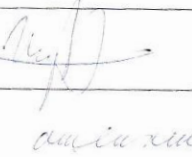
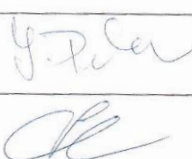
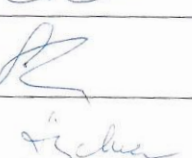
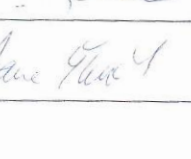
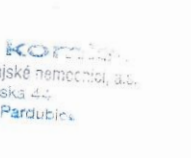



**Příloha A Stanovisko etické komise 2. část**

**Etická komise při Pardubické krajské nemocnici, a. s.**

- její složení na schůzi konané

dne 19. 12. 2013

podpis

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

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

## *Příloha B Informovaný souhlas*

### **INFORMACE PRO ÚČASTNÍKY STUDIE**

Vážená paní, vážený pane,

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

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

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

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

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

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

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

Vaše účast na této studii je zcela dobrovolná.