

UNIVERZITA KARLOVA  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
Katedra biochemických věd

**ANALÝZA ARGININU A JEHO METHYLOVANÝCH DERIVÁTŮ  
V KLINICKÝCH VZORCÍCH POMOCÍ LC-MS/MS**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Pavel Prokop

*Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpal, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci jsou řádně citovány. Práce nebyla použita k získání jiného nebo stejného titulu.*

7. září 2020

Pavel Prokop

Rád bych poděkoval doc. PharmDr. Ivě Boušové, Ph.D., za trpělivost a cenné rady při vypracování této diplomové práce, dále Mgr. Vendule Sudové za pomoc při práci s hmotnostním spektrometrem a při statistickém zpracování získaných dat a také všem zaměstnancům ÚKBH FN Plzeň za podporu při studiu.

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra biochemických věd

**Uchazeč:** Bc. Pavel Prokop, DiS.

**Školitel:** doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.

**Název diplomové práce:** Analýza argininu a jeho methylovaných derivátů  
v klinických vzorcích metodou LC-MS/MS

Asymetrický dimethylarginin (ADMA) a jeho enantiomer, symetrický dimethylarginin (SDMA), jsou přirozeně se vyskytující aminokyseliny, které vznikají intracelulárně z L-argininu. ADMA je endogenním kompetitivním inhibitorem synthasy oxidu dusnatého. Zvýšené hladiny ADMA a SDMA jsou spojovány s endoteliální dysfunkcí, hypertenzí, kardiovaskulárními a renálními onemocněními. Obě látky se u pacientů s chronickým renálním onemocněním (CKD) hromadí. Cílem této diplomové práce bylo zavedení a validace metody na stanovení L-argininu, ADMA a SDMA v lidské plazmě pomocí ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). LC-MS/MS metoda byla následně porovnána s enzymovou imunoanalýzou na imunosorbentech (ELISA) a metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie s fluorescenční detekcí (HPLC-FL). Chromatografická separace probíhala za použití kapalinového chromatografu Dionex UltiMate 3000 UHPLC, následovala hmotnostní detekce na hmotnostním spektrometru amaZon SL. Jako interní standardy byly použity L-arginin-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, ADMA-d<sub>6</sub> a SDMA-d<sub>6</sub>. Příprava vzorku zahrnovala předkolonovou derivatizaci 1-butanolem. Pro kvantifikaci analytů bylo použito monitorování více reakcí (MRM) v pozitivním módu. Zavedená LC-MS/MS metoda vykazovala velmi dobré analytické vlastnosti splňující podmínky pro její validaci a je srovnatelná s dříve publikovanými metodami dalších autorů. Plazmatické hladiny ADMA a SDMA získané LC-MS/MS metodou velmi dobře korelovaly s výsledky získanými pomocí ELISA a HPLC-FL metody. Stanovení plazmatických hladin ADMA a SDMA bylo provedeno ve vzorcích plazmy získaných od zdravých dobrovolníků (n = 40) a pacientů s CKD (n = 40). Hladiny ADMA i SDMA byly u pacientů s CKD signifikantně zvýšeny.

## ABSTRACT

**Charles University**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Biochemical Sciences**

**Candidate:** Bc. Pavel Prokop, DiS.  
**Supervisor:** doc. PharmDr. Iva Boušová, Ph.D.  
**Title of diploma thesis:** Analysis of arginine and its methylated derivatives in clinical samples using LC-MS/MS

Asymmetric dimethylarginine (ADMA) and its enantiomer, symmetric dimethylarginine (SDMA), are naturally occurring amino acids that are generated intracellularly from L-arginine. ADMA is an endogenous competitive inhibitor of nitric oxide synthase. Increased levels of ADMA and SDMA are associated with endothelial dysfunction, hypertension, cardiovascular and renal diseases. Both compounds are accumulating in chronic kidney disease (CKD) patients. The aim of this diploma thesis was to develop and validate a liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for the determination of L-arginine, ADMA and SDMA in human plasma. Subsequently, LC-MS/MS method was compared with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FL) method. Chromatographic separation was performed on Dionex UltiMate 3000 UHPLC liquid chromatograph, followed by tandem mass spectrometric detection on amaZon SL mass spectrometer. L-Arginine- $^{13}\text{C}_6$ , ADMA- $\text{d}_6$  and SDMA- $\text{d}_6$  were used as the internal standards. Sample preparation included precolumn derivatization by 1-butanol. Multiple reaction monitoring (MRM) in positive mode was used for analyte quantification. Developed LC-MS/MS method showed very good analytical properties meeting the conditions for its validation and it is comparable with the previously published methods of other authors. Plasma levels of ADMA and SDMA obtained by the LC-MS/MS method correlated very well with those obtained by ELISA and HPLC-FL method. Plasma levels of ADMA and SDMA were measured in plasma samples obtained from healthy volunteers ( $n = 40$ ) and patients CKD ( $n = 40$ ). Both ADMA and SDMA levels were significantly elevated in the patients with CKD.

# OBSAH

1	ÚVOD .....	7
2	TEORETICKÁ ČÁST .....	8
2.1	Vznik a působení NO.....	8
2.2	Metabolismus methylargininů .....	10
2.2.1	Biosyntéza methylargininů .....	11
2.2.2	Eliminace .....	12
2.2.3	Transport přes membránu .....	15
2.3	L-Homoarginin .....	17
2.4	L-Argininový paradox .....	18
2.5	Klinický význam ADMA a SDMA .....	19
2.5.1	ADMA a SDMA u kardiovaskulárních onemocnění.....	20
2.5.2	ADMA a SDMA u renálních onemocnění.....	21
3	CÍL PRÁCE .....	23
4	MATERIÁL A METODIKA .....	24
4.1	Chemikálie a použitý materiál .....	24
4.1.1	Chemikálie .....	24
4.1.2	Použitý materiál a soupravy .....	25
4.1.3	Přístroje .....	25
4.1.4	Software .....	26
4.1.5	Ostatní materiál a pomůcky .....	26
4.2	Příprava roztoků.....	27
4.2.1	Zásobní roztok octanu amonného .....	27
4.2.2	Mobilní fáze .....	27
4.2.3	Standardy .....	27
4.2.4	Interní standardy .....	27
4.2.5	Roztoky pro HPLC-FL.....	28
4.3	Biologické vzorky.....	29
4.3.1	Kontrolní vzorky .....	29
4.4	Stanovení argininu a jeho dimethylderivátů metodou LC-MS/MS.....	30
4.4.1	Příprava vzorku .....	30
4.4.2	Derivatizace .....	31
4.4.3	Chromatografická separace.....	32

4.4.4	Hmotnostní detekce.....	33
4.4.5	Kalibrace .....	34
4.4.6	Validace .....	36
4.4.7	Stabilita vzorků při opakovaném zmrazení a rozmrazení .....	37
4.4.8	Porovnání vzorků plazmy a séra .....	38
4.5	Stanovení argininu a jeho dimethylderivátů metodou HPLC-FL .....	38
4.5.1	Extrakce na pevné fázi .....	38
4.5.2	Derivatizace OPA/MPA.....	38
4.5.3	Chromatografie .....	38
4.6	Stanovení ADMA a SDMA metodou ELISA.....	39
4.7	Zpracování dat .....	40
5	VÝSLEDKY .....	41
5.1	Zavedení metody LC-MS/MS .....	41
5.1.1	Chromatografická separace.....	41
5.1.2	Hmotnostní detekce.....	41
5.1.3	Kalibrace .....	46
5.1.4	Analytické vlastnosti metody.....	46
5.1.5	Vliv matrice vzorku .....	48
5.1.6	Stabilita vzorku při opakovaném zmrazení a rozmrazení.....	48
5.1.7	Porovnání vzorků plazmy a séra .....	49
5.2	Porovnání metod .....	53
5.2.1	Porovnání s metodu ELISA .....	53
5.2.2	Porovnání s metodu HPLC-FL .....	56
5.3	Klinické vzorky.....	59
5.3.1	Kontrolní skupina.....	59
5.3.2	Pacienti s CKD.....	60
6	DISKUSE.....	62
7	ZÁVĚR .....	69
	POUŽITÉ ZKRATKY.....	70
	POUŽITÁ LITERATURA .....	72
	SEZNAM OBRÁZKŮ.....	80
	SEZNAM TABULEK .....	81

# 1 ÚVOD

L-Arginin a jeho methylderiváty jsou aminokyseliny hrající klíčovou roli v syntéze oxidu dusnatého, molekuly potřebné k zajištění homeostázy cévní stěny. Akumulace inhibitorů NO synthasy, zejména asymetrického dimethylargininu (ADMA), vede k snížení produkce NO a endotelové dysfunkci, která může mít za následek rozvoj aterosklerózy. Zatímco ADMA je znakem endotelové dysfunkce cévní stěny, symetrický dimethylarginin (SDMA) je citlivým ukazatelem funkce ledvin.

Zavedení a validace metody kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) umožní rychlé a současné stanovení ADMA a SDMA v klinických vzorcích. U pacientů s chronickým renálním onemocněním je zvýšené riziko kardiovaskulárních komplikací. Stanovení asymetrického a symetrického dimethylargininu by mohlo přispět k včasné diagnostice a napomoci k predikci rozvoje tohoto onemocnění a sledování rizika výskytu aterosklerotických komplikací, které jsou hlavní příčinou morbidity a mortality u těchto pacientů.



## 2 TEORETICKÁ ČÁST

Oxid dusnatý tvořený buňkami endotelu je účinným vasodilatátorem. Dostatečná syntéza a biologická dostupnost oxidu dusnatého hraje klíčovou roli při ochraně cévního endotelu a v udržení homeostázy cév. Vaskulární funkce je *in vivo* ovlivněna koncentrací L-argininu a přítomností inhibitorů NO synthasy. Nedostatek NO je charakteristickým znakem endotelové dysfunkce, která je zodpovědná za řadu zdravotních problémů včetně aterosklerózy (Aldámiz-Echevarría & Andrade, 2012; Böger, 2008; Krzystek-Korpacka et al., 2019).

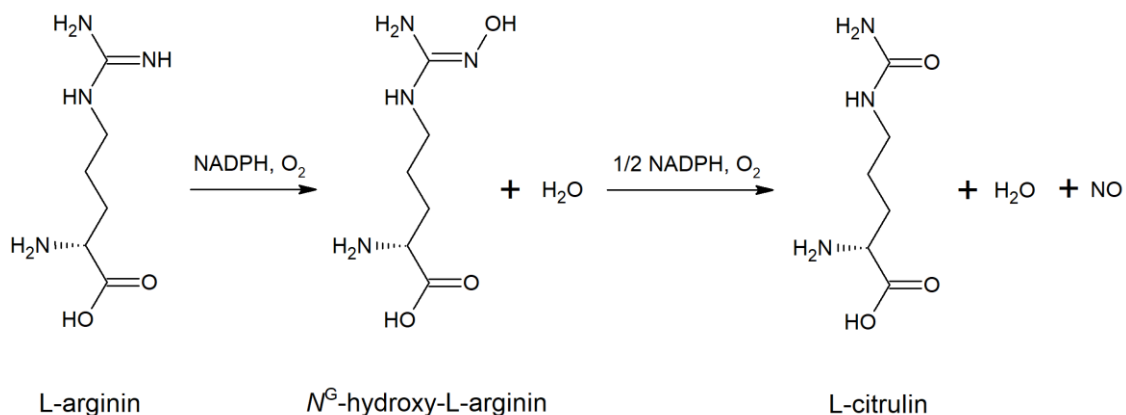
### 2.1 Vznik a působení NO

Oxid dusnatý vzniká v cévním endotelu z aminokyseliny L-argininu dvoustupňovou reakcí katalyzovanou enzymem NO synthasou (nitroxidsynthasa, NOS, EC 1.14.13.39). Dostatečná syntéza a biologická dostupnost oxidu dusnatého jsou nezbytné pro správnou funkci cévního endotelu (Krzystek-Korpacka et al., 2019).

Existují dva typy NO synthasy, konstitutivní (cNOS), závislá na přítomnosti vápenatých iontů a jejich vazbě na kalmodulin (CaM), a indukovatelná (iNOS). NO synthasa se vyskytuje v různých isoformách. Konstitutivní NOS zahrnuje dvě isoformy, neuronální isoformu I (nNOS), vyskytující se v nervových buňkách a kosterní svalovině a endoteliální isoformu III (eNOS), která se vyskytuje v endoteliálních buňkách. Indukovatelná NOS představuje isoformu II vyskytující se u makrofágů a trombocytů (Aldámiz-Echevarría & Andrade, 2012; Krzystek-Korpacka et al., 2019; Masopust & Průša, 2003; Tsikas et al., 2000).

Enzym NO synthasa je monooxygenasa, která se skládá ze dvou podjednotek a katalyzuje reakci přenosu elektronů z molekulárního kyslíku na L-arginin, což vede k produkci L-citrulinu a NO (Böger, 2008; Krzystek-Korpacka et al., 2019). V prvním kroku reakce vzniká hydroxylací intermediární metabolit  $N^G$ -hydroxy-L-arginin, který je následně oxidován na L-citrulin a uvolňuje se NO (Obr. 1). Syntéza je ovlivňována řadou kofaktorů, mezi něž patří tetrahydrobiopterin ( $BH_4$ ), flavinmononukleotid (FMN), flavinadenindinukleotid (FAD), přítomností inhibitorů NOS, tj.  $N^G$ -monomethyl-L-argininem (monomethyl-arginin, MMA),  $N^G, N^G$ -dimethyl-L-argininem (asymetrický dimethyl-arginin, ADMA) a lipoproteiny o nízké hustotě (LDL), a samozřejmě

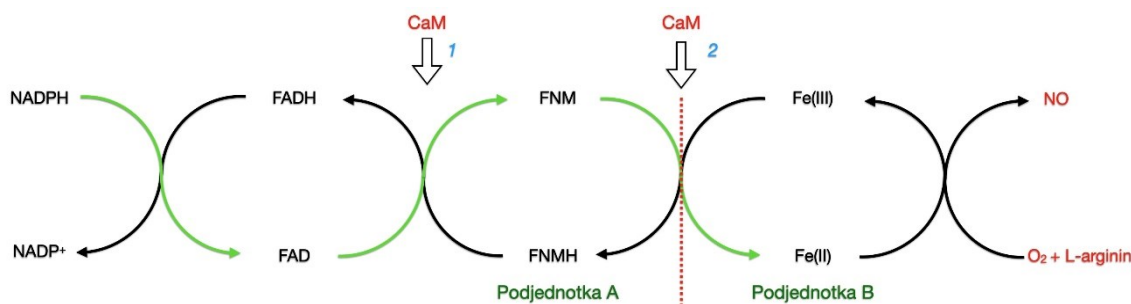
dostupností substrátu L-argininu (Böger, 2008; Masopust & Průša, 2003; Trocha et al., 2013; Tsikas, 2007).



**Obr. 1: Reakce vzniku NO z L-argininu.**

NADPH – nikotinamidadenindinukleotidfosfát

Každá podjednotka NOS je složená ze dvou hlavních domén – N-terminální oxygenasové domény s katalytickým hemem a C-terminální reduktasové domény, která obsahuje FMN, FAD a NADPH. Přenos elektronu mezi oxygenasovou a reduktasovou doménou téže podjednotky NOS probíhá z NADPH přes FAD a FMN do hemu. Vazba CaM pak v eNOS a nNOS aktivuje přenos elektronu z FMN na hem mezi podjednotkami enzymu a je také nutná pro správné zarovnání domén obsahujících FMN a hem v iNOS. Přenos elektronu mezi oxygenasovou a reduktasovou doménou je nezbytný pro správnou funkci NOS, protože dodává elektrony nutné pro aktivaci O<sub>2</sub> v katalytickém hemu (Obr. 2) (Feng, 2012).



**Obr. 2: Mechanismus přenosu elektronu NO synthasou.**

Přenos elektronu (zeleně) z NADPH na hem a vznik NO a L-citrulinu. Vazba Ca<sup>2+</sup> na CaM zvyšuje přenos elektronu z FAD na FMN (šipka 1) a spouští mezidoménový přenos elektronu na hemové železo (šipka 2) (Feng, 2012).

CaM – kalmodulin, NADP – nikotinamidadenindinukleotidfosfát, FAD – flavinadenindinukleotid, FMN – flavinmononukleotid,

Za patofyziologických podmínek, kdy dochází k inhibici NOS, je mechanismus reakce syntézy NO blokován a je přerušen přenos elektronů a tím i oxidace L-argininu a vznik NO. Akceptorem elektronů se pak stává kyslík a vzniká superoxidový radikál (Böger, 2008).

Oxid dusnatý je relativně nestabilní volný radikál, který hraje roli v mnoha biologických procesech. NO má vasodilatační účinek na cévní stěnu, inhibuje adhezi monocytů, adhezi a agregaci trombocytů, produkci tkáňového faktoru, proliferaci buněk hladké svaloviny cév a uvolňování superoxidových radikálů a snižuje oxidaci LDL. Je také využíván jako neurotransmiter při nervové komunikaci a makrofágy jej produkují při zánětlivé reakci (Aldámiz-Echevarría & Andrade, 2012; Arlouskaya et al., 2019; Böger, 2008, 2008; Šíroká et al., 2005).

U pacientů se zvýšenou hladinou inhibitorů NOS dochází k narušení vazodilatace závislé na oxidu dusnatém a oslabení dalších účinků NO. To vede ke změnám v endotelu, označovaným jako endotelová dysfunkce. Endotelová dysfunkce je zodpovědná za řadu zdravotních problémů, jako je ateroskleróza, hypertenze, trombóza či vaskulitida (Aldámiz-Echevarría & Andrade, 2012; Böger, 2008; Masopust & Průša, 2003).

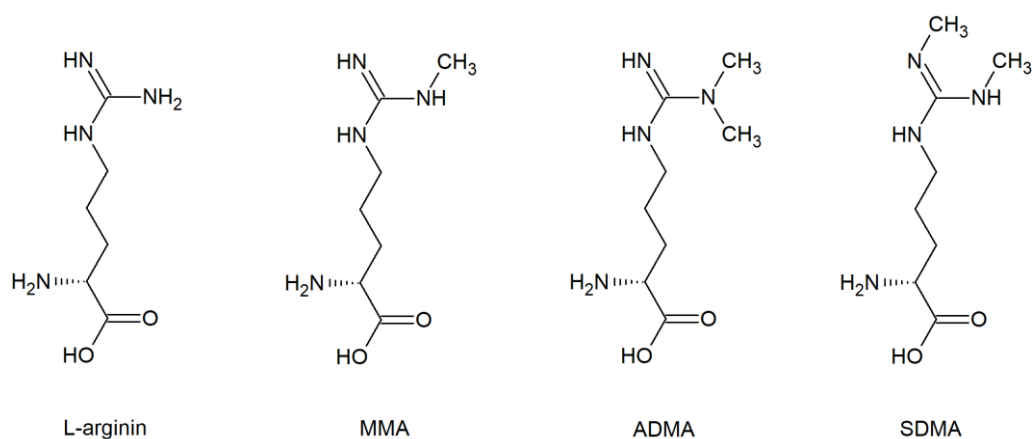
## 2.2 Metabolismus methylargininů

Methylargininy jsou deriváty odvozené od L-argininu. L-Arginin je bazická semiesenciální aminokyselina, která obsahuje polární disociovanou guanidinovou skupinu. Normální koncentrace se v plazmě pohybuje mezi 21 a 138  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (Burtis et al., 2013). L-Arginin je primárně syntetizován v proximálních tubulech ledvin, odkud je uvolňován do systémové cirkulace, dále vzniká jako intermediát močovinového cyklu, který probíhá v játrech, ale odtud není uvolňován do krve. Reakce vedoucí ke vzniku L-argininu jsou v tubulech ledvin i hepatocytech shodné. V močovinovém cyklu je L-arginin v cytoplazmě hydrolyticky štěpen enzymem arginasou na močovinu a L-ornithin (Stipanuk and Caudill, 2018). Methylargininy vznikají posttranslační modifikací polypeptidového řetězce. Tyto reakce jsou katalyzovány methyltransferasami a lze je rozdělit do dvou skupin. Při reakcích patřících do první skupiny dochází k reverzibilní modifikaci karboxylové skupiny za vzniku methylesterů, při reakcích druhé skupiny dochází k ireverzibilnímu přenosu methyly na atomy síry nebo dusíku (Tran et al., 2003).

## 2.2.1 Biosyntéza methylargininů

Methylací koncové guanidinové skupiny L-argininu za účasti enzymů *N*-methyltransferas z rodiny protein-arginin methyltransferas (PRMT) vznikají methylované deriváty L-argininu (Obr. 3). Existuje více typů PRMT lišících se podle substrátu a produktu reakce.

Působením protein-arginin methyltransferasy typu I (PRMT I, EC 2.1.1.319) vzniká postupnou methylací jednoho z terminálních atomů dusíku guanidinové skupiny v argininových zbytcích nejprve  $N^G$ -monomethyl-L-arginin (monomethylarginin, MMA) a následně  $N^G, N^G$ -dimethyl-L-arginin (asymetrický dimethylarginin, ADMA) (Pope et al., 2009). PRMT I se nachází převážně v endotelu a buňkách hladkého svalstva kardiovaskulárního systému (Aldámiz-Echevarría & Andrade, 2012).



**Obr. 3: Arginin a jeho methylované deriváty.**

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

Asymetrického dimethylargininu je v plazmě přibližně desetkrát více než monomethylargininu, stává se tak důležitým endogenním regulátorem produkce oxidu dusnatého z L-argininu. ADMA je hlavním inhibítozem NO synthasy (Tran et al., 2003; Vallance et al., 1992b).

Symetrický dimethylarginin vzniká rovněž methylací L-argininu za účasti enzymů protein-arginin methyltransferas, ale druhého typu. Protein-arginin methyltransferasa typu II (PRMT II, EC 2.1.1.320) vytváří v prvním kroku methylací jednoho z terminálních atomů dusíku guanidinové skupiny v argininových zbytcích také  $N^G$ -monomethyl-L-arginin, následně v druhém kroku methylací druhého terminálního atomu dusíku vzniká  $N^G, N^{G'}$ -dimethyl-L-arginin (symetrický dimethylarginin, SDMA)

(Pope et al., 2009). Na rozdíl od ADMA však nemá SDMA přímý vliv na aktivitu NO synthasy (Tran et al., 2003; Vallance et al., 1992a).

Methylové skupiny nutné ke vzniku dimethylargininů přenáší obě protein-arginin methyltransferasy z *S*-adenosylmethioninu, který je součástí metabolického cyklu homocysteinu (Aldámiz-Echevarría & Andrade, 2012). PRMT využívají *S*-adenosylmethionin jako donor methylu a generují *S*-adenosylhomocystein a nakonec homocystein jako vedlejší produkt (Arlouskaya et al., 2019).

Protein-arginin methyltransferasy mohou být částečně aktivovány při oxidačním stresu lipoproteiny o nízké hustotě (LDL) a oxidovanými LDL částicemi. Zvýšení aktivity PRMT v endoteliálních buňkách pak vede ke zvýšení produkce methylargininů (Aldámiz-Echevarría & Andrade, 2012).

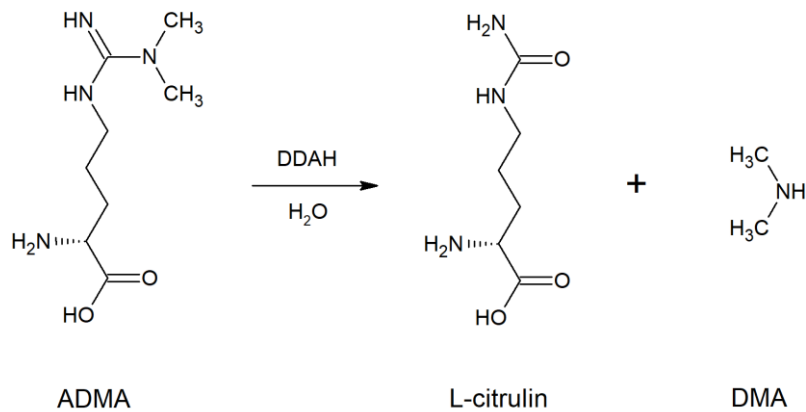
Volné methylované deriváty L-argininu vznikají endogenně hydrolyzou methylovaných proteinů, což umožňuje uvolnění volných methylargininů do cytoplazmy, kde mohou inhibovat NO synthasu (Kielstein & Fliser, 2007; Pope et al., 2009; Tran et al., 2003).

### 2.2.2 Eliminace

Volné methylargininy jsou odstraňovány enzymatickou degradací nebo transportem ven z buňky s následnou exkrecí ledvinami (Teerlink et al., 2009). Většina ADMA je degradována na L-citrulin, SDMA se přednostně vylučuje močí (Krzystek-Korpacka et al., 2019).

Hlavní metabolickou degradací ADMA je hydrolyza, při které vzniká L-citrulin (Obr. 4). Tato reakce je katalyzována enzymem dimethylarginindimethylamino-hydrolasou (DDAH, EC 3.5.3.18). Ta specificky hydrolyzuje ADMA a MMA, ale nevykazuje žádnou aktivitu vůči SDMA (Tran et al., 2003). DDAH metabolizuje  $N^G$ -monomethyl-L-arginin a  $N^G,N^G$ -dimethyl-L-arginin na L-citrulin a dimethylamin (DMA), respektive methylamin (Aldámiz-Echevarría & Andrade, 2012; Pope et al., 2009). K této reakci dochází jak v endoteliálních buňkách, tak v hepatocytech (Trocha et al., 2013).

Asi 80 % ADMA je odstraněno enzymatickou degradací pomocí DDAH, renální exkrece volného ADMA představuje asi 15 % eliminace této sloučeniny (Emrich et al., 2018; Kielstein & Fliser, 2007).



**Obr. 4: Hydrolýza ADMA katalyzovaná DDAH.**

ADMA – asymetrický dimethylarginin, DMA – dimethylamin, DDAH – dimethylarginin-dimethylaminohydrolasa

Jsou známy dvě isoformy DDAH s rozdílnou orgánovou specifitou. DDAH-1 je přítomna převážně ve tkáních, které exprimují neuronální NO syntasu, zatímco DDAH-2 je přítomna ve tkáních, které exprimují endoteliální NOS (Aldámiz-Echevarría & Andrade, 2012; Oliva-Damaso et al., 2019; Pope et al., 2009).

DDAH je klíčový enzym, který reguluje hladiny ADMA ve tkáních a je exprimován převážně v ledvinách, mozku, pankreatu a játrech (Oliva-Damaso et al., 2019). Regulací hladin ADMA v plazmě a tkáních chrání DDAH aktivitu NOS (Kielstein & Fliser, 2007). Aktivita DDAH je klíčovým faktorem určujícím hladinu ADMA *in vivo* (Tran et al., 2003).

Mnoho kardiovaskulárních rizikových faktorů, jako jsou hypertenze, hypercholesterolemie, hyperglykemie a hyperhomocysteinemie, vyvolávají zvýšení oxidačního stresu, čímž mohou snižovat aktivitu DDAH, což vede ke zvýšení koncentrace ADMA (Kielstein & Fliser, 2007; Trocha et al., 2013)

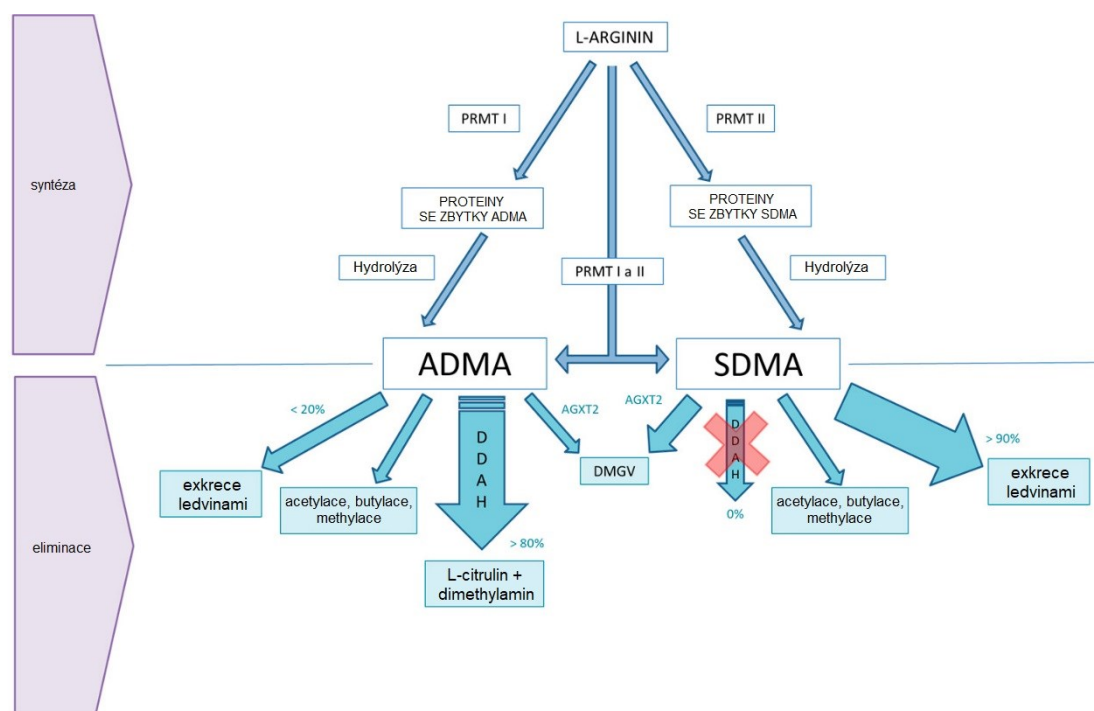
SDMA je eliminován primárně renální exkrecí, nicméně částečně podléhá také metabolické přeměně. Jak ADMA, tak i SDMA mohou být metabolizovány i alternativní cestou (Martens-Lobenhoffer & Bode-Böger, 2015; Rodionov et al., 2016).

ADMA a SDMA mohou být také metabolizovány alternativní cestou transaminací enzymem alaninyglyoxylátaminotransferasou 2 (AGXT2, EC 2.6.1.44) na  $\alpha$ -keto- $\delta$ -(*N,N*-dimethylguanidino)valerovou kyselinu (DMGV). AGXT2 je mitochondriální aminotransferasa, která je primárně exprimována v ledvinách (Emrich et al., 2018; Hu et al., 2017; Oliva-Damaso et al., 2019; Rodionov et al., 2016). Krátkodobé zvýšení systémových hladin ADMA vede k dramatickému zvýšení tvorby DMGV, což naznačuje, že cesta metabolismu ADMA zprostředkovaná AGXT2 není za normálních podmínek

nasycena a může hrát významnou roli v udržování homeostázy ADMA (Rodionov et al., 2014).

Hlavní cestou vylučování SDMA je exkrece ledvinami, přesto je část SDMA také metabolizována pomocí AGXT2 na DMGV (Oliva-Damaso et al., 2019). Na rozdíl od ADMA se však většina SDMA vylučuje v nemetabolizované formě, degradace pomocí AGXT2 proto není považována za nezbytnou pro odstranění SDMA (Emrich et al., 2018).

Jak u ADMA, tak u SDMA může také docházet k *N*-acetylaci  $\alpha$ -aminoskupiny, při které vzniká asymetrický a symetrický *N* $\alpha$ -acetyldimethylarginin (Emrich et al., 2018). K acetylaci dimethylargininů dochází primárně v játrech, ledvinách a tenkém střevě a acetylované dimethylargininy jsou eliminovány ledvinami (Rodionov et al., 2016). Částečně jsou ADMA a SDMA eliminovány butylací a methylací (Oliva-Damaso et al., 2019). Biosyntézu a eliminaci ADMA a SDMA přehledně zachycuje Obr. 5.



**Obr. 5: Schéma syntézy a eliminace ADMA a SDMA.**

ADMA a SDMA vznikají methylací působením PRMT typu I a II. ADMA je metabolizován převážně DDAH na L-citrulin a dimethylamin, částečně je také vylučován močí a metabolizován enzymem AGXT2 na DMGV. SDMA je vylučován převážně ledvinami a částečně je také metabolizován AGXT2. Částečně jsou ADMA a SDMA eliminovány butylací a methylací (Oliva-Damaso et al., 2019).

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin, PRMT – protein-argininmethyltransferasa, DDAH – dimethylarginindimethylaminohydrolasa, AGXT2 – alanin-glyoxylátaminotransferasa, DMGV –  $\alpha$ -keto- $\delta$ -(*N,N*-dimethylguanidino)valerová kyselina

### 2.2.3 Transport přes membránu

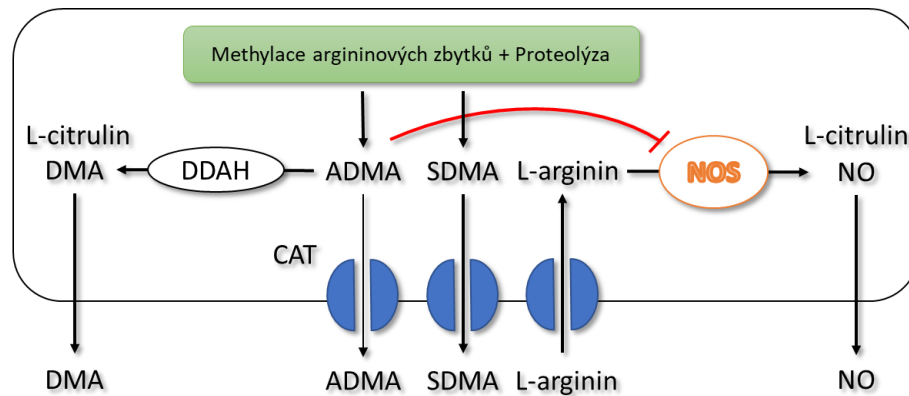
Kritickým aspektem určujícím koncentraci L-argininu, ADMA a SDMA mezi cytosolem a extracelulární tekutinou je přestup přes membránu prostřednictvím transportního systému specifického pro bazické (též kationtové) aminokyseliny, který zajišťují proteiny patřící do rodiny transportérů kationtových aminokyselin (CAT) (Teerlink et al., 2009; Tsikas et al., 2000). CAT v plazmatické membráně umožňují transport cytosolického ADMA a SDMA do oběhu, odkud jsou buď přijímány jinými buňkami či tkáněmi, nebo vylučovány ledvinami (Davids et al., 2012).

Transportéry kationtových aminokyselin jsou široce distribuovány na buněčných membránách buď jako vysokoafinitní a nízkokapacitní transportéry, např. CAT-1, který transportuje L-arginin, ADMA a SDMA přes buněčné membrány v cévách a ledvinách, nebo jako nízkoafinitní a vysokokapacitní transportéry, např. CAT-2A, který transportuje tyto aminokyseliny přes membrány jaterních buněk (Teerlink et al., 2009). Nízká afinita CAT-2A chrání cirkulující L-arginin před absorpcí v játrech a jeho degradací arginásou (Teerlink et al., 2009).

CAT-1 se vyskytuje ve všech tkáních a orgánech kromě jater, varianty CAT-2 se vyskytují mnohem méně. CAT-2A je výrazně exprimován v játrech a slabě v kosterním svalstvu a pankreatu, CAT-2B je indukován prozánětlivými cytokiny v různých tkáních často spolu s inducibilní formou arginasy a NOS. Exprese CAT-3 je omezena hlavně na mozek. Pro transmembránový přenos L-argininu a jeho methylderivátů jsou nejdůležitější transportéry CAT-1, CAT-2A a CAT-2B (Teerlink et al., 2009). L-Arginin je dibazickou aminokyselinou, při neutrálním pH krevní plazmy má pozitivní náboj a je přenášen pomocí CAT-1 a CAT-2B, zatímco methylované deriváty argininu jsou dobře přenášeny prostřednictvím CAT-2B (Hu et al., 2017; Teerlink et al., 2009).

ADMA a SDMA jsou exportovány z místa původu a importovány z plazmy ze vzdálených míst prostřednictvím CAT výměnou za L-arginin a další kationtové aminokyseliny (Obr. 6) (Teerlink et al., 2009; Tsikas et al., 2000).





**Obr. 6: Metabolismus a transport L-argininu, ADMA a SDMA.**

Volný ADMA je z buňky eliminován převážně hydrolyzou katalyzovanou DDAH, při které vzniká L-citrulin a dimethylamin opouštějící buňku. Nezmetabolizovaný ADMA inhibuje NOS a částečně také spolu s SDMA opouští buňku a soutěží s L-argininem o přenos zprostředkovaný CAT (Teerlink et al., 2009).

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin, NOS – NO synthasa, DDAH – dimethylarginindimethylaminohydrolasa, DMA – dimethylamin

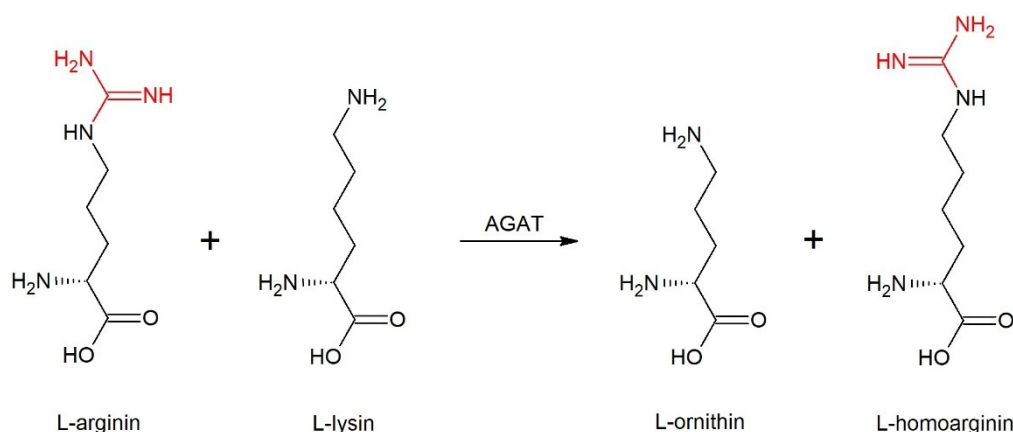
Zvýšená tvorba dimethylargininů, způsobená zvýšenou aktivitou PRMT nebo zvýšenou proteolytickou aktivitou, zvýší intracelulární koncentraci ADMA a SDMA, které jsou pak za předpokladu, že systém transportu prostřednictvím CAT není saturován, exportovány z buňky, čímž se zvýší i jejich extracelulární koncentrace. Podobně snížená rychlost buněčné eliminace ADMA zvýší intracelulární hladiny této sloučeniny. Výsledný účinek na extracelulární koncentraci ADMA však závisí na tom, zda se jedná o sníženou aktivitu DDAH nebo sníženou aktivitu CAT. Snížená exprese nebo inhibice DDAH zvýší intracelulární i extracelulární koncentrace ADMA, naopak snížená exprese nebo aktivita CAT zpomalí buněčný výstup ADMA, čímž zvýší intracelulární, ale sníží extracelulární koncentrace ADMA. Současně vede inhibice CAT k zvýšení intracelulární koncentrace SDMA, zatímco extracelulární koncentrace je snížená (Teerlink et al., 2009).

Vysoká koncentrace intracelulárního ADMA, který není zmetabolizován DDAH, může nejen inhibovat aktivitu NOS, ale také blokovat transport přes CAT a omezit vychytávání L-argininu buňkou, čímž se také podílí na endotelové dysfunkci. Stejně tak může být transport L-argininu do buňky blokován vysokou koncentrací SDMA (Markowski et al., 2007; Teerlink et al., 2009). Snížená schopnost vychytávání L-argininu buňkou lze zvrátit zvýšením exogenního přísunu L-argininu (Tsikas et al., 2000).

## 2.3 L-Homoarginin

L-Homoarginin je neesenciální, neproteinogenní, endogenní aminokyselina, která je syntetizována z L-argininu. L-homoarginin je o jednu methylenovou skupinu delší než L-arginin a může sloužit jako substrát pro NOS, čímž přispívá k syntéze NO (Papageorgiou et al., 2017).

Za syntézu L-homoargininu je zodpovědný enzym arginin:glycin amidinotransferasa (AGAT, EC 2.1.4.1). Tento enzym přenáší amidin z L-argininu na L-glycin za vzniku L-ornithinu a guanidinoacetátu, který je následně methylován na kreatin. AGAT se tak podílí na syntéze energetických metabolitů (Pilz et al., 2015; Tsikas & Wu, 2015). Stejným mechanismem přenáší AGAT amidin z L-argininu na L-lysin za vzniku L-ornithinu a L-homoargininu (Obr. 7) (Tsikas & Wu, 2015).



**Obr. 7: Syntéza L-homoargininu.**

AGAT – arginin:glycin amidinotransferasa

L-Homoarginin konkuruje L-argininu při transportu přes buněčnou membránu zprostředkovaném CAT a trans-stimulací CAT může zvýšit buněčné ztráty L-argininu (Pilz et al., 2015). Na druhou stranu je také kompetitivním inhibítorem enzymu arginasy a má tudíž schopnost zvyšovat intracelulární koncentraci L-argininu (Pilz et al., 2015; van Dyk et al., 2015). L-Homoarginin také soutěží s L-argininem o vazbu do aktivního místa NOS. Zatímco ADMA a MMA jsou kompetitivními inhibitory NOS, L-homoarginin je alternativním, i když méně účinným, substrátem pro tento enzym a může být metabolizován na NO a L-homocitrulin (Pilz et al., 2015; van Dyk et al., 2015).

Nedávné studie naznačují, že L-homoarginin se aktivně účastní vaskulární homeostázy a je považován za nový klíčový faktor v aterogenezi (Papageorgiou et al., 2017). Pokles plazmatické koncentrace L-homoargininu je spojen s řadou rizikových

faktorů aterosklerózy a chronických onemocnění, včetně hypertenze, renálního selhání, hypercholesterolemie, diabetu mellitu a demence (van Dyk et al., 2015).

Na rozdíl od ADMA nebo SDMA jsou nízké koncentrace L-homoargininu v plazmě spojovány s vysokým rizikem morbidity a mortality (Tsikas & Wu, 2015). Několik epidemiologických studií z posledních let označuje nízké plazmatické koncentrace L-homoargininu za nezávislý rizikový faktor kardiovaskulárních, cerebrovaskulárních a renálních onemocnění (Pilz et al., 2015).

## 2.4 L-Argininový paradox

Fyziologická plazmatická koncentrace L-argininu je asi 25× vyšší než Michaelisova konstanta izolované purifikované endoteliální NO synthasy *in vitro* (Böger, 2004; Teerlink et al., 2009). Při fyziologických koncentracích L-argininu by NO synthasa měla být dobře nasycena substrátem a po přidání exogenního L-argininu by neměla být ovlivněna aktivita tohoto enzymu. Nicméně i malé změny v koncentraci L-argininu mohou způsobit viditelnou změnu aktivity NO synthasy. Tento jev byl označen jako L-argininový paradox (Böger, 2004).

Tento paradox lze vysvětlit přítomností endogenních inhibitorů NOS, ADMA a MMA (Tsikas et al., 2000). ADMA je nejsilnější inhibitor endoteliální a neuronální NOS a je klíčovým faktorem v regulaci aktivity NO synthasy (Böger, 2004).

Za fyziologických podmínek je aktivita NOS snížena na zlomek maximální aktivity. Za patologických podmínek pak způsobuje zvýšení intracelulární koncentrace inhibitorů (zejména ADMA) i při normální koncentraci L-argininu snížení poměru substrát/inhibitor a vede k poklesu aktivity NO synthasy a snížení produkce NO (Bode-Böger et al., 2007; Tsikas et al., 2000).

Aktivitu NOS lze stimulovat suplementací L-argininem, což zlepšuje oxidem dusnatým zprostředkované vaskulární funkce *in vivo* (Böger, 2004). Tento jev může být vysvětlen reverzibilní inhibicí eNOS prostřednictvím ADMA. Zvýšení poměru substrát/inhibitor (L-arginin/ADMA) nebo zvýšení exportu ADMA prostřednictvím trans-simulace CAT vede k obnovení aktivity NOS (Teerlink et al., 2009).

Endoteliální NOS a CAT-1 jsou oba umístěny v těsné blízkosti, což zajišťuje účinný přísun extracelulárního L-argininu do eNOS. Je však také možné, že těsná blízkost CAT-1 a eNOS může také poskytnout extracelulárnímu ADMA selektivní přístup k NOS. To by znamenalo, že inhibice NOS závisí spíše na extracelulární než na intracelulární

koncentraci ADMA. Preferenční směřování extracelulárního ADMA do eNOS by také mohlo vysvětlit pozorování, kdy i mírně zvýšená plazmatická koncentrace ADMA může predikovat kardiovaskulární příhody (Teerlink et al., 2009).

Suplementace L-argininu zvyšuje jeho extracelulární koncentraci a vede k výměně intracelulárních inhibitorů s tímto L-argininem a následnému zvýšení koncentrace intracelulárního L-argininu a obnovení fyziologického poměru substrát/inhibitor. Antagonizace L-argininu s kompetitivními inhibitory při současném snížení intracelulárních koncentrací kompetitivních i nekompetitivních inhibitorů způsobuje zvýšení aktivity NOS a zvýšení produkce NO (Tsikas et al., 2000).

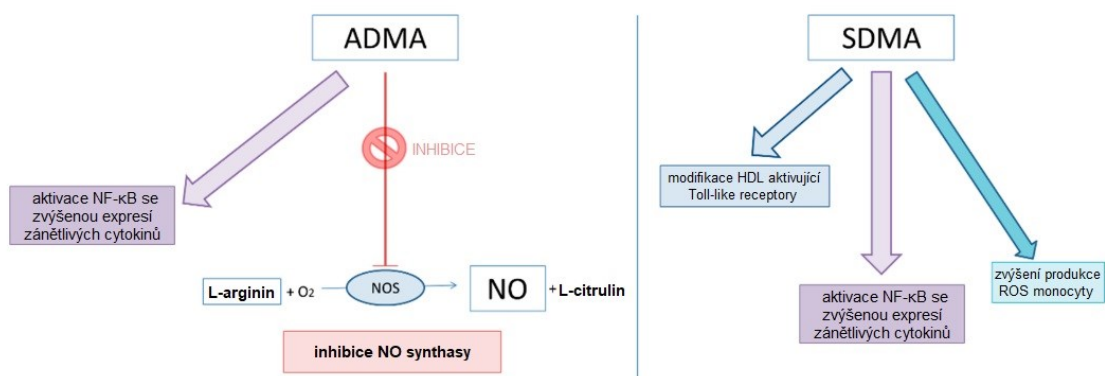
L-argininový paradox naznačuje, že za modulaci aktivity endoteliální NOS jsou zodpovědné extracelulární hladiny L-argininu a ADMA (Bode-Böger et al., 2007).

## 2.5 Klinický význam ADMA a SDMA

ADMA a SDMA jsou aminokyseliny důležité pro sledování metabolismu souvisejícího s oxidem dusnatým. Jejich fyziologická koncentrace v lidské plazmě se pohybuje přibližně okolo hodnot  $0,4 \mu\text{mol l}^{-1}$  u ADMA a  $0,5 \mu\text{mol l}^{-1}$  u SDMA (Martens-Lobenhoffer & Bode-Böger, 2007). Několik studií zjistilo, že plazmatické hladiny těchto aminokyselin s věkem rostou, což může být částečně způsobeno poklesem glomerulární filtrace spojeným se stárnutím (Meinitzer et al., 2007; Oliva-Damaso et al., 2019).

Hlavní patofyziologickou rolí ADMA je schopnost inhibovat NO syntázu produkující oxid dusnatý, molekulu odpovědnou za cévní homeostázu. SDMA je z organismu odstraňován téměř výlučně renální exkrecí, je proto velmi vhodným ukazatelem pro hodnocení funkce ledvin, lepším, než je výpočet odhadu rychlosti glomerulární filtrace z koncentrace sérového kreatininu (Oliva-Damaso et al., 2019).

Extracelulární koncentrace ADMA je 5–10× nižší než intracelulární, k výrazným změnám intracelulární koncentrace ADMA proto dostačují i nepatrné změny jeho koncentrace v plazmě. Za patofyziologických podmínek může být produkce NO inhibována o 30–70 % (Aldámiz-Echevarría & Andrade, 2012). ADMA i SDMA jsou kompetitivními inhibitory transportu L-argininu do buňky a aktivují také nukleární faktor kappa B (NF- $\kappa$ B), což souvisí se zvýšenou expresí zánětlivých cytokinů. SDMA zvyšuje produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) v endoteliálních buňkách a monocytech (Chen et al., 2012; Oliva-Damaso et al., 2019; Schepers et al., 2011). Přehled hlavních biologických účinků ADMA a SDMA schematicky znázorňuje Obr. 8.



**Obr. 8: Hlavní biologické účinky ADMA a SDMA.**

Nejdůležitějším biologickým účinkem ADMA je inhibice synthasy oxidu dusnatého, spolu s SDMA také indukuje aktivaci NF-κB se zvýšenou expresí zánětlivých cytokinů. SDMA zvyšuje produkci monocytových ROS a modifikuje HDL aktivující Toll-like receptory (Oliva-Damaso et al., 2019).

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin, NOS – NO synthasa, NF-κB – nukleární faktor kappa B, ROS – reaktivní formy kyslíku

Dimethylargininy ADMA a SDMA jsou spojovány hlavně s kardiovaskulárními chorobami a chronickým onemocněním ledvin (Oliva-Damaso et al., 2019). Endotelová dysfunkce souvisí s aterosklerózou, kardiovaskulárními příhodami a mortalitou u pacientů s chronickým renálním onemocněním (CKD). Zánětlivý proces je schopen zesílit účinek ADMA u pacientů s CKD a zvyšuje riziko úmrtí a kardiovaskulárních příhod u pacientů s vysokými hladinami ADMA. U pacientů s diabetem mellitem 2. typu byla pozorována interakce mezi C-reaktivním proteinem a ADMA, která rovněž souvisela s kardiovaskulárními příhodami (Oliva-Damaso et al., 2019).

### 2.5.1 ADMA a SDMA u kardiovaskulárních onemocnění

Zdá se, že existuje silná souvislost mezi ADMA a kardiovaskulárními onemocněními. Plazmatická koncentrace ADMA je spojována s rizikem a mortalitou na kardiovaskulární onemocnění. Má vysokou prevalenci u onemocnění spojených s endotelovou dysfunkcí, zahrnujících hypertenzi, hyperlipidemii, hypercholesterolemii, hyperhomocysteinemii, diabetes mellitus, preeklampsii, ischemickou chorobu srdeční (ICHS), chronické srdeční selhání, erektilní dysfunkci a další, u kterých bylo zjištěno, že koncentrace plazmatického L-argininu je v normě (Bode-Böger et al., 2007; Böger & Ron, 2005; Pope et al., 2009; Tsikas et al., 2000). Studie u pacientů s CKD a v běžné populaci ukázaly silnou souvislost mezi ADMA, mortalitou a kardiovaskulárními příhodami (Oliva-Damaso et al., 2019)

U stavů spojených s endotelovou dysfunkcí je pozorována snížená aktivita nebo exprese DDAH, enzymu zodpovědného za degradaci ADMA, což vede ke zvýšení koncentrace ADMA s následnou inhibicí NOS (Pope et al., 2009). DDAH může být inhibována hyperhomocysteinemií, hyperglykemií, erytropoetinem a oxidačním stresem (Chen et al., 2012; Kielstein and Fliser, 2007; Lai & Kan, 2015).

U pacientů s ICHS byly zjištěny významně vyšší hladiny ADMA a SDMA (Bode-Böger et al., 2006). Koncentrace ADMA koreluje s rozsahem a závažností koronární aterosklerózy a je silným ukazatelem kardiovaskulárních příhod a nezávislým rizikovým faktorem ICHS a mortality u pacientů s ICHS (Bode-Böger et al., 2006; Pope et al., 2009). Pacienti s vyššími plazmatickými hladinami SDMA mají vyšší riziko úmrtí z různých příčin (Oliva-Damaso et al., 2019).

Zvýšenou koncentraci ADMA lze nalézt také u pacientů s hypercholesterolemií, přičemž koncentrace SDMA zůstává nezměněna. Tento nárůst plazmatické koncentrace ADMA vede ke snížení poměru L-arginin/ADMA. Byla také nalezena pozitivní korelace mezi celkovým a LDL-cholesterolem a ADMA (Böger et al., 1998).

Oxid dusnatý hraje důležitou roli v regulaci cévního tonu a krevního tlaku. Podíl ADMA na patogenezi hypertenze by mohly vysvětlit dva možné mechanismy – ADMA na jedné straně prostřednictvím inhibice eNOS vyvolává vazokonstrikci, na straně druhé může inhibovat renální vylučování sodíku snížením renální syntézy NO (Oliva-Damaso et al., 2019).

### **2.5.2 ADMA a SDMA u renálních onemocnění**

U pacientů s mírným až středně těžkým chronickým renálním selháním nalézáme zvýšené koncentrace ADMA a SDMA ve srovnání s jedinci bez CKD. Tento nárůst je ještě výraznější u pacientů v terminálním stadiu onemocnění ledvin (Emrich et al., 2018).

Při renálním selhání je vylučování ADMA i SDMA sníženo a dochází ke zvýšení jejich plazmatické koncentrace, a to u SDMA více než u ADMA, který je degradován prostřednictvím DDAH. To je důvodem snížení poměru L-arginin/ADMA a inhibice NOS, což může mimo jiné vést k vazokonstrikci, hypertenzi, zvýšené aterogenezi a imunitní dysfunkci (Aldámiz-Echevarría & Andrade, 2012; Fleck et al., 2003; Oliva-Damaso et al., 2019; Tran et al., 2003). Oner-Iyidogan et al. (2009) uvádí ve své práci nárůst koncentrací ADMA a SDMA u CKD (Tab. 1).

**Tab. 1: Změny koncentrací ADMA a SDMA u CKD.**

	ADMA ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	SDMA ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	L-arginin/ADMA	ADMA/SDMA
Pacienti s hemodialýzou	0,76 ( $\pm 0,04$ )	2,15 ( $\pm 0,10$ )	90,9 ( $\pm 7,9$ )	0,39 ( $\pm 0,002$ )
Pacienti v časném stádiu CKD	0,57 ( $\pm 0,02$ )	1,02 ( $\pm 0,07$ )	169 ( $\pm 1,2$ )	0,68 ( $\pm 0,006$ )
Kontrolní skupina zdravých jedinců	0,44 ( $\pm 0,01$ )	0,29 ( $\pm 0,01$ )	175 ( $\pm 8,4$ )	1,58 ( $\pm 0,006$ )

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

Zvýšená koncentrace ADMA je také spojována s dalšími kardiovaskulárními rizikovými faktory, jako je zvýšení plazmatické koncentrace LDL-cholesterolu, triacylglycerolů, glukózy, homocysteinu a mediátorů zánětu (Oliva-Damaso et al., 2019). SDMA u pacientů s CKD ve srovnání s ADMA významněji koreluje s hladinami interleukinu 6 a tumor-nekrotizujícího faktoru alfa a také modifikuje lipoproteiny o vysoké hustotě (HDL), což vede k poškození endotelu (Oliva-Damaso et al., 2019; Oner-Iyidogan et al., 2009). U pacientů se zvýšenou plazmatickou koncentrací ADMA a SDMA je vyšší riziko progresu CKD a výskytu aterosklerotických komplikací, které jsou hlavní příčinou morbidity a mortality u těchto pacientů (Busch et al., 2006; Emrich et al., 2018). Jelikož SDMA není degradován prostřednictvím DDAH a vylučuje se hlavně močí, je vynikajícím ukazatelem funkce ledvin. SDMA je časný indikátor změn glomerulární filtrace a velmi dobře koreluje s ostatními indikátory funkce ledvin. Plazmatická koncentrace SDMA vzrůstá paralelně s koncentrací kreatininu a je citlivějším ukazatelem renálního poškození než sám kreatinin (Kielstein et al., 2011).

Vysoké hladiny SDMA také hrají důležitou roli v progresi do konečného stádia CKD a SDMA by tak mohl dobře předpovídat progresi CKD a aterosklerotické kardiovaskulární příhody (Oliva-Damaso et al., 2019).

### 3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo zavedení a optimalizace metody pro stanovení L-argininu a jeho dimethylovaných derivátů, asymetrického dimethylargininu a symetrického dimethylargininu, pomocí ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií pro použití u reálných klinických vzorků a následná validace zavedené metody. Dalším krokem bylo porovnání zavedené metody s metodou ELISA a metodou HPLC s fluorescenční detekcí. Poslední částí práce bylo stanovení ADMA a SDMA u kontrolní skupiny zdravé populace a její porovnání se skupinou pacientů s chronickým renálním onemocněním.



## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Chemikálie a použitý materiál

#### 4.1.1 Chemikálie

L-Arginin hydrochlorid,  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),

$N^G, N^G$ -dimethyl-L-arginin dihydrochlorid (ADMA),  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),

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

L-arginin- $^{13}C_6$  hydrochlorid,  $\geq 95\%$ , 99 atom %  $^{13}C$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),

$N^G, N^G$ -dimethyl-L-arginin- $d_6$  dihydrochlorid,  $\geq 95\%$ , 98 atom % D (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),

$N^G, N^{G'}$ -dimethyl-L-arginin- $d_6$ ,  $\geq 95\%$ , 98 atom % D (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA),

$N^G$ -methyl-L-arginin acetát (MMA),  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),

methanol pro LC-MS,  $\geq 99.9\%$  (Avantor, Radnor, PA, USA),

acetonitril pro LC-MS,  $\geq 99.9\%$  (Honeywell, Charlotte, NC, USA),

kyselina octová pro LC-MS, 100% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),

octan amonný pro LC-MS,  $\geq 99.0\%$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),

derivatizační činidlo HCl – 1-butanol 3 mol  $l^{-1}$  pro LC-MS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),

*ortho*-ftaldialdehyd p.a. (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),

3-merkaptopropionová kyselina  $\geq 99\%$  (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),

acetonitril pro HPLC (VWR International, Radnor, PA, USA),

methanol p.a. (VWR International, Radnor, PA, USA),

hydrogenfosforečnan draselný trihydrát p.a. (VWR International, Radnor, PA, USA),

dihydrogenfosforečnan draselný bezvodý pro HPLC (VWR International, Radnor, PA, USA),

hydrogenfosforečnan sodný dodekahydrát p.a. (Penta, Chrudim, ČR),

dihydrogenfosforečnan sodný dihydrát p.a. (Penta, Chrudim, ČR),

kyselina chlorovodíková 35% p.a. (Penta, Chrudim, ČR),

hydroxid sodný p.a. (Dr. Kulich Pharma, Hradec Králové, ČR),

amoniak vodný roztok (min. 25%) p.a. (Lachema, Brno, ČR),

chlorid sodný p.a. (Lachema, Brno, ČR),  
chlorid draselný p.a. (Lachema, Brno, ČR),  
kyselina boritá p.a. (Lach-Ner, Neratovice, ČR).

#### **4.1.2 Použitý materiál a soupravy**

Chromatografická kolona Kinetex 2,6  $\mu\text{m}$  C18 100A HPLC Column 50  $\times$  2,1 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA),  
ochranné předkolony SecurityGuard ULTRA, UHPLC C18 2,1 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA),  
nylonové stříkačkové filtry Chromafil Xtra A-20/13, 0,2  $\mu\text{m}$  (Macherey-Nagel, Düren, Německo),  
nylonové stříkačkové filtry Syringe filter Nylon, 0,2  $\mu\text{m}$  (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA),  
SPE kolonky Oasis MCX 1 ml (30 mg) Extraction Cartridges (Waters Corp., Milford, MA, USA),  
chromatografická kolona ACE Equivalence 5  $\mu\text{m}$  C18 Column, 150  $\times$  4,6 mm (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Scotland, UK),  
ochranná předkolona ACE Equivalence 5 C18 Guard Cartridges (Advanced Chromatography Technologies, Aberdeen, Scotland, UK),  
nylonové filtry Nylon filter membranes 0,45  $\mu\text{m}$ , 47 mm (Supelco, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),  
ADMA ELISA kit (DLD Diagnostika, Hamburg, Německo),  
SDMA ELISA kit (DLD Diagnostika, Hamburg, Německo).

#### **4.1.3 Přístroje**

Kapalinový chromatograf Dionex UltiMate 3000 UHPLC – Standard: LPG-3400SD kvarterní čerpadlo s gradientem 0,001–10 ml/min, 620 bar; ACC-3000(T) termostatovaný autosampler se zabudovaným termostatem kolon, objem nástřiku 1–100  $\mu\text{l}$ , kapacita 120 vialek 2 ml (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA),  
hmotnostní spektrometr amaZon SL (Bruker, Billerica, MA, USA),  
dusíkový generátor GENIUS NM32LA (Peak Scientific Instruments, Inchinnan, UK),

koncentrátor LabEva Model NDK200-2N pro zakoncentrování vzorků jejich ohřevem a odfoukáváním rozpouštědla proudem inertního plynu (Hangzhou MIU Instruments, Hangzhou, Zhejiang, Čína),

system pro přípravu ultra-čisté vody Smart2Pure 6 UV-UF, 0,055  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA),

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

automatický analyzátor na zpracování mikrotitračních destiček NexGen Four (Adaltis, Guidonia di Montecelio, Itálie).

#### **4.1.4 Software**

Data Analysis 4.2 (Bruker, Billerica, MA, USA),

HyStar 3.2 (Bruker, Billerica, MA, USA),

Chromeleon 6.80 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA),

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

MedCalc 17.7.2 (MedCalc Software, Ostend, Belgie),

MS Excel 2019 (Microsoft Corp., Redmond, WA, USA),

OpenLAB Software 2.1 SP1 for the NexGen (Adaltis, Guidonia di Montecelio, Itálie),

Quant Analysis 2.2 (Bruker, Billerica, MA, USA),

R 3.2.0 (Ross Ihaka & Robert Gentleman, Department of Statistics of the University of Auckland, Auckland, Nový Zéland),

trapControl 7.2 (Bruker, Billerica, MA, USA).

#### **4.1.5 Ostatní materiál a pomůcky**

Stlačený plynný dusík 4.0, stlačené plynné helium 5.0, ultrazvuková lázeň, vodní lázeň, orbitální třepačka, injekční stříkačky, injekční jehly, skleněné vialky, filtrační systém na filtraci roztoků pro chromatografii, vakuový SPE manifold, vakuová pumpa.

## 4.2 Příprava roztoků

### 4.2.1 Zásobní roztok octanu amonného

Zásobní roztok octanu amonného byl připraven o koncentraci  $50 \text{ mmol l}^{-1}$  a uchováván v chladničce při  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 4.2.2 Mobilní fáze

Mobilní fáze A se skládala z 0,1% kyseliny octové v methanolu. Byla připravena přidáním 500  $\mu\text{l}$  kyseliny octové do methanolu a doplněním methanolu do objemu 500 ml. Připravená mobilní fáze byla odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 20 minut.

Mobilní fáze B se skládala z  $5 \text{ mmol l}^{-1}$  octanu amonného a 0,1% kyseliny octové ve vodě, pH 4,3. Byla připravena z 50 ml zásobního roztoku octanu amonného  $50 \text{ mmol l}^{-1}$ , 500  $\mu\text{l}$  kyseliny octové a doplněna ultračistou vodou do objemu 500 ml. Připravená mobilní fáze byla odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 20 minut.

### 4.2.3 Standardy

Zásobní standardní roztoky L-argininu, ADMA a SDMA byly připraveny o koncentraci  $1 \text{ mmol l}^{-1}$ , rozděleny do mikrozkušavek a zamrazeny na  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Směsný standardní roztok byl připraven z jednotlivých zásobních standardních roztoků naředěním ultračistou vodou na koncentraci  $320,0 \mu\text{mol l}^{-1}$  pro L-arginin a  $6,4 \mu\text{mol l}^{-1}$  pro ADMA a SDMA.

Jednotlivé kalibrační roztoky byly připraveny naředěním směsného standardního roztoku ultračistou vodou na konečné koncentrace L-argininu v rozmezí  $10,0\text{--}320,0 \mu\text{mol l}^{-1}$  a ADMA a SDMA v rozmezí  $0,2\text{--}6,4 \mu\text{mol l}^{-1}$ .

### 4.2.4 Interní standardy

Jako interní standardy (IS) byly použity stabilní izotopy jednotlivých stanovovaných analytů: L-arginin- $^{13}\text{C}_6$ , ADMA- $\text{d}_6$  a SDMA- $\text{d}_6$ . Byly připraveny rozpuštěním obsahu lahvičky v 1 ml ultračisté vody za vzniku roztoků o koncentraci  $462,0 \text{ mmol l}^{-1}$  L-argininu- $^{13}\text{C}_6$ ,  $3,56 \text{ mmol l}^{-1}$  ADMA- $\text{d}_6$  a  $4,80 \text{ mmol l}^{-1}$  SDMA- $\text{d}_6$ . Vzniklé roztoky zásobních IS byly rozděleny do alikvotů v mikrozkušavkách a uchovány při  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Z těchto zásobních roztoků byly připraveny ředěné roztoky (L-arginin 500 $\times$ , ADMA a SDMA 300 $\times$ ) pro přípravu směsného roztoku IS.

Směsný roztok interních standardů obsahuje po 1 dílu každého z ředěných roztoků IS a 1 díl ultračisté vody. Výsledná koncentrace je pro L-arginin- $^{13}\text{C}_6$  231,0  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , ADMA- $\text{d}_6$  2,97  $\mu\text{mol l}^{-1}$  a SDMA- $\text{d}_6$  4,0  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Alikvoty po 1 ml byly uchovávány v mikrozkušnicích při  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.5 Roztoky pro HPLC-FL

0,5 mol  $\text{l}^{-1}$  K-fosfátový pufr, pH 6,5: Pufr byl připraven ze dvou zásobních roztoků: A – 0,5 mol  $\text{l}^{-1}$  hydrogenfosforečnan draselný, B – 0,5 mol  $\text{l}^{-1}$  dihydrogenfosforečnan draselný. Zásobní roztok A byl připraven rozpuštěním 57,05 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  v 500 ml deionizované vody, zásobní roztok B rozpuštěním 68 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  v 1 000 ml deionizované vody. Pracovní roztok pufru se skládá z 33 ml zásobního roztoku A a 67 ml zásobního roztoku B. Připravený pufr byl uchováván v chladničce.

0,1 mol  $\text{l}^{-1}$  Na-fosfátový pufr, pH 7,0: Pufr byl připraven ze dvou zásobních roztoků: A – 0,2 mol  $\text{l}^{-1}$  hydrogenfosforečnan sodný, B – 0,2 mol  $\text{l}^{-1}$  dihydrogenfosforečnan sodný. Zásobní roztok A byl připraven rozpuštěním 7,16 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  ve 100 ml deionizované vody, zásobní roztok B rozpuštěním 3,12 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  v 100 ml deionizované vody. Pracovní roztok pufru se skládá z 30,5 ml zásobního roztoku A a 19,5 ml zásobního roztoku B doplněných do 100 ml deionizovanou vodou. Připravený pufr byl uchováván v chladničce.

0,2 mol  $\text{l}^{-1}$  borátový pufr, pH 9,5: Pufr byl připraven ze dvou zásobních roztoků: A – 0,2 mol  $\text{l}^{-1}$  kyselina boritá + 0,2 mol  $\text{l}^{-1}$  chlorid draselný, B – 0,2 mol  $\text{l}^{-1}$  hydroxid sodný. Zásobní roztok A byl připraven rozpuštěním 1,237 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$  a 1,491 g  $\text{KCl}$  ve 100 ml deionizované vody, zásobní roztok B rozpuštěním 0,8 g  $\text{NaOH}$  ve 100 ml deionizované vody. Pracovní roztok pufru obsahuje 50 ml zásobního roztoku A a 30 ml zásobního roztoku B. Připravený pufr byl uchováván v chladničce.

Mobilní fáze A se skládá z 50 mmol  $\text{l}^{-1}$  K-fosfátového pufru pH 6,5 s 8,7 % acetonitrilu (ACN): Byla připravena ze 100 ml 0,5 mol  $\text{l}^{-1}$  K-fosfátového pufru pH 6,5 a 87 ml ACN doplněných deionizovanou vodou na 1 000 ml. Připravená mobilní fáze byla vakuově filtrována přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$  a odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 20 minut.

Mobilní fáze B se skládá z ACN a deionizované vody v poměru 50:50 (v/v). Připravená mobilní fáze byla vakuově filtrována přes nylonový filtr o velikosti pórů 0,45  $\mu\text{m}$  a odplyněna v ultrazvukové lázni po dobu 20 minut.

Fyziologický roztok pufrovaný fosfátem (PBS) pH 7,0 se skládal z 10 mmol l<sup>-1</sup> Na-fosfátového pufru pH 7,0 a 140 mmol l<sup>-1</sup> chloridu sodného. Byl připraven z 50 ml 0,1 mol l<sup>-1</sup> Na-fosfátového pufru pH 7,0, ve kterém se rozpustilo 4,09 g NaCl, a doplněn deionizovanou vodou do 500 ml. Připravený PBS pufr byl uchováván v chladničce.

Eluční činidlo se skládalo z amoniaku, deionizované vody a methanolu v poměru 10:40:50 (v/v/v) s přídatkem 0,5 ml 1 mol l<sup>-1</sup> NaOH na 100 ml elučního činidla. Připravené eluční činidlo bylo uchováváno v chladničce.

Derivatizační činidlo OPA/MPA se skládalo z *ortho*-ftaldialdehydu a 3-merkaptopropionové kyseliny. Navážka 0,05 g *ortho*-ftaldialdehydu byla rozpuštěna v 1 ml methanolu, doplněna 9 ml 0,2 mol l<sup>-1</sup> borátového pufru pH 9,5 a bylo přidáno 50 µl kyseliny 3-merkaptopropionové. Alikvoty derivatizačního činidla OPA/MPA v mikrozkušavkách byly uchovávány při -80 °C.

### 4.3 Biologické vzorky

Vzorky venózní krve byly odebrány do zkumavek s heparinátem lithným a separačním gelem nebo zkumavek s akcelerátorem srážení a separačním gelem. Plazma nebo sérum byly získány centrifugací při 2 170× g po dobu 8 minut při 4 °C a rozděleny do alikvotů v mikrozkušavkách, které byly uchovány až do analýzy při -80 °C.

Klinické vzorky byly získány od jedinců s různým stupněm chronického renálního onemocnění (CKD) včetně stádia 5 s hemodialýzou. Celkem bylo do studie zařazeno 19 žen ve věku 34–83 let (medián 67 let) a 21 mužů ve věku 54–85 let (medián 66 let). Pro určení referenčních mezí byly použity vzorky od 40 dobrovolníků, dárců krve, 20 žen a 20 mužů ve věku 41–67 let (medián 47 let). Pro porovnání vzorků séra a plazmy byly použity vzorky od heterogenní skupiny celkem 27 jedinců s různými diagnózami i jedinců zdravých. Pro porovnání metod byly použity vzorky jak z kontrolní skupiny zdravých dobrovolníků, tak ze skupiny pacientů s CKD.

#### 4.3.1 Kontrolní vzorky

Pro kontrolu kvality (QC) byla použita směsná plazma od 11 dobrovolníků, 5 mužů a 6 žen ve věku 26–70 let. Plazma od všech dobrovolníků byla homogenizována a rozdělena na třetiny, z nichž byly připraveny kontrolní vzorky se 3 hladinami koncentrací sledovaných analytů, nízkou (QC-L), střední (QC-M) a vysokou (QC-H).

Do směsné plazmy pro kontrolní vzorky QC-M a QC-H byl přidán standardní přírůdek jednotlivých analytů o známé koncentraci. Do směsné plazmy pro kontrolní vzorek QC-L byl přidán přírůdek stejného objemu jako u ostatních kontrolních vzorků, ale s nulovou koncentrací daných analytů. Koncentrace přírůdků v kontrolních vzorcích ukazuje Tab. 2.

**Tab. 2: Přírůdky standardů v kontrolních vzorcích.**

	Přírůdek ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )		
	L-arginin	ADMA	SDMA
QC-L	0	0	0
QC-M	50	0,8	1,5
QC-H	100	1,5	3,0

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin, QC-L – kontrolní vzorek s nízkou hladinou koncentrací sledovaných analytů, QC-M – kontrolní vzorek se střední hladinou koncentrací sledovaných analytů, QC-H – kontrolní vzorek s vysokou hladinou koncentrací sledovaných analytů

Všechny kontrolní vzorky byly rozděleny do alikvotů v mikrozkuvkách a uchovávány při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  do analýzy.

#### 4.4 Stanovení argininu a jeho dimethylderivátů metodou LC-MS/MS

Arginin a jeho dimethylované deriváty ADMA a SDMA byly stanoveny metodou ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS) po derivatizaci vzorků 1-butanolem.

##### 4.4.1 Příprava vzorku

Úprava vzorků před vlastní derivatizací zahrnovala přírůdek interního standardu, deproteinaci a odpaření rozpouštědla.

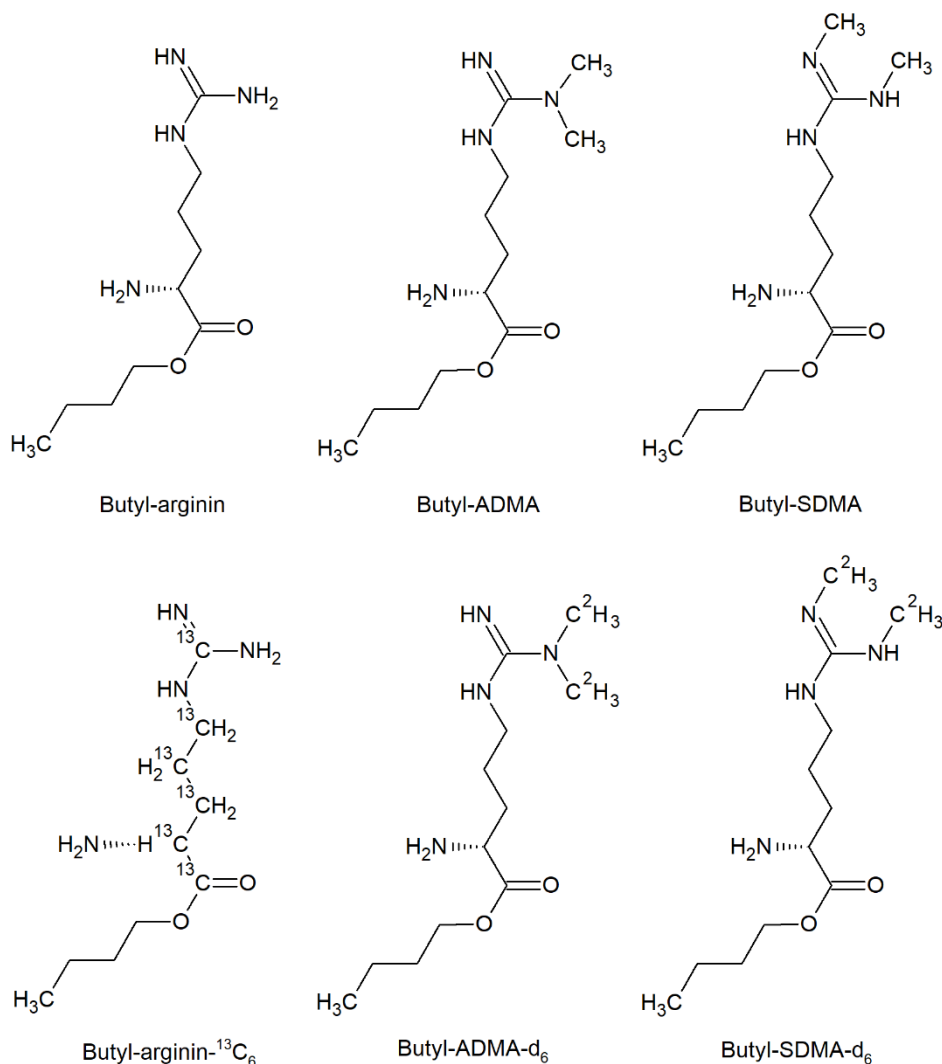
Ke 160  $\mu\text{l}$  plazmy, séra nebo roztoku kalibrátoru v mikrozkuvkách bylo přidáno 40  $\mu\text{l}$  směsného roztoku interních standardů. Koncentrace IS v jednotlivých kalibrátorech a vzorcích byla 46,2  $\mu\text{mol l}^{-1}$  L-argininu- $^{13}\text{C}_6$ , 0,59  $\mu\text{mol l}^{-1}$  ADMA- $\text{d}_6$  a 0,80  $\mu\text{mol l}^{-1}$  SDMA- $\text{d}_6$ .

Následovalo přidání 600  $\mu\text{l}$  acetonitrilu kvůli precipitaci proteinů. Mikrozkuvky byly po dobu 2 minut důkladně promíchávány na třepače a centrifugovány při 10 000 $\times$  g 10 minut při pokojové teplotě.

Supernatant získaný po centrifugaci byl přenesen do nových mikrozkuvek a odpařen odfoukáváním proudem dusíku při teplotě 60 °C dosucha.

#### 4.4.2 Derivatizace

K odparkům vzorků a kalibrátorů v mikrozkuvkách bylo přidáno 500  $\mu$ l derivatizačního činidla HCl – 1-butanolu. Po rozpuštění odparku intenzivním promícháním po dobu 2 minut na třepače byly mikrozkuvky umístěny do vodní lázně o teplotě 70 °C na dobu 20 minut. Po ochlazení na laboratorní teplotu bylo derivatizační činidlo odfoukáváním proudem dusíku při teplotě 60 °C odpařeno dosucha. Vzorce butylesterů sledovaných analytů a jejich interních standardů jsou uvedeny na Obr. 9.



**Obr. 9: Butylestery sledovaných analytů a jejich interních standardů.**

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

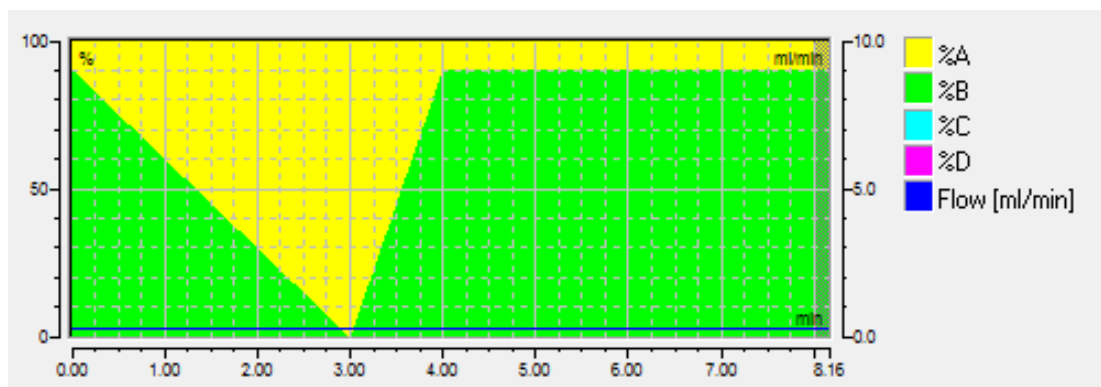


Získaný odparek derivatizovaných vzorků se rozpustil v 1 ml iniciační mobilní fáze (10 % mobilní fáze A, 90 % mobilní fáze B). Po důkladném promíchání po dobu 10 minut na třepače byly vzorky filtrovány přes nylonové stříkačkové filtry o velikosti pórů 0,2 μm do vialek.

#### 4.4.3 Chromatografická separace

K chromatografickému dělení na kapalinovém chromatografu Dionex UltiMate 3000 UHPLC – Standard byla použita chromatografická kolona Kinetex HPLC Column s C18 sorbentem s povrchově porézními částicemi s velikostí částic 2,6 μm a velikostí pórů 10 nm, s krytými volnými silanolovými skupinami trimethylsilanem, o délce 50 mm a průměru 2,1 mm s ochrannou předkolonou SecurityGuard ULTRA UHPLC s C18 sorbentem, průměru 2,1 mm.

Eluce byla gradientová. Složení mobilní fáze v počáteční fázi eluce bylo 10 % A a 90 % B s lineárním gradientem do 100 % A a 0 % B ve 3. minutě. Následoval minutový úsek pro návrat poměru mobilní fáze k počátečním hodnotám, tedy 10 % A a 90 % B, a fáze ekvilibrace kolony po dobu 4 minut (Obr. 10). Průtok mobilní fáze byl po celou dobu eluce 0,25 ml/min a celková doba separace trvala 8 minut (Tab. 3).



Obr. 10: LC gradient.

Tab. 3: Podmínky gradientové eluce.

Čas (min)	Průtok (ml/min)	Mobilní fáze A (%)	Mobilní fáze B (%)
0,00	0,250	10	90
3,00	0,250	100	0
4,00	0,250	10	90
8,00	0,250	10	90

Autosampler byl vybaven termostatovaným prostorem se třemi sektory pro vialky a smyčkou o objemu 20  $\mu$ l. Nástřik vzorku na kolonu byl 20  $\mu$ l, injekční mód Full-Loop. Následovalo promytí smyčky a vzorkové jehly autosampleru mobilní fází B.

Prostor pro vzorky autosampleru byl chlazen na 6 °C, teplota kolonového prostoru byla 20 °C. Všechny vzorky, kalibrátory a kontrolní vzorky byly měřeny v duplikátu.

#### 4.4.4 Hmotnostní detekce

Pro hmotnostní detekci byl použit hmotnostní spektrometr amaZon SL s iontovou pastí a iontovým zdrojem Apollo pro ionizaci elektrosprejem (ESI).

Analyty byly ionizovány za vzniku  $[M+H]^+$  iontů. Jako nebulizační a desolvatační plyn byl použit dusík. Tlak nebulizačního plynu byl 7,3 psi, průtok sušícího plynu 4,0 l/min a teplota 200 °C. Ionty byly sledovány v pozitivním módu. Napětí na vstupu kapiláry bylo -5 kV, napětí na koncové elektrodě -500 V.

Iontová past měla skenovací mód nastaven na rozšířené skenování a zapnuté řízení iontového náboje (ICC) s cílovou hodnotu 100 000, maximální akumulací čas v pasti byl 200,00 ms a skenované hmoty v rozmezí 50–500 m/z. Pracovní mód byl nastaven na rychlou chromatografii s rychlostí skenování 8 100 m/z za sekundu.

V programu pro ovládání iontové pasti trapControl byly vytvořeny tři segmenty. Segment 1 neměl pro detekci analytů význam, sloužil pro odvedení mobilní fáze do odpadu místo iontového zdroje, segment 2 byl určen pro detekci L-argininu a L-argininu- $^{13}\text{C}_6$ , segment 3 pak pro detekci ADMA, SDMA, ADMA- $\text{d}_6$  a SDMA- $\text{d}_6$ . První segment byl aplikován do 30. sekundy, druhý mezi 30. až 95. sekundou a třetí od 95. sekundy do konce analýzy. Program umožňoval nastavení parametrů pro jednotlivé segmenty zvlášť.

Iontová past byla nastavena v módu dvoustupňové tandemové hmotnostní spektrometrie ( $\text{MS}^2$ ). Pro kvantifikaci všech sledovaných analytů bylo použito metody monitorování více reakcí (MRM) umožňující detekci více fragmentových iontů z jednoho nebo více prekurzorových iontů. Prekurzorové  $[M+H]^+$  ionty L-argininu, L-argininu- $^{13}\text{C}_6$ , ADMA, SDMA, ADMA- $\text{d}_6$  a SDMA- $\text{d}_6$  byly podrobeny fragmentací pomocí kolizí vyvolané disociace (CID). Jako kolizní plyn bylo použito helium  $3,50 \cdot 10^{-6}$  mbar. Fragmentační amplitudové napětí bylo 0,45 V pro všechny prekurzorové ionty s počáteční amplitudou 60 % a konečnou amplitudou 180 %, fragmentační čas byl 20 ms. Hodnota cut-off pro fragmentové ionty byla 27 % m/z prekurzorového iontu.

Cílová hmota byla v segmentu 2 nastavena na hodnotu 235 m/z a v segmentu 3 na hodnotu 260 m/z. Sledované přechody hmoty byly v segmentu 2 pro L-arginin 231→214 m/z a L-arginin-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> 237→220 m/z a v segmentu 3 pro ADMA 259→214 m/z, SDMA 259→228 m/z, ADMA-d<sub>6</sub> 265→214 m/z a SDMA-d<sub>6</sub> 265→231 m/z. Parametry fragmentace a místa štěpení sledovaných molekul jsou shrnuty v Tab. 4 a na Obr. 11.

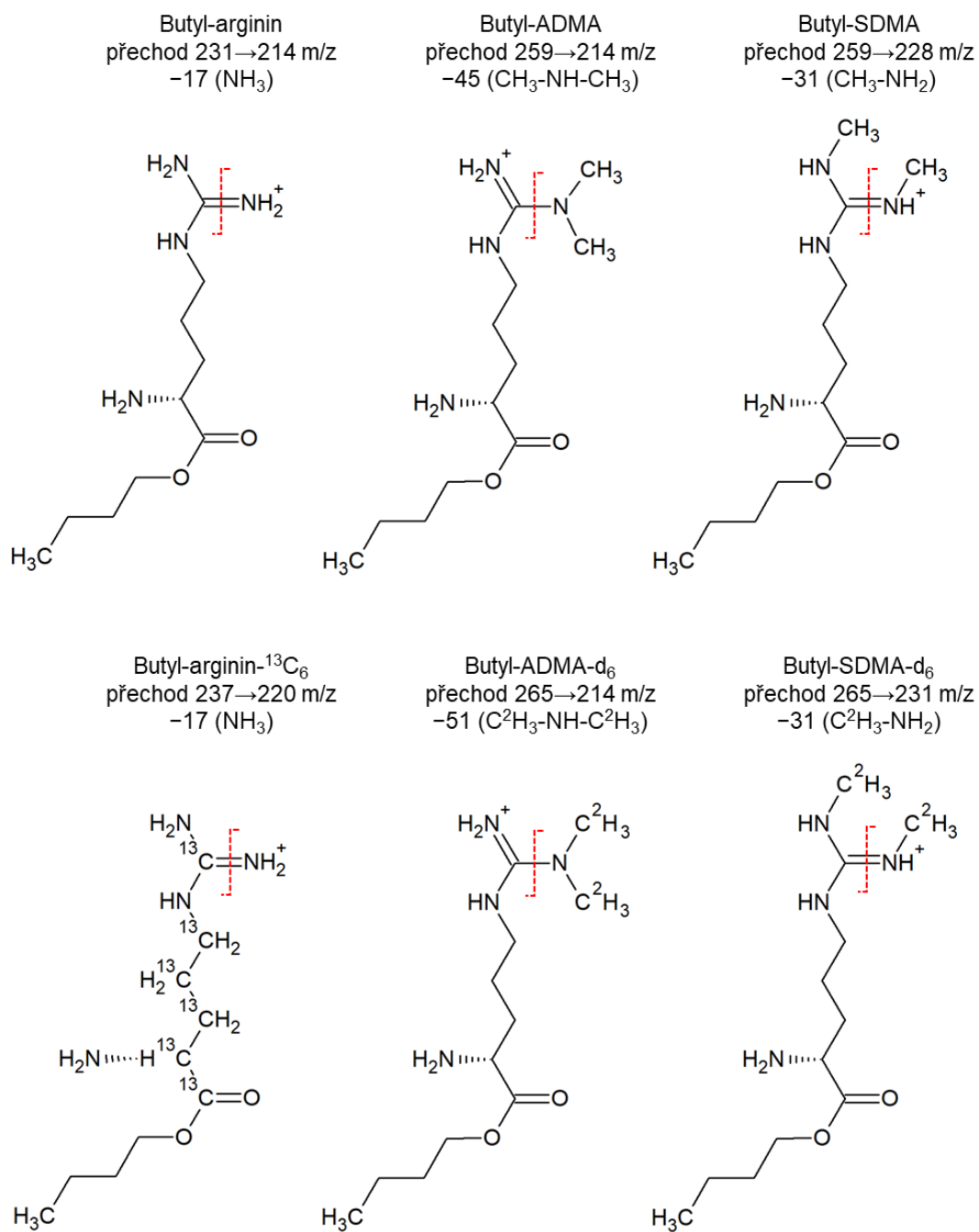
**Tab. 4: Parametry fragmentace.**

	<b>Prekurzorový ion</b> (m/z)	<b>Šířka izolace</b> (m/z)	<b>Cut-off</b> (m/z)	<b>Excitační amplituda</b> (V)	<b>Fragmentový ion</b> (m/z)
L-Arginin	231	1,0	62	0,45	214
L-Arginin- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	237	4,0	64	0,45	220
ADMA	259	4,0	70	0,45	214
ADMA-d <sub>6</sub>	265	4,0	72	0,45	214
SDMA	259	4,0	70	0,45	228
SDMA-d <sub>6</sub>	265	4,0	72	0,45	231

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

#### 4.4.5 Kalibrace

Určení koncentrace jednotlivých analytů ve vzorcích a kontrolních vzorcích bylo provedeno metodou kalibrační křivky se současným použitím interního standardu pro každý analyt. Pro sestavení kalibrační křivky byly použity kalibrační roztoky v rozmezí koncentrací L-argininu 10,0–320,0 μmol l<sup>-1</sup>, ADMA a SDMA 0,2–6,4 μmol l<sup>-1</sup> (Tab. 5). Kalibrační křivka byla sestavena každý den pro každý běh analýzy, všechny kalibrační body byly měřeny v duplikátu.



**Obr. 11: Fragmentace analytů a interních standardů.**

Místa štěpení protonovaných molekul analytů a IS (červeně).

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

**Tab. 5: Koncentrace jednotlivých bodů kalibrační křivky.**

	<b>L-arginin</b> ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	<b>ADMA</b> ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	<b>SDMA</b> ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )
1	10	0,2	0,2
2	20	0,4	0,4
3	40	0,8	0,8
4	80	1,6	1,6
5	160	3,2	3,2
6	320	6,4	6,4

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

#### 4.4.6 Validace

Zjišťovanými parametry metody byly linearita, limit detekce (LOD), limit kvantifikace (LOQ), preciznost, přesnost a vliv matrice vzorku.

Linearita byla ověřována za pomoci desetibodové kalibrační křivky v rozmezí koncentrací L-argininu 2,5–500  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , ADMA a SDMA 0,05–10  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (Tab. 6). Každý kalibrační bod byl měřen v triplicátu.

**Tab. 6: Koncentrace kalibračních bodů pro ověření linearity.**

	<b>L-arginin</b> ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	<b>ADMA</b> ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	<b>SDMA</b> ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )
1	2,5	0,05	0,05
2	5	0,1	0,1
3	10	0,2	0,2
4	25	0,5	0,5
5	50	1	1
6	100	2	2
7	200	4	4
8	300	6	6
9	400	8	8
10	500	10	10

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

Z naměřených hodnot příslušných kalibračních bodů byly v programu Quant Analysis sestrojeny jednotlivé kalibrační křivky pro každý z analytů a byly získány hodnoty směrnice přímky, interceptu, koeficientu determinace a přesnosti koncentrací

jednotlivých kalibračních bodů. Jako lineární byla brána kalibrační křivka v rozsahu koncentrací s koeficientem determinace  $\geq 0,999$  a přesností koncentrací krajních kalibračních bodů vyjádřenou jako relativní chyba  $\leq 15 \%$ .

Limit detekce (LOD) a limit kvantifikace (LOQ) byly určeny pomocí stanovení koncentrací jednotlivých analytů v sérii ředění standardních roztoků. Každý standardní roztok byl měřen v duplikátu třikrát. LOD byl určen jako koncentrace nejnižšího ředění standardu s precizností vyjádřenou jako variační koeficient  $\leq 20 \%$ . LOQ byl vypočítán jako trojnásobek LOD.

Preciznost stanovení vyjádřená jako variační koeficient v % byla určena za podmínek opakovatelnosti z 10 stanovení kontrolních vzorků se všemi třemi hladinami koncentrací v jeden den a jako mezilehlá preciznost z 10 stanovení kontrolních vzorků se všemi třemi hladinami koncentrací v různé dny analýzy.

Přesnost byla určena jako relativní návratnost známých množství přídavků v kontrolních vzorcích vypočítaná jako procentuální poměr rozdílu koncentrace příslušného analytu ve vzorku s přídavkem a bez přídavku ku koncentraci přídavku vyjádřená jako relativní chyba v %.

Možný vliv matrice byl ověřen za pomoci kalibračních křivek sestavených z kalibrátorů připravených ve vodném roztoku a v matrici. Koncentrace standardních přídavků u kalibrační křivky v matrici odpovídaly koncentracím kalibračních bodů kalibrační křivky ve vodě. Variabilita směrnice regresní přímky mezi kalibrační křivkou sestavenou z vodných roztoků a kalibrační křivkou v matrici byla vyjádřena jako variační koeficient v %.

#### **4.4.7 Stabilita vzorků při opakovaném zmrazení a rozmrazení**

Stabilita vzorků při opakovaném zmrazení a rozmrazení byla ověřována na kontrolních vzorcích se třemi hladinami koncentrací analytů. Kontrolní vzorky byly rozděleny do čtyř alikvotů a uskladněny při  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Alikvoty byly postupně rozmrazeny a vytemperovány na laboratorní teplotu a následně opětovně zamrazeny na  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Celkem byly provedeny čtyři cykly zamrazení a rozmrazení kontrolních vzorků. Doba mezi cykly byla 24 hodin. Jednotlivé alikvoty kontrolních vzorků byly analyzovány po jednom, dvou, třech a čtyřech cyklech zmrazení a rozmrazení. Každý alikvot byl měřen v triplicátu. Míra variability koncentrací analytů ve vzorku mezi jednotlivými cykly zmrazení a rozmrazení byla vyjádřena jako variační koeficient v %.

#### **4.4.8 Porovnání vzorků plazmy a séra**

Shoda koncentrací stanovených v plazmě a séru byla zjišťována u 27 jedinců s paralelním odběrem vzorků plazmy a séra. Pro porovnání byla použita Passingova-Bablokova regrese a korelace byla vyjádřena Spearmanovým korelačním koeficientem.

#### **4.5 Stanovení argininu a jeho dimethylderivátů metodou HPLC-FL**

Pro stanovení argininu a jeho dimethylovaných derivátů ADMA a SDMA metodou HPLC-FL byla použita metoda HPLC na reverzních fázích s fluorescenční detekcí a předkolonovou derivatizací vzorku, která byla již dříve na našem ústavu zavedena.

##### **4.5.1 Extrakce na pevné fázi**

Příprava vzorku před vlastní chromatografickou separací představovala extrakci na pevné fázi (SPE) a derivatizaci. K extrakci na pevné fázi byly použity SPE kolonky Oasis MCX s vysokou selektivitou pro bazické sloučeniny. Před nanesením vzorku na kolonku bylo k 200  $\mu\text{l}$  plazmy přidáno 100  $\mu\text{l}$  interního standardu monomethylargininu (IS MMA) koncentrace 40  $\mu\text{mol l}^{-1}$  v 10  $\text{mmol l}^{-1}$  HCl a 700  $\mu\text{l}$  PBS. Nanesený vzorek byl promyt 100  $\text{mmol l}^{-1}$  HCl a následně methanolem. Analyty byly eluovány elučním činidlem amoniak/voda/methanol. Eluát byl odpařen odfoukáváním rozpouštědla proudem dusíku při teplotě 60 °C dosucha a odparek následně rozpuštěn v 10  $\text{mmol l}^{-1}$  HCl a zfiltrován nylonovým stříkačkovým filtrem o velikosti pórů 0,2  $\mu\text{m}$ .

##### **4.5.2 Derivatizace OPA/MPA**

Se vzorkem se smísilo v poměru 1:1 derivatizační činidlo OPA/MPA. Derivatizace vzorku byla prováděna manuálně u každého vzorku přesně 10 minut před jeho nástřikem na kolonu.

##### **4.5.3 Chromatografie**

K chromatografické separaci na kapalinovém chromatografu Thermo Separation Products SpectraSYSTEM byla použita chromatografická kolona ACE Equivalence s C18 sorbentem s velikostí částic 5  $\mu\text{m}$  o délce 150 mm a průměru 4,6 mm s ochrannou předkolonou ACE Equivalence Guard Cartridge s C18 sorbentem a průměru 4,6 mm.

Nástřik derivatizovaného vzorku na kolonu byl 10  $\mu$ l. Separace byla isokratická, 100 % mobilní fáze A o průtoku 1,10 ml/min při 33 °C. Po eluci všech analytů následovalo v 22. minutě přepnutí mobilní fáze na 100 % B a zvýšení průtoku na 1,15 ml/min. Po vymytí silně zadržovaných komponent se pokračovalo pětiminutovým gradientem mobilní fáze B od 100 % do 0 % a dále ekvilibrací kolony 100 % mobilní fáze A opět o průtoku 1,10 ml/min po dobu 10 minut. Celková doba separace byla 40 minut.

Fluorescence byla měřena při excitační vlnové délce 342 nm a emisní vlnové délce 520 nm pro L-arginin a 450 nm pro interní standard MMA a dimethylované deriváty. Píky byly kvantifikovány určením plochy pod křivkou analytu vztažené na plochu pod křivkou interního standardu (AUC/IS) v ovládacím programu chromatografu ChromQuest. Pro určení koncentrací argininu a jeho derivátů ve vzorku byl použit směsný standard o koncentraci jednotlivých složek: L-arginin 50  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>, MMA 20  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>, ADMA 1  $\mu$ mol l<sup>-1</sup> a SDMA 1  $\mu$ mol l<sup>-1</sup> v 10 mmol l<sup>-1</sup> HCl.

#### 4.6 Stanovení ADMA a SDMA metodou ELISA

Pro stanovení ADMA a SDMA metodou ELISA byly použity soupravy firmy DLD Diagnostika pro kvantitativní stanovení endogenního symetrického nebo asymetrického dimethylargininu v plazmě nebo séru. Jedná se o kompetitivní ELISA test na mikrotitrační destičce.

Stanovení je u obou analytů obdobné, lze rozdělit na acylační reakci a vlastní imunochemickou reakci. ADMA (SDMA) ve vzorku byl nejprve acylován a následně přenesen do jamek mikrotitrační destičky, kde soutěžila s *N*-acyl-ADMA (*N*-acyl-SDMA) vázaným na pevnou fázi mikrotitrační destičky o vazebná místa přidané králičí protilátky proti ADMA (SDMA). Po ustavení rovnováhy se promytím odstranily volný antigen a nenavázaný komplex antigen-protilátka. Vázaný komplex antigen-protilátka byl detekován pomocí anti-králičí protilátky značené křenovou peroxidasou, která po přidání substrátu tetramethylbenzidinu katalyzovala jeho přeměnu na barevný produkt. Po zastavení reakce okyselením byla fotometricky změřena intenzita zabarvení při 450 nm. Intenzita zabarvení je nepřímo úměrná koncentraci ADMA nebo SDMA ve vzorku.

První část stanovení, acylace vzorku, byla provedena manuálním zpracováním, druhá část, vlastní imunochemické stanovení, bylo provedeno na ELISA automatu NexGen Four. Všechny vzorky byly měřeny v duplikátu.



## 4.7 Zpracování dat

Pro vyhodnocení naměřených dat, sestavení kalibračních křivek a určení koncentrací analytů byly využity programy dodávané spolu s jednotlivými přístroji. Jednodušší statistické výpočty a analýza dat byly provedeny za použití programu MS Excel, ostatní výpočty a analýza dat, jako Passingova-Bablokova regrese u porovnání metod, CUSUM test linearity, určení referenčních mezí, Shapirův-Wilkův test normality nebo vytvoření krabicových grafů ve statistickém programu R a MedCalc.

## 5 VÝSLEDKY

### 5.1 Zavedení metody LC-MS/MS

#### 5.1.1 Chromatografická separace

L-Arginin, ADMA a SDMA byly separovány na chromatografické koloně Kinetex HPLC Column s C18 sorbentem gradientovou elucí. Retenční časy L-argininu a jeho dimethylovaných derivátů ADMA, SDMA a interních standardů přehledně shrnuje Tab. 7. Píky všech analytů i interních standardů byly kvantifikovány určením plochy pod křivkou příslušných extrahovaných iontových chromatogramů (EIC). Na Obr. 12 jsou znázorněny EIC fragmentových iontů L-argininu, IS L-argininu-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, ADMA, IS ADMA-d<sub>6</sub>, SDMA a IS SDMA-d<sub>6</sub>.

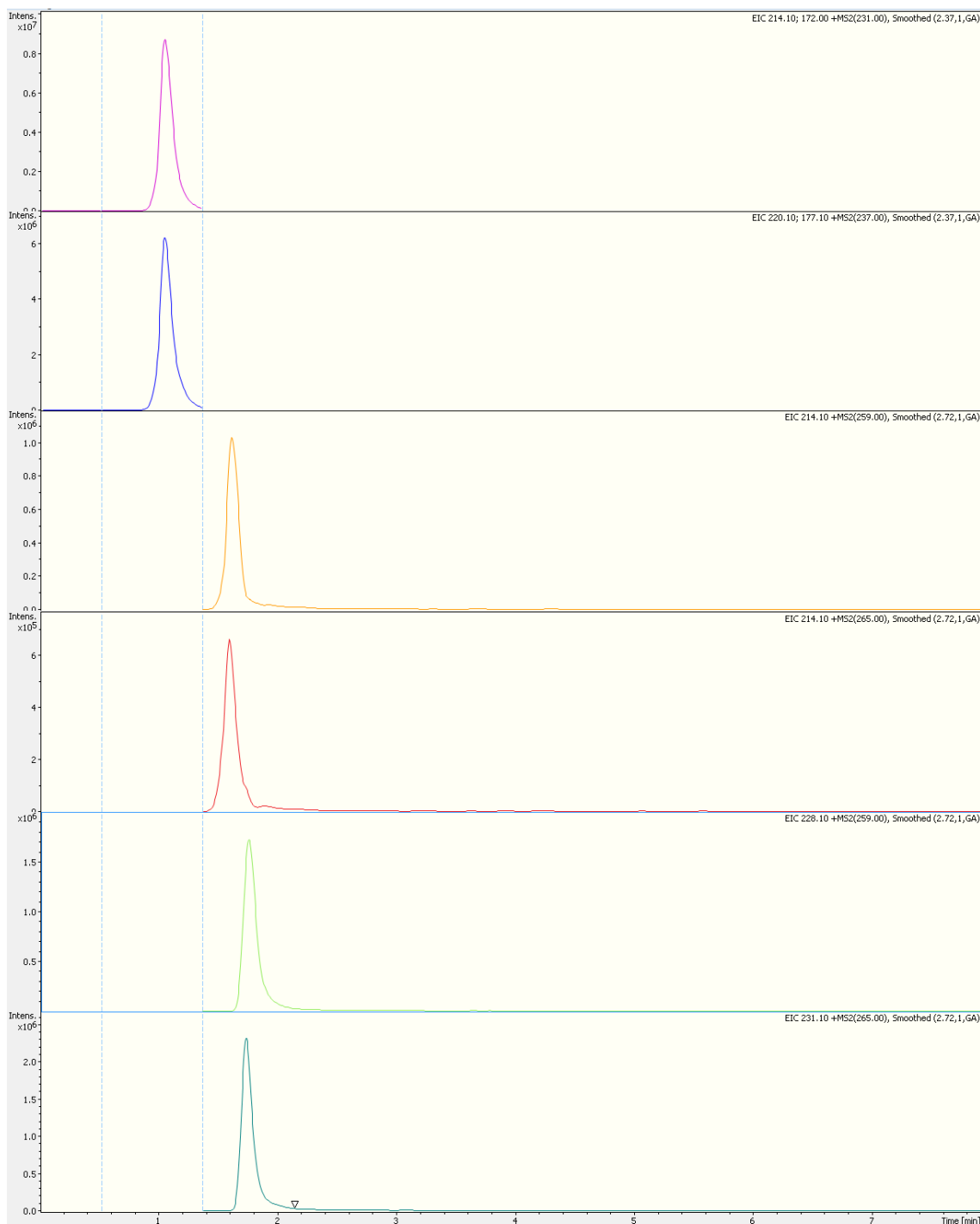
**Tab. 7: Retenční časy L-argininu, jeho dimethylderivátů a interních standardů.**

	<b>t<sub>R</sub></b> (min)
L-Arginin	1,2
L-Arginin- <sup>13</sup> C <sub>6</sub>	1,2
ADMA	1,8
ADMA-d <sub>6</sub>	1,8
SDMA	1,9
SDMA-d <sub>6</sub>	1,9

t<sub>R</sub> – retenční čas, ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

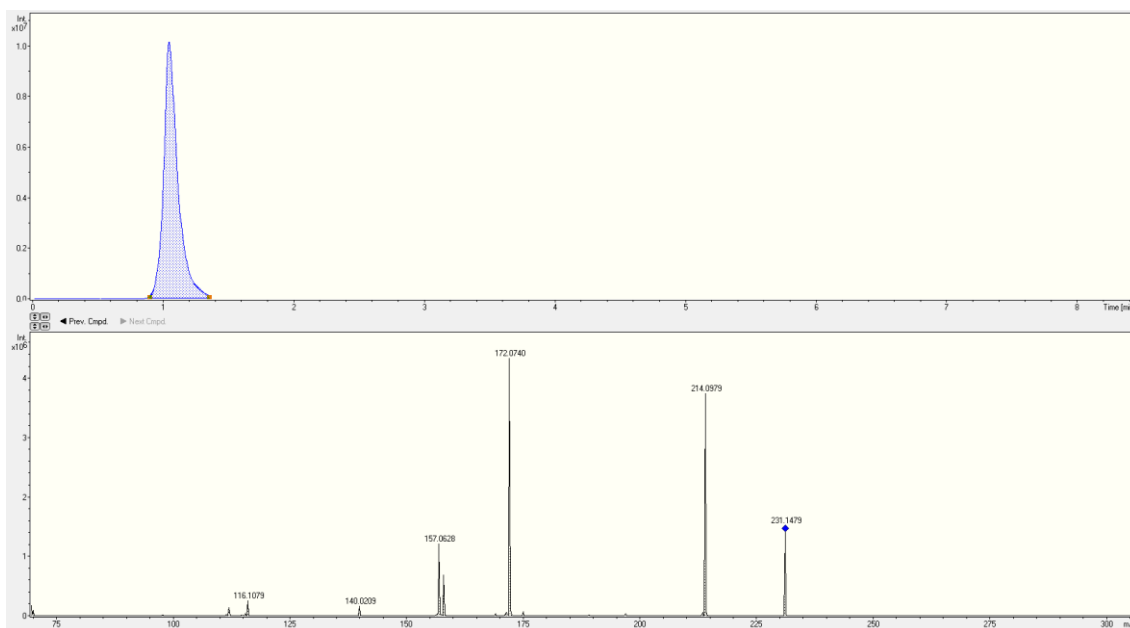
#### 5.1.2 Hmotnostní detekce

Pro hmotnostní detekci byla použita iontová past s iontovým zdrojem ESI. Analyty byly ionizovány za vzniku [M+H]<sup>+</sup> iontů, které byly podrobeny fragmentaci. Pro kvantifikaci všech sledovaných analytů byla použita metoda MRM. Hmotnostní MS<sup>2</sup> spektra spolu s EIC fragmentových iontů pro L-arginin, IS L-arginin-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>, ADMA, IS ADMA-d<sub>6</sub>, SDMA a IS SDMA-d<sub>6</sub> jsou znázorněny na Obr. 13 až Obr. 18.



**Obr. 12: Chromatogramy L-argininu, ADMA, SDMA a interních standardů.**

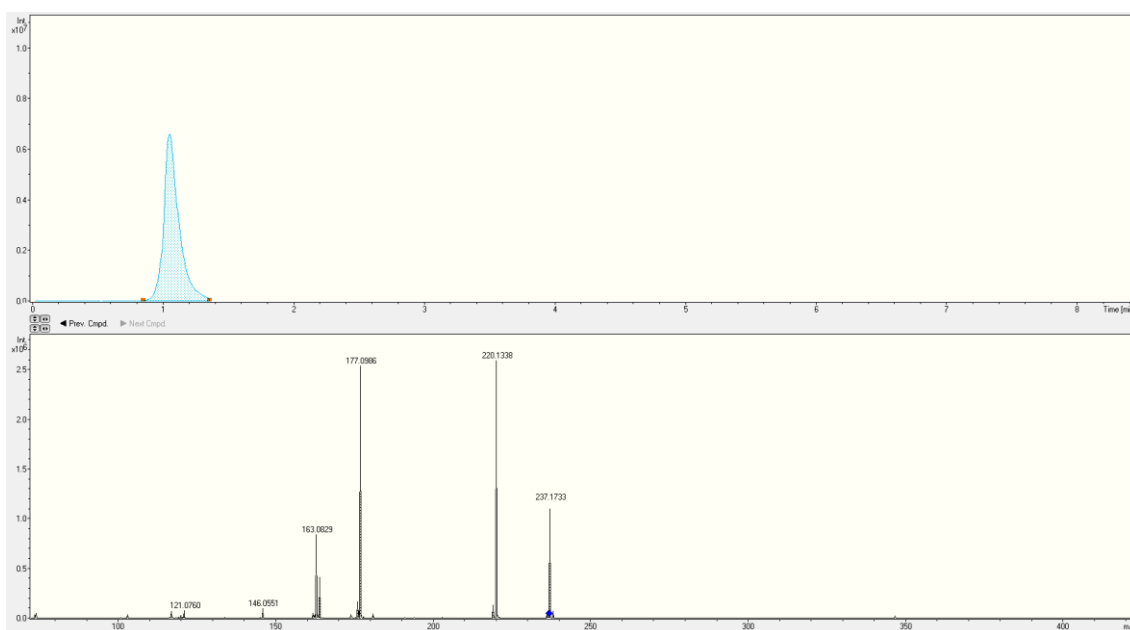
Extrahované iontové chromatogramy (EIC) standardu (růžově L-arginin 80  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , modře IS L-arginin-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> 46,2  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , oranžově ADMA 1,6  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , červeně IS ADMA-d<sub>6</sub> 0,59  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , světle zeleně SDMA 1,6  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , tmavě zeleně IS SDMA-d<sub>6</sub> 0,80  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ).



**Obr. 13: Hmotnostní spektrum L-argininu.**

nahoře – EIC fragmentového iontu 214 m/z (231→214 m/z)

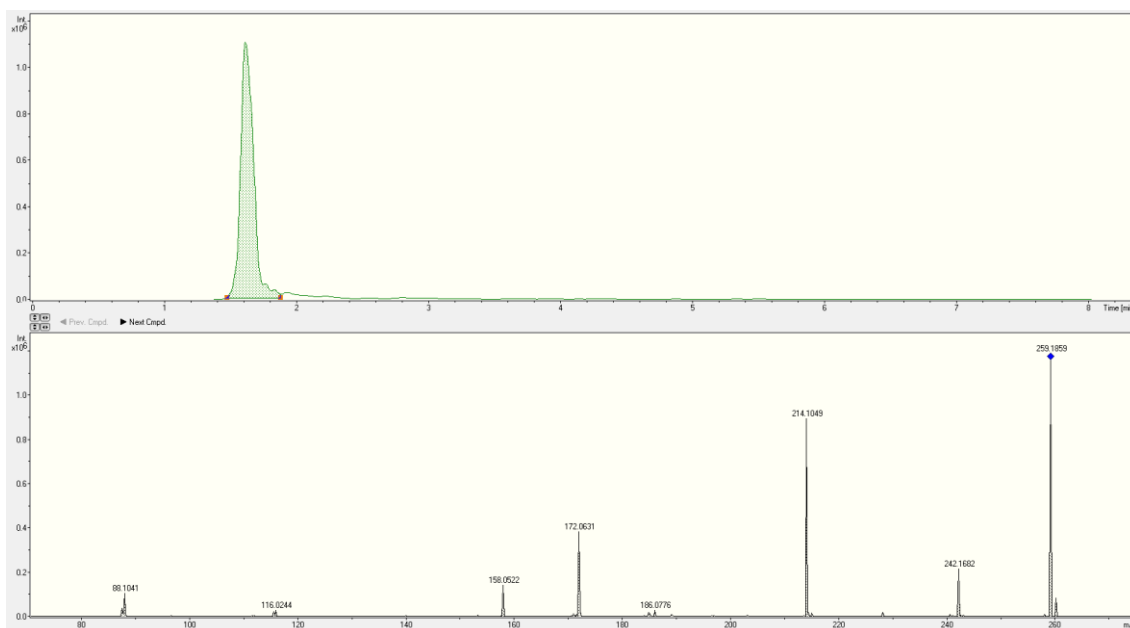
dole – MS<sup>2</sup> spektrum L-argininu (modrá značka ukazuje prekurzorový ion 231 m/z)



**Obr. 14: Hmotnostní spektrum IS L-argininu-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>.**

nahoře – EIC fragmentového iontu 220 m/z (237→220 m/z)

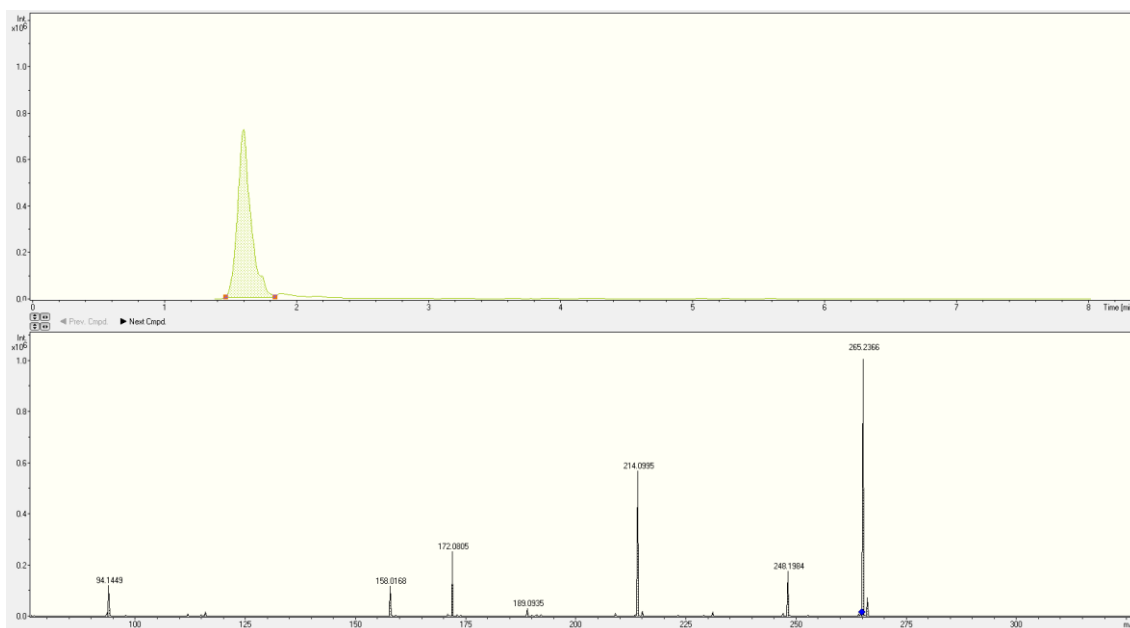
dole – MS<sup>2</sup> spektrum L-argininu-<sup>13</sup>C<sub>6</sub> (modrá značka ukazuje prekurzorový ion 237 m/z)



**Obr. 15: Hmotnostní spektrum ADMA.**

nahoře – EIC fragmentového iontu 214 m/z (259→214 m/z)

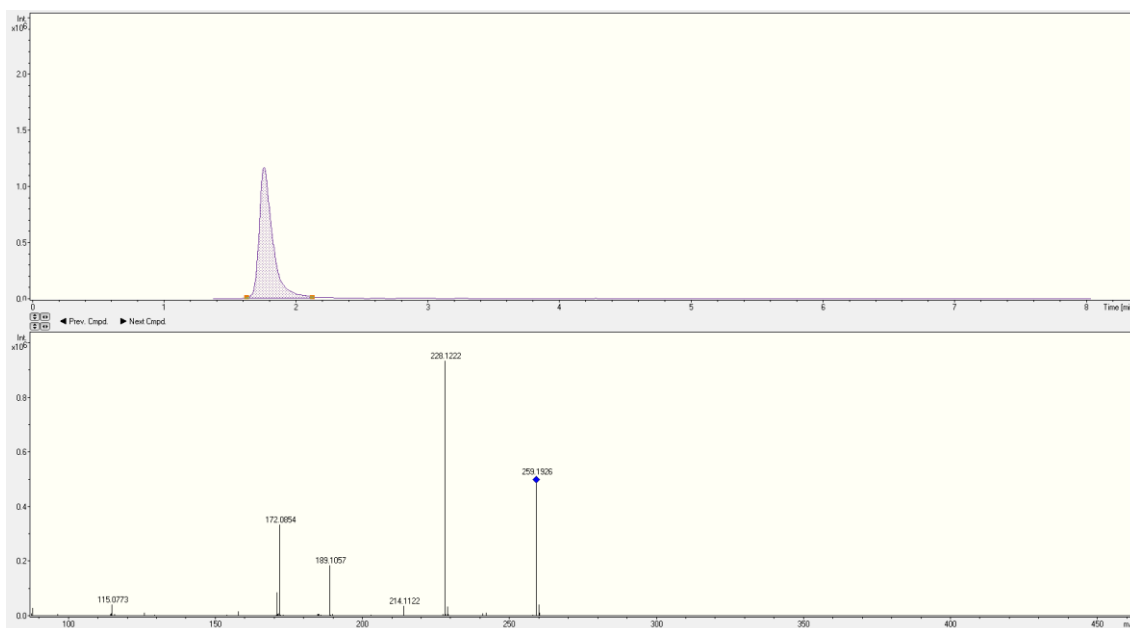
dole – MS<sup>2</sup> spektrum ADMA (modrá značka ukazuje prekurzorový ion 259 m/z)



**Obr. 16: Hmotnostní spektrum IS ADMA-d<sub>6</sub>.**

nahoře – EIC fragmentového iontu 214 m/z (265→214 m/z)

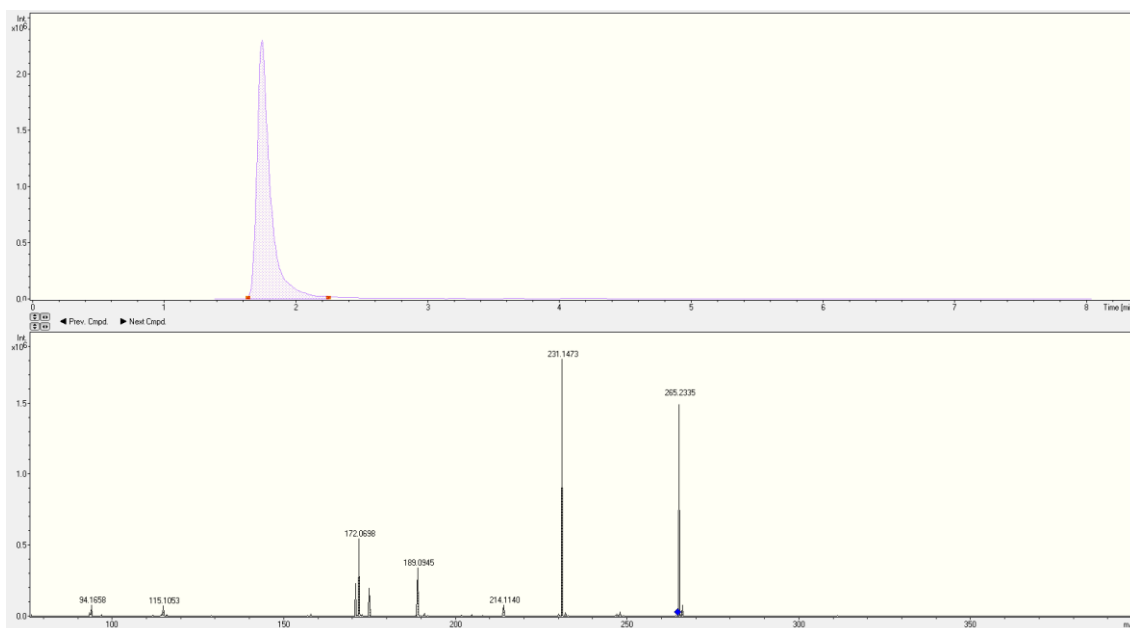
dole – MS<sup>2</sup> spektrum ADMA-d<sub>6</sub> (modrá značka ukazuje prekurzorový ion 265 m/z)



**Obr. 17: Hmotnostní spektrum SDMA.**

nahoře – EIC fragmentového iontu 228 m/z (259→228 m/z)

dole – MS<sup>2</sup> spektrum SDMA (modrá značka ukazuje prekurzorový ion 259 m/z)



**Obr. 18: Hmotnostní spektrum IS SDMA-d<sub>6</sub>.**

nahoře – EIC fragmentového iontu 231 m/z (265→231 m/z)

dole – MS<sup>2</sup> spektrum SDMA-d<sub>6</sub> (modrá značka ukazuje prekurzorový ion 265 m/z)

### 5.1.3 Kalibrace

Pro určení koncentrace jednotlivých analytů ve vzorcích a kontrolních vzorcích jsme použili metodu kalibrační křivky se současným použitím interního standardu pro každý analyt. Z naměřených hodnot jednotlivých kalibračních bodů byly v programu Quant Analysis sestrojeny kalibrační křivky pro každý analyt a byla provedena lineární regresní analýza a získány rovnice regrese a koeficienty determinace. Průměrné hodnoty směrnice přímky, interceptu a koeficientu determinace včetně konfidenčních intervalů získané z proměření osmi kalibračních křivek jsou přehledně shrnuty v Tab. 8.

**Tab. 8: Charakteristiky kalibračních křivek L-argininu, ADMA a SDMA.**

	<b>Směrnice přímky (±SD)</b>	<b>Intercept (±SD)</b>	<b>Koeficient determinace (±SD)</b>
L-Arginin	0,722731 (±0,107294)	-0,022613 (±0,042478)	0,999399 (±0,000327)
ADMA	0,484627 (±0,107417)	0,012718 (±0,042767)	0,999395 (±0,000414)
SDMA	0,455505 (±0,053293)	-0,016521 (±0,027780)	0,999640 (±0,000332)

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin, SD – směrodatná odchylka

### 5.1.4 Analytické vlastnosti metody

Linearitu jsme ověřovali u L-argininu, ADMA i SDMA v rozmezí koncentrací L-argininu 2,5–500  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , ADMA a SDMA 0,05–10  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Byly sestrojeny kalibrační křivky a provedena lineární regresní analýza. Charakteristiky jednotlivých kalibračních křivek shrnuje Tab. 9.

**Tab. 9: Charakteristiky kalibračních křivek pro ověření linearitu.**

	<b>Kalibrační rozsah (<math>\mu\text{mol l}^{-1}</math>)</b>	<b>Směrnice přímky</b>	<b>Intercept</b>	<b>Koeficient determinace</b>
L-Arginin	2,5–500	0,757972	-0,006356	0,999623
ADMA	0,05–10	0,577494	0,020716	0,999087
SDMA	0,05–10	0,504136	-0,048028	0,999423

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

Všechny kalibrační křivky byly lineární v celém sledovaném rozsahu koncentrací s koeficientem determinace  $> 0,999$  a přesností stanovení koncentrací krajních kalibračních bodů vyjádřenou jako relativní chyba  $\leq 15$  % teoretické hodnoty.

Limit detekce a limit kvantifikace jsme určovali pro ADMA a SDMA. LOD byl pro ADMA  $0,0138 \mu\text{mol l}^{-1}$  a pro SDMA  $0,0137 \mu\text{mol l}^{-1}$  a LOQ byl pro ADMA  $0,0414 \mu\text{mol l}^{-1}$  a pro SDMA  $0,0411 \mu\text{mol l}^{-1}$  (Tab. 10).

**Tab. 10: Limit detekce a limit kvantifikace ADMA a SDMA.**

	<b>Koncentrace standardu</b> ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	<b>SD</b> ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	<b>CV</b> (%)	<b>LOD</b> ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	<b>LOQ</b> ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )
ADMA	0,01	0,0028	20,0	0,0138	0,0414
SDMA	0,01	0,0021	15,1	0,0137	0,0411

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin, SD – směrodatná odchylka, CV – variační koeficient, LOD – limit detekce, LOQ – limit kvantifikace

Preciznost a přesnost stanovení L-argininu a jeho dimethylderivátů ADMA a SDMA jsme testovali pomocí kontrolních vzorků se třemi hladinami koncentrací L-argininu, ADMA a SDMA. U všech kontrolních vzorků byla opakovatelnost  $\leq 4,80 \%$ , mezilehlá preciznost  $\leq 8,65 \%$  a přesnost, respektive nepřesnost, vyjádřená jako relativní chyba  $\leq 7,62 \%$  (Tab. 11).

**Tab. 11: Preciznost a přesnost stanovení L-argininu a jeho derivátů.**

	<b>Průměrná koncentrace</b> ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	<b>Opakovatelnost</b> CV (%)	<b>Mezilehlá preciznost</b> CV (%)	<b>Přesnost</b> $E_r$ (%)
L-Arginin QC-L	54,67	4,63	6,12	-
L-Arginin QC-M	107,78	3,79	5,46	+4,65
L-Arginin QC-H	152,37	4,63	4,87	-2,30
ADMA QC-L	0,43	4,73	8,47	-
ADMA QC-M	1,23	4,43	6,06	+0,37
ADMA QC-H	2,01	4,80	8,65	+5,56
SDMA QC-L	0,56	4,34	5,29	-
SDMA QC-M	1,94	4,38	7,97	-7,62
SDMA QC-H	3,46	4,18	6,80	-3,24

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin, QC-L – kontrolní vzorek s nízkou hladinou koncentrací sledovaných analytů, QC-M – kontrolní vzorek se střední hladinou koncentrací sledovaných analytů, QC-H – kontrolní vzorek s vysokou hladinou koncentrací sledovaných analytů, CV – variační koeficient,  $E_r$  – relativní chyba



### 5.1.5 Vliv matrice vzorku

Vliv matrice vzorku jsme ověřovali za pomoci kalibračních křivek ve vodě a v matrici sestrojených pro L-arginin, ADMA i SDMA. Charakteristiky jednotlivých regresních přímek jsou uvedeny v Tab. 12.

**Tab. 12: Charakteristiky kalibračních křivek připravených ve vodě a v matrici.**

	Směrnice přímky	Intercept	Koeficient determinace
L-arginin ve vodě	0,784951	0,009233	0,9994
L-arginin v matrici	0,798434	0,795128	0,9992
ADMA ve vodě	0,579102	0,012312	0,9996
ADMA v matrici	0,576952	0,528737	0,9998
SDMA ve vodě	0,516788	-0,042446	0,9994
SDMA v matrici	0,528497	0,356435	0,9992

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

Rozdíly mezi směrnici regresní přímky kalibrační křivky sestrojené z kalibrátorů připravených ve vodě a v matrici vyjádřené jako míra variability variačním koeficientem byly u všech analytů  $\leq 1,58$  % (Tab. 13).

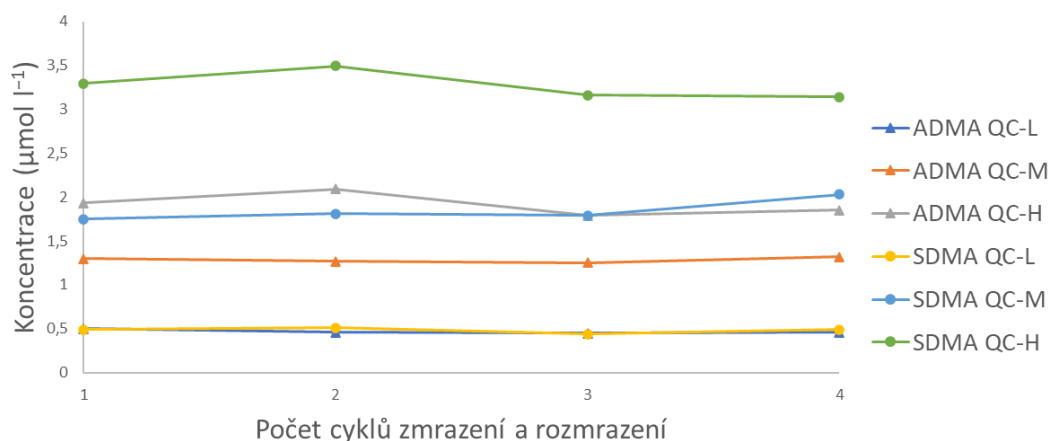
**Tab. 13: Variabilita kalibračních křivek připravených ve vodě a v matrici.**

	Míra variability směrnice přímky CV (%)
L-Arginin	1,20
ADMA	0,26
SDMA	1,58

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin, CV – variační koeficient

### 5.1.6 Stabilita vzorku při opakovaném zmrazení a rozmrazení

Stabilitu vzorků při opakovaném zmrazení a rozmrazení jsme ověřovali v kontrolních vzorcích. Kontrolní vzorky se třemi hladinami koncentrací ADMA a SDMA byly podrobeny 1–4 cyklům zmrazení a rozmrazení. Ve vzorcích byla stanovena koncentrace sledovaných analytů (Obr. 19 a Tab. 14), míra variability koncentrací mezi jednotlivými cykly zmrazení a rozmrazení vyjádřená jako variační koeficient byla  $\leq 6,82$  %.



**Obr. 19: Stabilita ADMA a SDMA ve zmrazeném vzorku.**

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin, QC-L – kontrolní vzorek s nízkou hladinou koncentrací sledovaných analytů, QC-M – kontrolní vzorek se střední hladinou koncentrací sledovaných analytů, QC-H – kontrolní vzorek s vysokou hladinou koncentrací sledovaných analytů

**Tab. 14: Koncentrace ADMA a SDMA po 1–4 cyklech zmrazení a rozmrazení.**

	Průměrná koncentrace ( $\pm$ SD)				CV (%)
	1 cyklus ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	2 cykly ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	3 cykly ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	4 cykly ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	
ADMA QC-L	0,50 ( $\pm$ 0,034)	0,46 ( $\pm$ 0,014)	0,45 ( $\pm$ 0,019)	0,46 ( $\pm$ 0,019)	4,74
ADMA QC-M	1,30 ( $\pm$ 0,071)	1,27 ( $\pm$ 0,055)	1,25 ( $\pm$ 0,080)	1,32 ( $\pm$ 0,092)	2,42
ADMA QC-H	1,93 ( $\pm$ 0,016)	2,09 ( $\pm$ 0,124)	1,79 ( $\pm$ 0,028)	1,85 ( $\pm$ 0,116)	6,79
SDMA QC-L	0,49 ( $\pm$ 0,004)	0,51 ( $\pm$ 0,025)	0,44 ( $\pm$ 0,019)	0,49 ( $\pm$ 0,011)	6,19
SDMA QC-M	1,75 ( $\pm$ 0,063)	1,81 ( $\pm$ 0,045)	1,79 ( $\pm$ 0,077)	2,03 ( $\pm$ 0,045)	6,82
SDMA QC-H	3,29 ( $\pm$ 0,056)	3,49 ( $\pm$ 0,097)	3,16 ( $\pm$ 0,202)	3,14 ( $\pm$ 0,119)	4,92

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin, QC-L – kontrolní vzorek s nízkou hladinou koncentrací sledovaných analytů, QC-M – kontrolní vzorek se střední hladinou koncentrací sledovaných analytů, QC-H – kontrolní vzorek s vysokou hladinou koncentrací sledovaných analytů, SD – směrodatná odchylka, CV – variační koeficient

### 5.1.7 Porovnání vzorků plazmy a séra

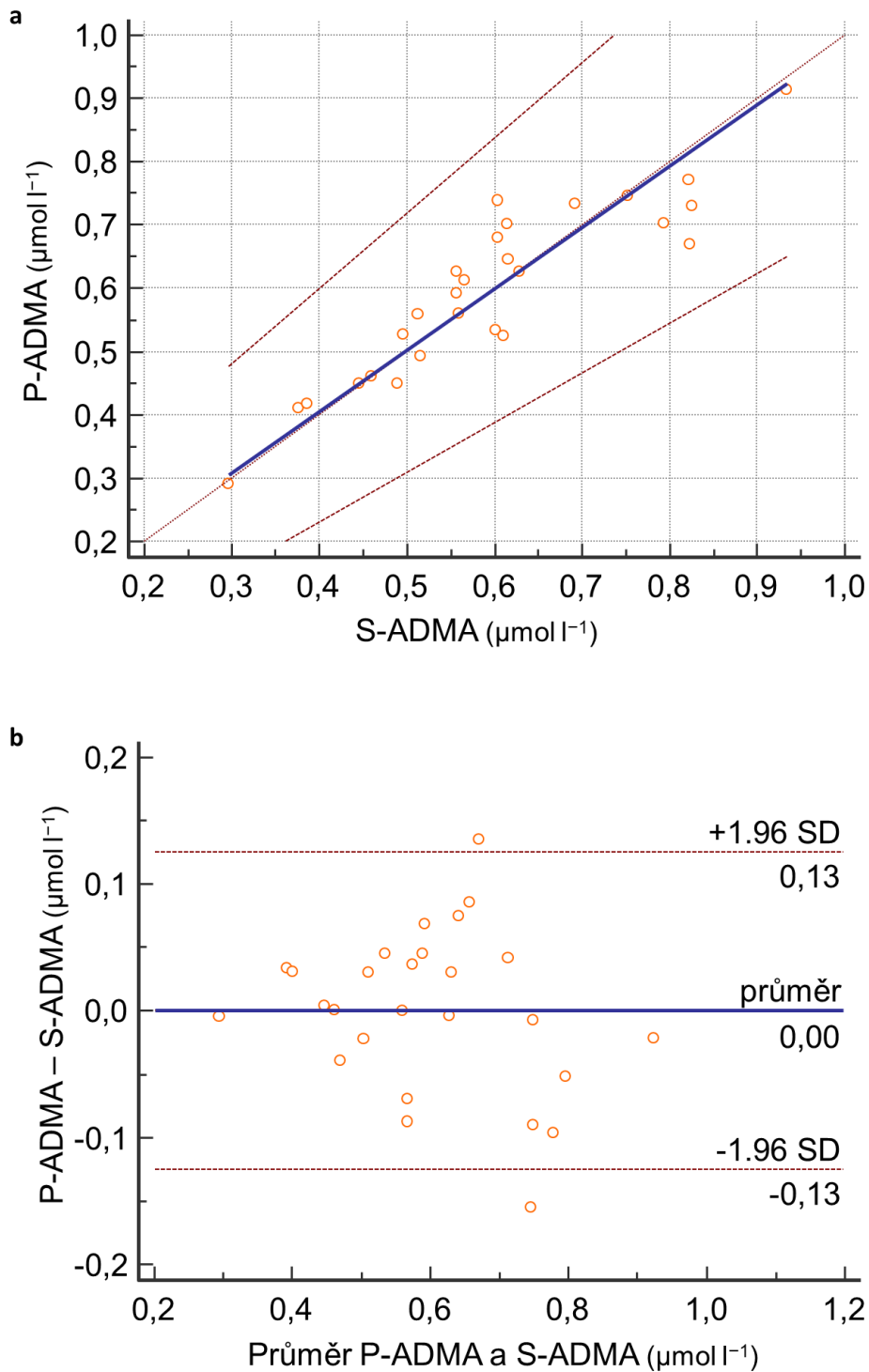
Pro porovnání vzorků plazmy a séra byla použita Passingova-Bablokova regrese ve statistickém programu MedCalc. Korelace byla vyjádřena Spearmanovým korelačním koeficientem.

Regresní rovnice pro ADMA (n = 27) byla  $y = 0,01748 + 0,9686 x$  a Spearmanův korelační koeficient 0,890 ( $p < 0,0001$ ), pro SDMA (n = 27)  $y = 0,00676 + 0,9781 x$  a Spearmanův korelační koeficient 0,988 ( $p < 0,0001$ ) (Tab. 15, Obr. 20, Obr. 21). CUSUM test linearity neodhalil významnou odchylku od linearity ani u ADMA ( $p = 0,11$ ), ani u SDMA ( $p = 1,00$ ). Průměrná hodnota koncentrace ADMA byla v plazmě  $0,5982 \pm 0,1383 \mu\text{mol l}^{-1}$  a v séru  $0,5981 \pm 0,1530 \mu\text{mol l}^{-1}$ , průměrná koncentrace SDMA byla v plazmě  $0,9805 \pm 0,5804 \mu\text{mol l}^{-1}$  a v séru  $0,9943 \pm 0,6006 \mu\text{mol l}^{-1}$ .

**Tab. 15: Porovnání ADMA a SDMA ve vzorcích plazmy a séra.**

	<b>Směrnice přímky (95% CI)</b>	<b>Intercept (95% CI)</b>	<b>Spearmanův korelační koeficient (95% CI)</b>	<b>p-hodnota</b>
ADMA (n = 27)	0,9686 (0,7876–1,1890)	0,01748 (–0,08680–0,1229)	0,890 (0,771–0,949)	<0,0001
SDMA (n = 27)	0,9781 (0,9232–1,0212)	0,00676 (–0,02282–0,04588)	0,988 (0,973–0,995)	<0,0001

95% CI – konfidenční interval s konfidenční úrovní 95 %, ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

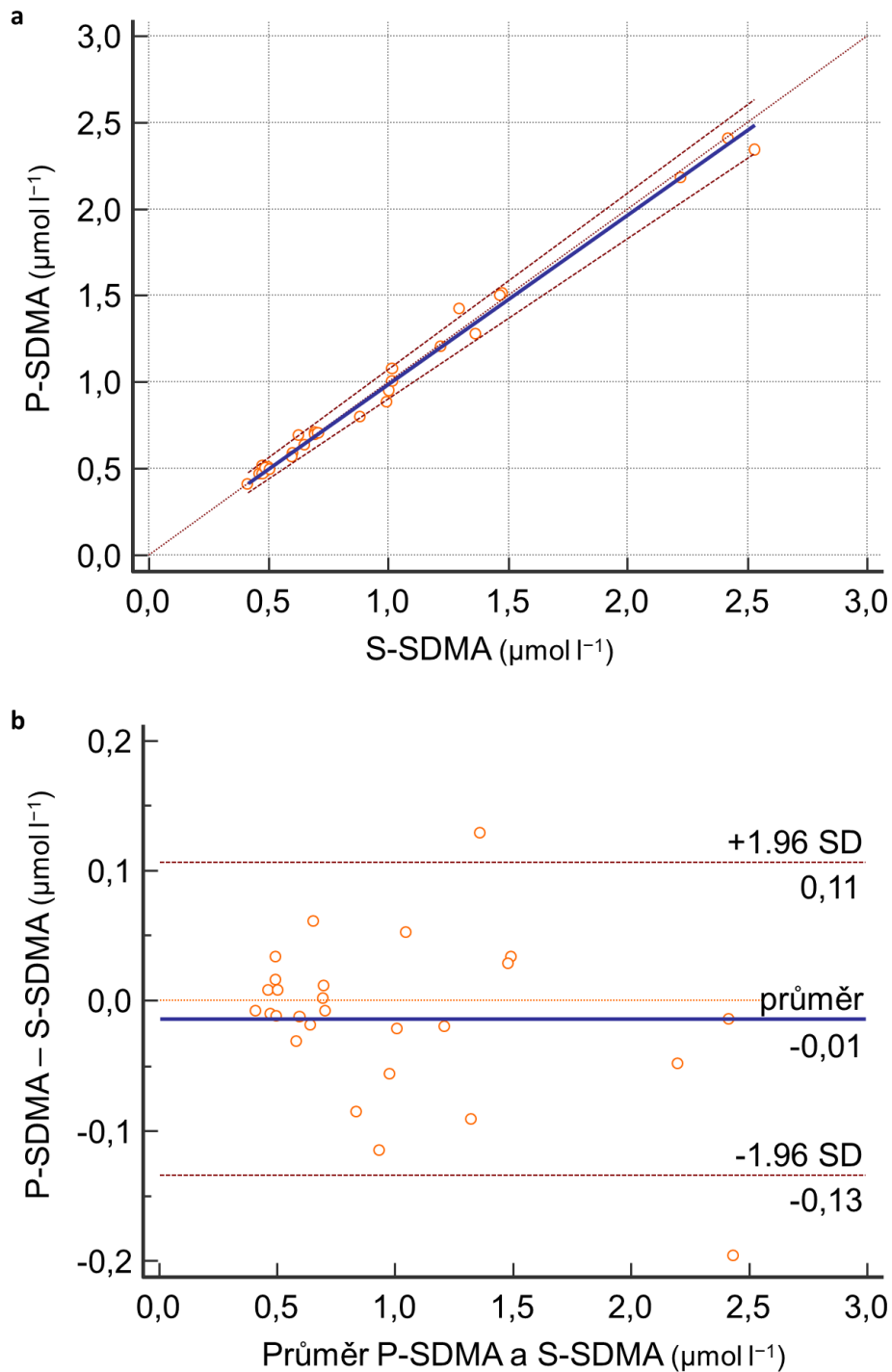


**Obr. 20: Porovnání ADMA ve vzorcích plazmy a séra.**

a) bodový diagram s regresní přímkou  $y = 0,01748 + 0,9686 x$ ,  $n = 27$ ,  $r = 0,890$ ,  $p < 0,0001$ , (modře regresní přímka, čárkovaně konfidenční interval)

b) Blandův-Altmanův diagram (modře průměr, čárkovaně konfidenční interval)

S-ADMA – asymetrický dimethylarginin v séru, P-ADMA – asymetrický dimethylarginin v plazmě, SD – směrodatná odchylka



**Obr. 21: Porovnání SDMA ve vzorcích plazmy a séra.**

a) bodový diagram s regresní přímkou  $y = 0,00676 + 0,9781 x$ ,  $n = 27$ ,  $r = 0,988$ ,  $p < 0,0001$ , (modře regresní přímka, čárkovaně konfidenční interval)

b) Blandův-Altmanův diagram (modře průměr, čárkovaně konfidenční interval)

S-SDMA – symetrický dimethylarginin v séru, P-SDMA – symetrický dimethylarginin v plazmě, SD – směrodatná odchylka

## 5.2 Porovnání metod

Pro porovnání metody LC-MS/MS s metodou ELISA a HPLC-FL byla použita Passingova-Bablokova regrese ve statistickém programu MedCalc. Korelace byla vyjádřena Spearmanovým korelačním koeficientem.

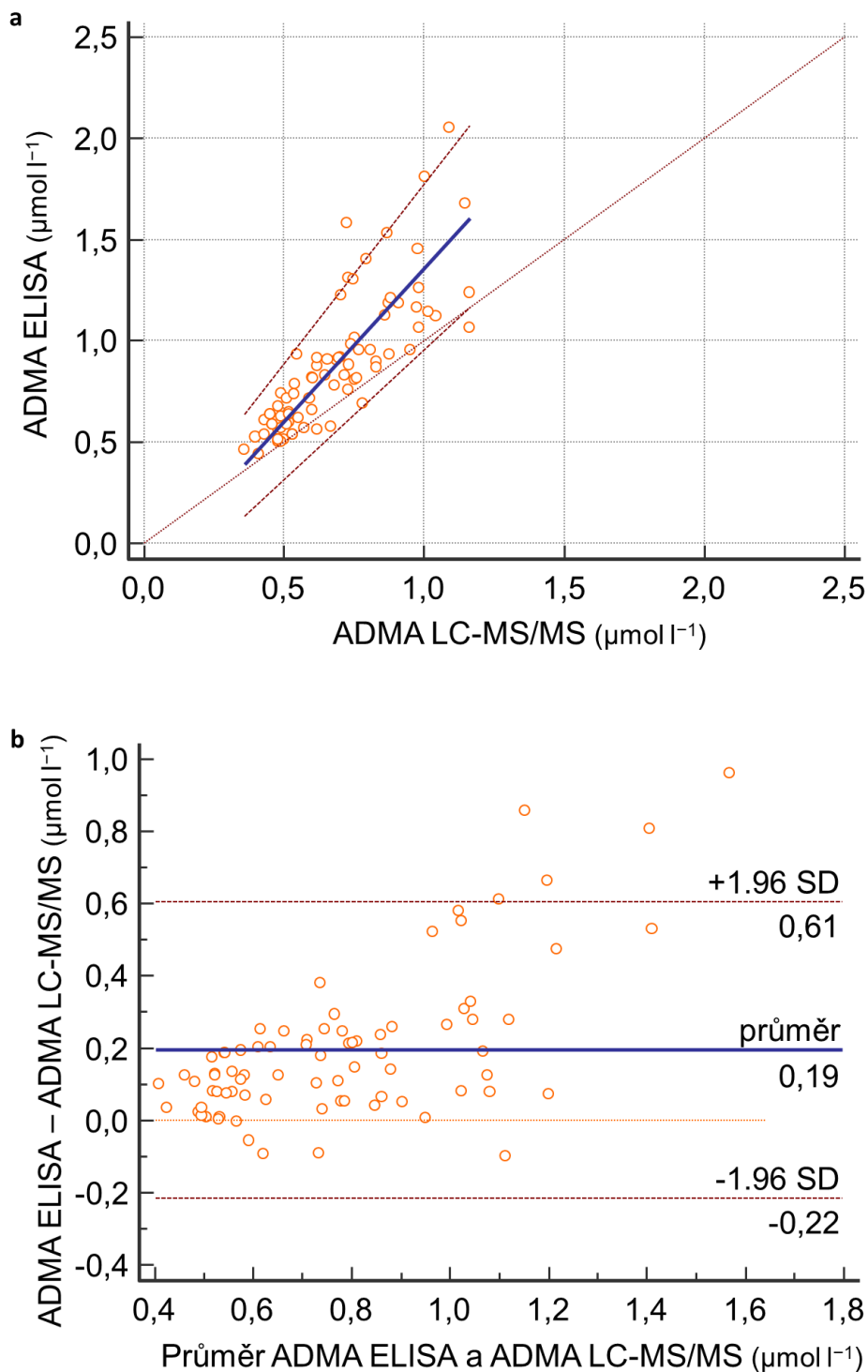
### 5.2.1 Porovnání s metodou ELISA

Regresní rovnice pro ADMA ( $n = 79$ ) byla  $y = -0,1533 + 1,5089 x$  a Spearmanův korelační koeficient 0,858 ( $p < 0,0001$ ), pro SDMA ( $n = 80$ )  $y = 0,10813 + 0,9505 x$  a Spearmanův korelační koeficient 0,801 ( $p < 0,0001$ ) (Tab. 16, Obr. 22, Obr. 23). CUSUM test linearity neodhalil významnou odchylku od linearity ani u ADMA ( $p = 0,73$ ), ani u SDMA ( $p = 0,15$ ). Průměrná koncentrace ADMA byla u metody LC-MS/MS  $0,6861 \pm 0,2022 \mu\text{mol l}^{-1}$  a u metody ELISA  $0,8815 \pm 0,3357 \mu\text{mol l}^{-1}$ , průměrná koncentrace SDMA byla u metody LC-MS/MS  $1,3710 \pm 1,0219 \mu\text{mol l}^{-1}$  a u metody ELISA  $1,4042 \pm 0,8726 \mu\text{mol l}^{-1}$ .

**Tab. 16: Porovnání metod LC-MS/MS a ELISA**

	<b>Směrnice přímky (95% CI)</b>	<b>Intercept (95% CI)</b>	<b>Spearmanův korelační koeficient (95% CI)</b>	<b>p-hodnota</b>
ADMA ( $n = 79$ )	1,5089 1,2747–1,7711	-0,1533 (-0,3238–(-0,0014))	0,858 0,785–0,907	< 0,0001
SDMA ( $n = 80$ )	0,9505 0,7310–1,2150	0,1081 (-0,06245–0,2537)	0,801 0,706–0,868	< 0,0001

95% CI – konfidenční interval s konfidenční úrovní 95 %, ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

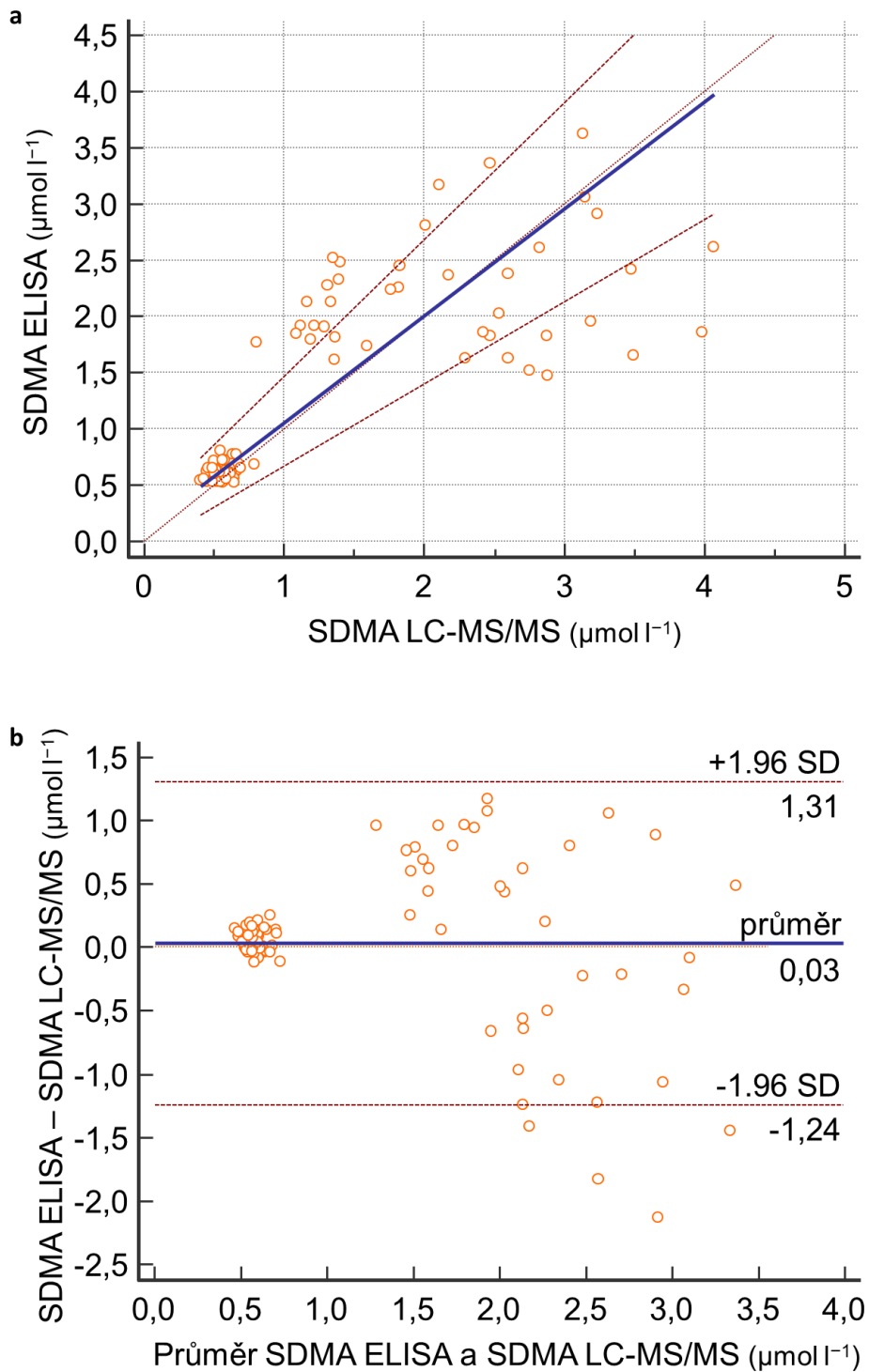


**Obr. 22: Porovnání metody LC-MS/MS a ELISA u ADMA.**

a) bodový diagram s regresní přímkou  $y = -0,153297 + 1,508870 x$ ,  $n = 79$ ,  $r = 0,858$ ,  $p < 0,0001$ , (modře regresní přímka, čárkovaně konfidenční interval)

b) Blandův-Altmanův diagram (modře průměr, čárkovaně konfidenční interval)

ADMA – asymetrický dimethylarginin, ELISA – enzymová imunoanalýza na imunosorbentech, LC-MS/MS – kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií, SD – směrodatná odchylka



**Obr. 23: Porovnání metody LC-MS/MS a ELISA u SDMA.**

a) bodový diagram s regresní přímkou  $y = 0,108133 + 0,950534 x$ ,  $n = 80$ ,  $r = 0,801$ ,  $p < 0,0001$ , (modře regresní přímka, čárkovaně konfidenční interval)

b) Blandův-Altmanův diagram (modře průměr, čárkovaně konfidenční interval)

SDMA – symetrický dimethylarginin, ELISA – enzymová imunoanalýza na imunosorbentech, LC-MS/MS – kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií, SD – směrodatná odchylka



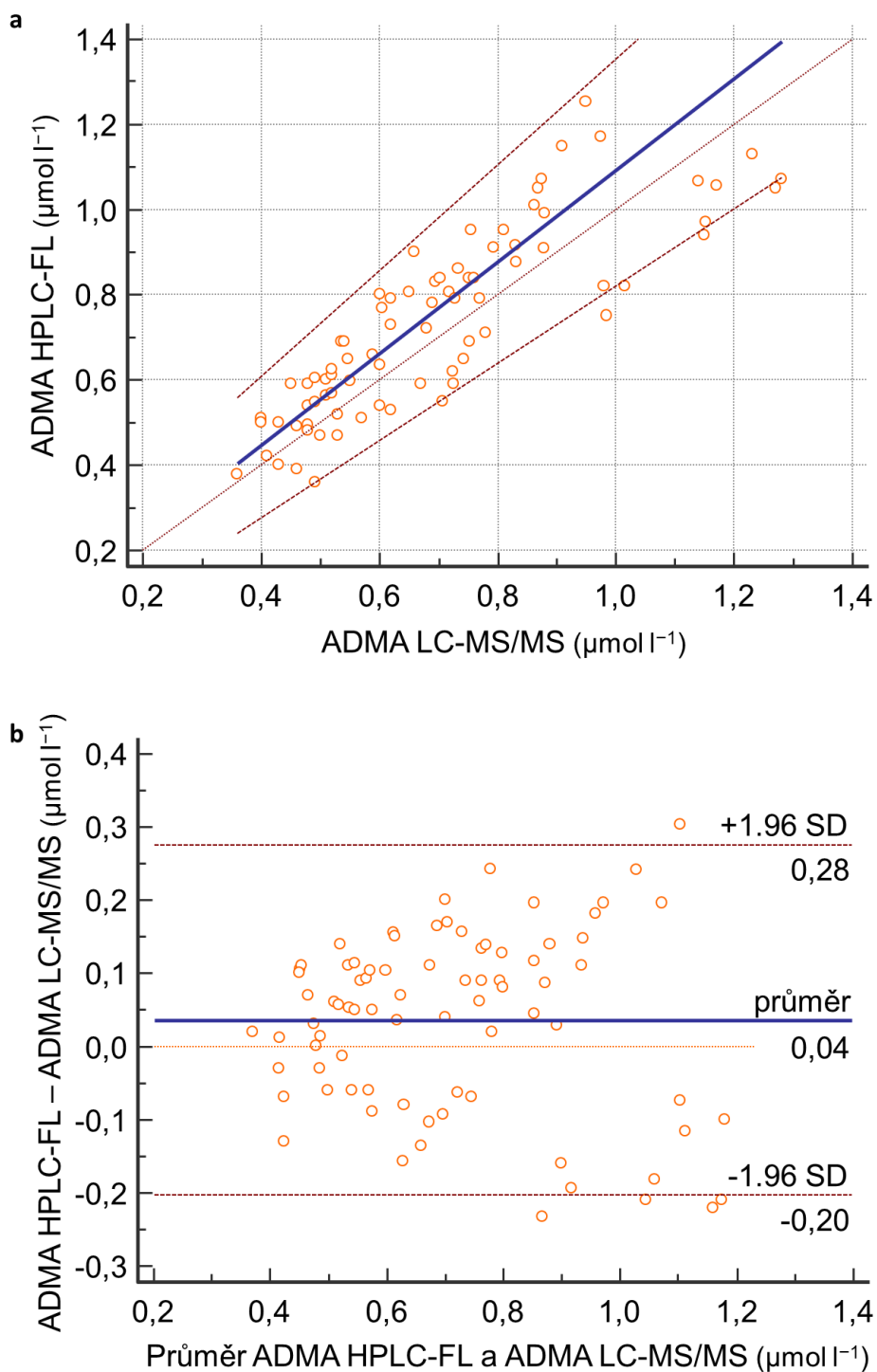
### 5.2.2 Porovnání s metodu HPLC-FL

Regresní rovnice pro ADMA ( $n = 80$ ) byla  $y = 0,01576 + 1,0778 x$  a Spearmanův korelační koeficient 0,883 ( $p < 0,0001$ ), pro SDMA ( $n = 80$ )  $y = 0,04127 + 0,9500 x$  a Spearmanův korelační koeficient 0,952 ( $p < 0,0001$ ) (Tab. 17, Obr. 24, Obr. 25). CUSUM test linearitu neodhalil významnou odchylku od linearitu ani u ADMA ( $p = 0,74$ ), ani u SDMA ( $p = 0,74$ ). Průměrná koncentrace ADMA byla u metody LC-MS/MS  $0,6861 \pm 0,2022 \mu\text{mol l}^{-1}$  a u metody HPLC-FL  $0,7356 \pm 0,2145 \mu\text{mol l}^{-1}$ , průměrná koncentrace SDMA byla u metody LC-MS/MS  $1,3710 \pm 1,0219 \mu\text{mol l}^{-1}$  a u metody HPLC-FL  $1,3432 \pm 0,9757 \mu\text{mol l}^{-1}$ .

**Tab. 17: Porovnání metod LC-MS/MS a HPLC-FL**

	<b>Směrnice přímky (95% CI)</b>	<b>Intercept (95% CI)</b>	<b>Spearmanův korelační koeficient (95% CI)</b>	<b>p-hodnota</b>
ADMA ( $n = 80$ )	1,0778 (0,9054–1,2433)	0,01576 (–0,08509–0,1116)	0,883 (0,823–0,924)	< 0,0001
SDMA ( $n = 80$ )	0,9500 (0,9019–0,9906)	0,04127 (0,00525–0,08738)	0,952 (0,925–0,969)	< 0,0001

95% CI – konfidenční interval s konfidenční úrovní 95 %, ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

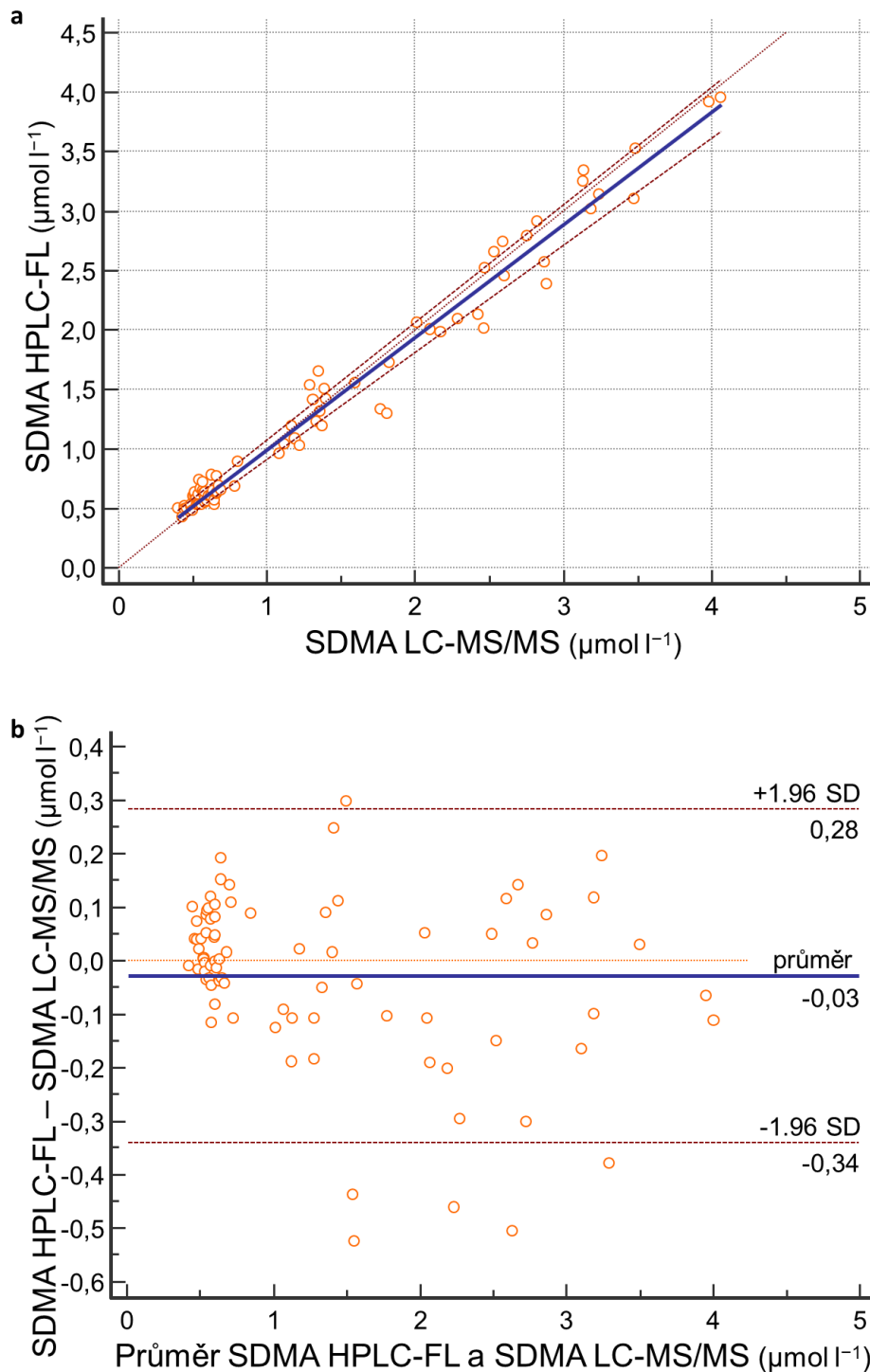


**Obr. 24: Porovnání metody LC-MS/MS a HPLC-FL u ADMA.**

a) bodový diagram s regresní přímkou  $y = 0,01576 + 1,0778 x$ ,  $n = 80$ ,  $r = 0,883$ ,  $p < 0,0001$ , (modře regresní přímka, čárkovaně konfidenční interval)

b) Blandův-Altmanův diagram (modře průměr, čárkovaně konfidenční interval)

ADMA – asymetrický dimethylarginin, HPLC-FL – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí, LC-MS/MS – kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií, SD – směrodatná odchylka



**Obr. 25: Porovnání metody LC-MS/MS a HPLC-FL u SDMA.**

a) bodový diagram s regresní přímkou  $y = 0,04127 + 0,9500 x$ ,  $n = 80$ ,  $r = 0,952$ ,  $p < 0,0001$ , (modře regresní přímka, čárkovaně konfidenční interval)

b) Blandův-Altmanův diagram (modře průměr, čárkovaně konfidenční interval)

SDMA – symetrický dimethylarginin, HPLC-FL – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí, LC-MS/MS – kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií, SD – směrodatná odchylka

## 5.3 Klinické vzorky

### 5.3.1 Kontrolní skupina

Kontrolní skupina sloužila jako výběrová referenční populace pro určení referenčních mezí ADMA a SDMA. Byly analyzovány vzorky od 40 dárců krve, vzorky pro muže a ženy byly kombinovány. Průměrné koncentrace a další hodnoty výběrové referenční populace jsou pro ADMA a SDMA shrnuty v Tab. 18.

**Tab. 18: Hodnoty ADMA a SDMA u výběrové referenční populace.**

	ADMA ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	SDMA ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )
Nejnižší hodnota	0,36	0,40
Nejvyšší hodnota	0,78	0,79
Aritmetický průměr	0,5313	0,5636
Medián	0,5150	0,5563
Směrodatná odchylka	0,0892	0,0810

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

Výpočet referenčních mezí byl proveden ve statistickém programu MedCalc jako 95% referenční interval ohraničený z obou stran. Pro ověření normálnosti rozložení hodnot byl použit Shapirův-Wilkův test normality.

Při použití parametrického postupu odhadu referenčního intervalu byla dolní referenční mez (DRM), tj. 2,5. percentil pro ADMA  $0,36 \mu\text{mol l}^{-1}$  a pro SDMA  $0,40 \mu\text{mol l}^{-1}$  a horní referenční mez (HRM), tj. 97,5. percentil pro ADMA  $0,71 \mu\text{mol l}^{-1}$  a pro SDMA  $0,72 \mu\text{mol l}^{-1}$  (Tab. 19).

**Tab. 19: Referenční meze parametrickou metodou.**

	DRM (90% CI) ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	HRM (90% CI) ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )
ADMA	0,3564 (0,3159–0,3969)	0,7061 (0,6656–0,7466)
SDMA	0,4048 (0,3680–0,4416)	0,7224 (0,6856–0,7592)

DRM – dolní referenční mez, HRM – horní referenční mez, 90% CI – konfidenční interval s konfidenční úrovní 90 %, ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

Rozložení hodnot bylo podle Shapirova-Wilkova testu normální, test normality dosahoval u ADMA 0,9657 a u SDMA 0,9859.

Při použití neparametrického postupu pak byla DRM (2,5. percentil) pro ADMA 0,36  $\mu\text{mol l}^{-1}$  a pro SDMA 0,40  $\mu\text{mol l}^{-1}$  a HRM (97,5. percentil) pro ADMA 0,40  $\mu\text{mol l}^{-1}$  a pro SDMA 0,78  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (Tab. 20).

**Tab. 20: Referenční meze neparametrickou metodou.**

	<b>DRM</b> ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	<b>HRM</b> ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )
ADMA	0,3610	0,7778
SDMA	0,3999	0,7844

DRM – dolní referenční mez, HRM – horní referenční mez, ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

### 5.3.2 Pacienti s CKD

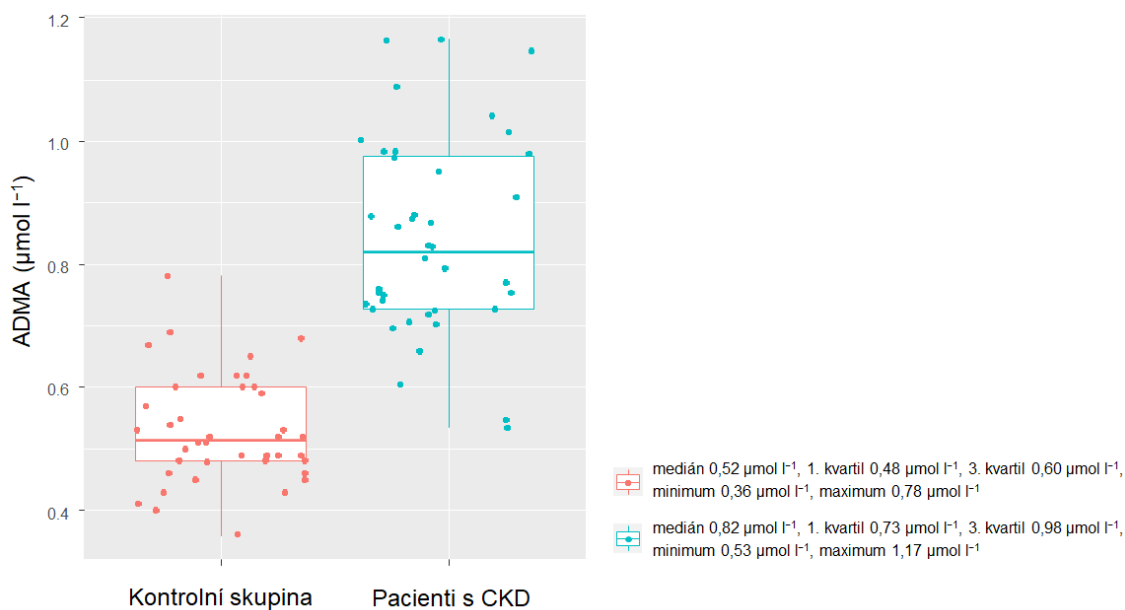
Průměrné koncentrace a další hodnoty skupiny pacientů s CKD jsou pro ADMA a SDMA shrnuty v Tab. 21.

**Tab. 21: Hodnoty ADMA a SDMA u pacientů s CKD.**

	<b>ADMA</b> ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )	<b>SDMA</b> ( $\mu\text{mol l}^{-1}$ )
Nejnižší hodnota	0,53	0,81
Nejvyšší hodnota	1,17	4,06
Aritmetický průměr	0,8410	2,1785
Medián	0,8198	2,1391
Směrodatná odchylka	0,1603	0,8783

ADMA – asymetrický dimethylarginin, SDMA – symetrický dimethylarginin

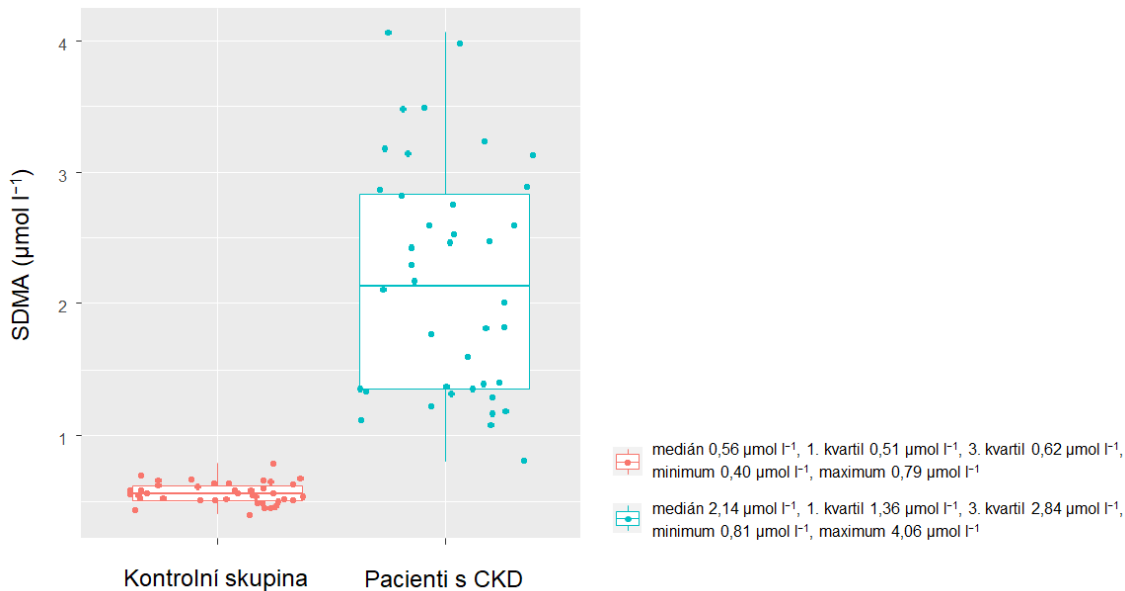
Porovnání koncentrací ADMA a SDMA mezi skupinou pacientů s CKD a kontrolní skupinou zdravých jedinců graficky znázorňuje Obr. 26 a Obr. 27.



**Obr. 26: Krabicový graf ADMA u kontrolní skupiny a pacientů s CKD.**

Spodní a horní hranice boxu označuje 1., respektive 3. kvartil, horizontální linie uvnitř boxu značí medián, linie nad a pod boxem vyjadřují variabilitu dat pod 1. a nad 3. kvartilem a reprezentují minimum a maximum všech dat.

ADMA – asymetrický dimethylarginin, CKD – chronické renální onemocnění



**Obr. 27: Krabicový graf SDMA u kontrolní skupiny a pacientů s CKD.**

Spodní a horní hranice boxu označuje 1., respektive 3. kvartil, horizontální linie uvnitř boxu značí medián, linie nad a pod boxem vyjadřují variabilitu dat pod 1. a nad 3. kvartilem a reprezentují minimum a maximum všech dat.

SDMA – symetrický dimethylarginin, CKD – chronické renální onemocnění

## 6 DISKUSE

Pro stanovení L-argininu a jeho derivátů v biologických vzorcích bylo vyvinuto velké množství metod. Mezi nejrozšířenější patří kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí po derivatizaci vzorku, kapilární elektroforéza, imunochemické stanovení metodou ELISA a v posledních letech hojně se rozšiřující metody využívající hmotnostní spektrometrie, a to ve spojení s plynovou chromatografií, kapalinovou chromatografií s derivatizací vzorku i bez derivatizace vzorku, nebo kapilární elektroforézou. Metody kapalinové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií využívají ionizace elektrosprejem a tandemové hmotnostní detekce v MRM módu s možností stanovovat specifické sloučeniny velmi přesně a s minimem šumu na pozadí. Při výběru vhodné metody stanovení L-argininu, ADMA a SDMA jsme vycházeli z možností naší instrumentace.

Byly popsány metody stanovení výše zmíněných analytů pomocí hmotnostní spektrometrie ve spojení s hydrofilní interakční chromatografií (HILIC), která je velmi vhodná pro separaci polárních látek bez derivatizace vzorku a velmi dobře kompatibilní s hmotnostní spektrometrií (D'Apolito et al., 2008; Martens-Lobenhoffer & Bode-Böger, 2012, 2007, 2006). Metoda bez derivatizace vzorku využívá MRM přechody hmoty pro L-arginin  $175 \rightarrow 60$  m/z nebo  $175 \rightarrow 70$  m/z, pro ADMA  $203 \rightarrow 46$  m/z a pro SDMA  $203 \rightarrow 172$  m/z (D'Apolito et al., 2008; Martens-Lobenhoffer et al., 2009; Martens-Lobenhoffer & Bode-Böger, 2012, 2007, 2006; Saigusa et al., 2011; Shek et al., 2006). ADMA a SDMA poskytují protonovaný ion se stejným m/z (175 m/z), mají společné přechody hmoty, a tedy i fragmentové ionty kromě jedinečných fragmentů 46 m/z (ADMA) a 172 m/z (SDMA), kterých se využívá v kvantifikaci. Saigusa et al. (2011) použili pro kvantifikaci ADMA i SDMA přechod hmoty  $203 \rightarrow 70$  m/z se společným fragmentem pro oba dva analyty. Jednalo se sice o fragment s nejvyšší intenzitou, bylo však nutné úplné rozdělení ADMA a SDMA při chromatografické separaci. To značně prodloužilo dobu analýzy a potenciál hmotnostní spektrometrie nebyl plně využit.

Vzhledem k dostupné instrumentaci na našem pracovišti jsme museli zvolit metodu s derivatizací vzorku. Iontová past není schopna zachytit fragmentový ion s m/z nižším, než je  $1/3$  m/z prekurzorového iontu. Proto jsme nemohli jedinečný fragmentový ion 46 m/z pro ADMA použít pro jeho stanovení a rozhodli jsme se pro úpravu molekuly esterifikací 1-butanolem při derivatizaci vzorku. V literatuře uváděné přechody hmoty jsou pro butylestery L-argininu  $231 \rightarrow 70$  m/z, ADMA  $259 \rightarrow 214$  m/z a SDMA

259→228 m/z s jedinečnými fragmenty 214 m/z pro ADMA a 228 m/z pro SDMA (Boelaert et al., 2016; Davids et al., 2012; Schwedhelm et al., 2007). Butylestery ADMA a SDMA poskytují protonovaný ion se stejným m/z (259 m/z) a shodnými přechody hmoty kromě přechodu charakterizovaného ztrátou -45 odpovídajícím dimethylaminu u ADMA (259→214 m/z) a -31 odpovídajícím methylaminu u SDMA (259→228 m/z). Pro stanovení L-argininu jsme použili fragment 214 m/z (přechod 231→214 m/z) o vysoké intenzitě, pro stanovení ADMA a SDMA jedinečných fragmentů 214 m/z (ADMA) a 228 m/z (SDMA).

Na trhu je dostupných mnoho rozdílných interních standardů značených stabilními izotopy. Pro L-arginin jsme jako IS použili L-arginin-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>. Pro ADMA a SDMA jsme zvolili ADMA-d<sub>6</sub> a SDMA-d<sub>6</sub> s deuterovanými methylovými skupinami na guanidinové skupině. Stejná hodnota m/z prekursorového iontu ADMA-d<sub>6</sub> a SDMA-d<sub>6</sub> (265 m/z) umožnila v jedné MRM reakci stanovovat jedinečné fragmentové ionty 214 m/z (ADMA-d<sub>6</sub>) a 231 m/z (SDMA-d<sub>6</sub>) současně. Sledování přechodů hmoty v segmentu 3 jen pro dva prekursorové ionty, tedy 259 m/z pro ADMA a SDMA a 265 m/z pro IS ADMA-d<sub>6</sub> a SDMA-d<sub>6</sub>, znamenalo při dané frekvenci sběru dat zvýšení počtu bodů pro vykreslení píků sledovaných fragmentů v EIC.

Základem pro experimentální část zavedení LC-MS/MS metody byla práce Boelaerta et al. (2016), kteří použili UHPLC-MS/MS systém s trojitým kvadrupólem se separací na UPLC BEH C18 koloně (1,7 μm, 100 × 2,1 mm). Autoři však stanovovali pouze ADMA a SDMA.

Vzhledem k odlišné instrumentaci, použité koloně a stanovení L-argininu, jsme museli upravit podmínky eluce. Boelaert et al. použili v počáteční fázi 15 % mobilní fáze A a 85 % B, po dobu 3,5 minut, následovalo přepnutí na 100 % A po dobu 1,5 min a reekvilibrace po dobu 5 min, celková doba analýzy byla 10 minut, retenční čas ADMA byl 3,7 min a SDMA 3,9 min. V této práci byla použita gradientová eluce na koloně Kinetex HPLC C18 (2,6 μm, 50 × 2,1 mm) s počátečním složením mobilní fáze 10 % A a 90 % B s lineárním gradientem do 100 % mobilní fáze A po dobu 3 minut, dostatečnou pro eluci sledovaných analytů i vymytí kolony. Následoval návrat k počátečnímu složení mobilní fáze a ekvilibrace kolony. Při použití kratší kolony spolu s odlišným gradientem byly výsledné retenční časy L-argininu 1,2 min, ADMA 1,8 min a SDMA 1,9 min. Dostatečné rozdíly v retenčních časech L-argininu a jeho dimethylderivátů nám umožnily analyzovat tyto látky se specifickým nastavením parametrů fragmentace v odlišných



segmentech, L-arginin v segmentu 2 a ADMA a SDMA v segmentu 3. Zároveň došlo k urychlení separace a zkrácení celkové doby analýzy.

Při přípravě vzorku jsme vycházeli z práce Boelaerta et al. (2016), kteří prováděli deproteinaci denaturací teplem při 90 °C po dobu 30 minut a ultrafiltrací. Autoři však porovnávali běžně stanovenou celkovou koncentraci ADMA a SDMA, tedy včetně dimethylderivátů L-argininu vázaných na proteiny, a koncentraci ADMA a SDMA ve volné frakci za účelem určení procentuálního podílu těchto látek vázaných na proteiny. To ovšem nebylo cílem této práce, a proto jsme zvolili jednodušší metodu deproteinace, a to pomocí denaturace acetonitrilem. K vzorku plazmy s interním standardem jsme tedy místo vody přidali acetonitril a po promíchání a centrifugaci jsme supernatant převedli do čisté zkumavky a odpařili dosucha. Boelaert s kolegy před derivatizací připravovali vždy čerstvé vlastní činidlo 1 mol l<sup>-1</sup> HCl v 1-butanolu, zatímco my jsme pro derivatizaci použili komerčně dostupné derivatizační činidlo 3 mol l<sup>-1</sup> HCl v 1-butanolu. Davids et al. (2012) ve své práci použili derivatizační činidlo 1,25 mol l<sup>-1</sup> HCl v 1-butanolu. Vzorky jsme připravovali stejně jako Boelaert et al. v den analýzy.

Validace byla provedena na základě Guidance for Industry: Bioanalytical method Validation guidelines (U.S. Food and Drug Administration, 2020). Testovali jsme linearitu, limit detekce, limit kvantifikace, preciznost, přesnost a vliv matrice vzorku.

Linearitu jsme ověřovali u L-argininu, ADMA i SDMA v rozmezí koncentrací L-argininu 2,5–500 μmol l<sup>-1</sup>, ADMA a SDMA 0,05–10 μmol l<sup>-1</sup>. Všechny kalibrační křivky byly lineární v celém sledovaném rozsahu koncentrací s koeficientem determinace > 0,999. Boelaert et al. (2016) ověřovali linearitu v rozsahu koncentrací 0,1–1,48 μmol l<sup>-1</sup> pro ADMA a 0,1–4,94 μmol l<sup>-1</sup> pro SDMA s koeficientem determinace ≥ 0,99. Schwedhelm et al. (2007) dosáhli koeficientů determinace 0,999 u L-argininu a ADMA a 0,992 u SDMA v rozsahu koncentrací 0,5–250 μmol l<sup>-1</sup> pro L-arginin a 0,05–4,0 μmol l<sup>-1</sup> pro ADMA a SDMA. Davids et al. (2012) ověřili linearitu metody v koncentračním rozsahu 10–500 μmol l<sup>-1</sup> pro L-arginin a 0,1–5,0 μmol l<sup>-1</sup> pro ADMA a SDMA s koeficientem determinace > 0,998 pro všechny analyty.

Limit detekce a limit kvantifikace jsme určovali pro ADMA a SDMA. Pro L-arginin jsme LOD a LOQ neurčovali, protože běžné koncentrace L-argininu v lidské plazmě jsou o dva řády vyšší než koncentrace ADMA a SDMA a pohybují se v koncentračních hladinách dalece převyšujících LOD a LOQ pro L-arginin uváděné u ostatních autorů. LOD byl pro ADMA i SDMA 0,01 μmol l<sup>-1</sup> a LOQ byl pro ADMA i SDMA

0,04  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Hodnota LOQ pro ADMA i SDMA se nacházela pod nejnižším bodem kalibrační křivky pro oba analyty (0,2  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ).

Námi zjištěné LOD a LOQ jsou podobné jako u jiných autorů, kteří dosáhli hodnot LOD 0,0079  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro ADMA a 0,0064  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro SDMA (Boelaert et al., 2016), 0,4  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro L-arginin, 0,02  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro ADMA a 0,01  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro SDMA bez derivatizace vzorku (Martens-Lobenhoffer & Bode-Böger, 2006) a 0,5  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro L-arginin, 0,003  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro ADMA a 0,005  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro SDMA u HILIC metody (Martens-Lobenhoffer & Bode-Böger, 2012).

U hodnot LOQ pak jednotliví autoři uvádějí koncentrace 0,024  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro ADMA a 0,019  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro SDMA (Boelaert et al., 2016), 7,5  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro L-arginin, 0,15  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro ADMA a 0,20  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro SDMA bez derivatizace vzorku (Davids et al., 2012), 0,06  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro všechny analyty (Servillo et al., 2013) a 7,5  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro L-arginin, 0,15  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro ADMA a 0,20  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro SDMA u HILIC metody (Martens-Lobenhoffer & Bode-Böger, 2012).

Preciznost a přesnost stanovení L-argininu a jeho dimethylderivátů ADMA a SDMA jsme testovali pomocí kontrolních vzorků se třemi hladinami koncentrací L-argininu, ADMA a SDMA. U všech kontrolních vzorků se opakovatelnost pohybovala v rozmezí 3,79–4,80 % a mezilehlá preciznost 5,29–8,65 %. Přesnost, respektive nepřesnost, vyjádřená jako relativní chyba byla  $\leq 7,62$  %.

Boelaert et al. (2016) uvádějí opakovatelnost 1,93–3,48 %, mezilehlou preciznost 5,25–10,93 % a nepřesnost  $\leq 12,35$  %. Davids et al. (2012) dosáhli opakovatelnosti  $\leq 3,5$  % a mezilehlé preciznosti  $\leq 9,6$  %. Martens-Lobenhoffer a Bode-Böger (2012) uvádějí u metody HILIC opakovatelnost 0,73–3,75 %, mezilehlou preciznost 3,22–6,09 % a nepřesnost  $\leq 7,21$  %, zatímco D'Apolito et al. (2008) uvádějí také u metody HILIC opakovatelnost i mezilehlou preciznost 2,3–8,4 % a nepřesnost  $\leq 8,7$  %.

Vliv matrice vzorku jsme ověřovali za pomoci kalibračních křivek sestrojených ve vodě a v matrici pro L-arginin, ADMA i SDMA. Rozdíl mezi směnicemi regresní přímky kalibrační křivky sestrojené z kalibrátorů připravených ve vodě a v matrici nebyl u žádného z analytů významný. Rozdíl mezi interceptem nelze hodnotit, protože jsme pro sestavení kalibrační křivky v plazmě použili metodu standardních přídavek. L-arginin a jeho deriváty se fyziologicky vyskytují v plazmě, a proto plazma bez jejich obsahu není k dispozici.

Míra variability směrnice přímek vyjádřená variačním koeficientem byla u L-argininu 1,20 %, ADMA 0,26 % a SDMA 1,58 %. Matuszewski (2006) uvádí, že variabilita směrnice regresní přímky mezi kalibrační křivkou připravenou z vodných roztoků a kalibrační křivkou v matrici vyjádřená jako variační koeficient by neměla být vyšší než 3–4 %. Martens-Lobenhoffer a Bode-Böger (2012) při použití HILIC uvádějí relativní diferenci mezi směrnici kalibračních přímek 0,84 % pro L-arginin, 2,24 % pro ADMA a 1,28 % pro SDMA. Při použití izotopicky značených interních standardů pro každý analyt bylo stanovení L-argininu, ADMA a SDMA na matrici nezávislé, vliv matrice vzorku nebyl u žádného z těchto analytů významný.

Stabilitu vzorků při opakovaném zmrazení a rozmrazení jsme ověřovali na kontrolních vzorcích se třemi hladinami koncentrací ADMA a SDMA. Míra variability koncentrací mezi jednotlivými cykly vyjádřená jako variační koeficient byla  $\leq 6,82$  %, z čehož vyplývá, že vzorky byly stabilní i po čtyřech cyklech zmrazení a rozmrazení. Ke stejnému závěru dospěli i Valtonen et al. (2005).

Pro porovnání vzorků plazmy a séra jsme použili vzorky od klinicky heterogenní skupiny 27 jedinců. Průměrná koncentrace ADMA byla v plazmě  $0,60 \pm 0,14 \mu\text{mol l}^{-1}$  a v séru  $0,60 \pm 0,15 \mu\text{mol l}^{-1}$ , koncentrace SDMA byla v plazmě  $0,98 \pm 0,58 \mu\text{mol l}^{-1}$  a v séru  $0,99 \pm 0,60 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Korelační koeficient pro ADMA byl 0,890 a pro SDMA 0,988, což ukazuje na velmi silnou korelaci mezi koncentracemi ve vzorcích plazmy a séra. Dosud nebyla publikována žádná studie zabývající se porovnáním vzorků plazmy a séra metodou LC-MS/MS. Schulze et al. (2004) porovnávali koncentrace ADMA metodou ELISA ze vzorků plazmy a séra u 15 zdravých jedinců a zjistili lehce nižší koncentrace v lidské plazmě oproti séru, nicméně tento rozdíl nebyl statisticky významný, podobně jako v naší práci prokázali silnou korelaci 0,878. Teerlink et al. (2002) porovnávali koncentrace ADMA a SDMA ve vzorcích plazmy a séra od 10 zdravých dobrovolníků metodou HPLC-FL a nenalezli signifikantní rozdíl pro ADMA, ale u SDMA byly koncentrace v séru o 2 % vyšší než v heparinové plazmě. Horowitz a Heresztyn (2007) nepozorovali mezi plazmou a sérem od 5 jedinců u ADMA žádný významný rozdíl, a to jak při použití metody HPLC ( $0,57 \pm 0,10 \mu\text{mol l}^{-1}$  a  $0,56 \pm 0,10 \mu\text{mol l}^{-1}$ ), tak metodou ELISA ( $0,73 \pm 0,17 \mu\text{mol l}^{-1}$  a  $0,72 \pm 0,16 \mu\text{mol l}^{-1}$ ). U SDMA uvádějí, že koncentrace se nezdá být ovlivněna typem odběru. Všichni tito autoři však porovnávali vzorky séra a plazmy od zdravých jedinců a velikost souboru těchto jedinců byla nižší než v našem experimentu.

Zavedenou metodu LC-MS/MS jsme porovnali s komerčně dostupnou metodu ELISA a HPLC-FL jak pro ADMA, tak pro SDMA. Pro porovnání jsme použili vzorky od 40 dobrovolných dárců krve a 40 pacientů s CKD, aby rozmezí koncentrací zahrnovalo jak nízké hodnoty u zdravé populace, tak vysoké hodnoty u pacientů s renálním onemocněním.

Při porovnání LC-MS/MS s metodou ELISA jsme dosáhli silné korelace 0,858 u ADMA a 0,801 u SDMA. Boelaert et al. (2016) dosáhli u 87 vzorků séra o trochu horších výsledků 0,78 u ADMA a 0,72 u SDMA. Stejně tak Pecchini et al. (2012) zjistili středně silnou korelaci 0,69. Naopak velmi silné korelace 0,984 mezi LC-MS/MS a ELISA dosáhli při analýze 29 vzorků Schulze et al (2004) u ADMA. Horowitz a Heresztyn (2007) uvádějí ve své práci u 60 vzorků plazmy a séra u ADMA středně silnou korelaci 0,69 mezi metodou ELISA a HPLC a upozorňují na nadhodnocení výsledků stanovených metodou ELISA.

Korelace mezi nově zavedenou metodou LC-MS/MS a metodou ELISA byla silnější než mezi dříve zavedenou metodu HPLC-FL a ELISA, kdy jsme dosáhli korelačních koeficientů 0,571 u ADMA a 0,735 u SDMA (Prokop, 2017). Široká et al. (2007) ve své práci uvádějí mezi metodou HPLC-FL a ELISA velmi silnou korelaci 0,944 u ADMA, naopak Valtonen et al. (2005) neprokázali korelaci žádnou (0,0972).

Metodou ELISA vychází koncentrace ADMA vyšší než metodou LC-MS/MS, ELISA má tendenci výsledky nadhodnocovat. Se vzrůstající koncentrací ADMA vzrůstá rozdíl mezi oběma metodami. Relativní diference mezi průměrnou hodnotou koncentrace ADMA u LC-MS/MS ( $0,6861 \pm 0,2022 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) a ELISA ( $0,8815 \pm 0,3357 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) je 25 %. Schulze et al. (2006) uvádějí při porovnání 29 vzorků séra nadhodnocení výsledků ADMA metodou ELISA přibližně o 15 %. Martens-Lobenhoffer et al. (2005) dokonce uvádí relativní diferenci u různých skupin vzorků v průměru okolo 50 %. Také Pecchini et al. (2012) ve své práci poukazují na vzrůstající nadhodnocení výsledků se vzrůstající koncentrací ADMA.

Zavedenou metodu LC-MS/MS jsme porovnávali také s metodu HPLC-FL, kdy jsme dosáhli korelačních koeficientů 0,883 pro ADMA a 0,952 pro SDMA a prokázali jsme silnou korelaci obou metod. Podobné výsledky uvádějí i Davis et al. (2012), kteří dosáhli velmi silné korelace 0,9327 u ADMA a 0,9125 u SDMA.

Hodnoty koncentrací ADMA a SDMA u zdravé populace se v různých publikacích poměrně liší. Většina autorů uvádí jen průměrné naměřené koncentrace, což je dáno vyšetřením velmi malého počtu vzorků kontrolní skupiny získaných od dobrovolníků bez

definovaného stavu zdraví převážně z řad spolupracovníků autorů. Bylo proto nutné, určit si vlastní koncentrace ADMA a SDMA u kontrolní skupiny zdravých jedinců.

V naší práci jsme stanovovali koncentrace ADMA a SDMA u výběrové referenční populace dobrovolných dárců krve. Při použití parametrické metody jsme získali referenční interval 0,36–0,71  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro ADMA a 0,40–0,72  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro SDMA, při použití neparametrické metody 0,36–0,078  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro ADMA a 0,40–0,78  $\mu\text{mol l}^{-1}$  pro SDMA. Výsledky obou metod jsou podobné, liší se jen v mírně vyšší horní referenční mezi, a to pro oba analyty. Tyto nepatrné rozdíly jsou důsledkem toho, že i naše výběrová referenční populace obsahuje jen 40 jedinců, pro přesnější určení referenčních mezí by bylo potřeba většího počtu jedinců s podrobněji definovanými kritérii referenční populace. Za tímto účelem by bylo třeba provést samostatnou studii.

Koncentrace ADMA a SDMA jsme dále stanovovali u skupiny 40 pacientů s různým stupněm chronického renálního selhání (CKD). Průměrná koncentrace byla pro ADMA  $0,84 \pm 0,16 \mu\text{mol l}^{-1}$  a pro SDMA  $2,18 \pm 0,88 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Jak je patrné z krabicových grafů, jsou boxy s hodnotami ADMA a SDMA elevované ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých jedinců. Porovnání koncentrací ADMA a SDMA mezi skupinou pacientů s CKD a kontrolní skupinou ( $0,53 \pm 0,09 \mu\text{mol l}^{-1}$  u ADMA a  $0,56 \pm 0,08 \mu\text{mol l}^{-1}$  u SDMA) ukazuje zvýšení hladin obou stanovovaných látek u pacientů s CKD.

Námi zjištěné koncentrace ADMA a SDMA u pacientů s CKD se shodují s výsledky publikovanými jinými autory. Boelaert et al. (2016) prokázali významné zvýšení koncentrací ADMA a SDMA u pacientů s CKD ve stádiu 5 ( $n = 77$ ). Určili průměrnou koncentraci ADMA  $0,84 \pm 0,19 \mu\text{mol l}^{-1}$  a SDMA  $2,06 \pm 0,82 \mu\text{mol l}^{-1}$  v porovnání s koncentrací ADMA  $0,52 \pm 0,07 \mu\text{mol l}^{-1}$  a SDMA  $0,59 \pm 0,13 \mu\text{mol l}^{-1}$  u kontrolní skupiny ( $n = 10$ ). Wang et al. (2007) sledovali koncentraci ADMA a SDMA u dětí s CKD ve stádiu 2 nebo 3 a prokázali významné rozdíly hladin ADMA a SDMA mezi dětmi s CKD a kontrolní skupinou. Plazmatické koncentrace byly u dětí s CKD ( $n = 28$ )  $1,10 \pm 0,35 \mu\text{mol l}^{-1}$  ADMA a  $2,06 \pm 1,11 \mu\text{mol l}^{-1}$  SDMA a  $0,78 \pm 0,16 \mu\text{mol l}^{-1}$  ADMA a  $0,71 \pm 0,23 \mu\text{mol l}^{-1}$  SDMA u kontrolní skupiny ( $n = 10$ ). Anderstam et al. (1997) stanovili metodou HPLC-FL koncentrace ADMA a SDMA u pacientů s kontinuální ambulantní peritoneální dialýzou ( $n = 11$ )  $0,70 \pm 0,27 \mu\text{mol l}^{-1}$  ADMA a  $2,54 \pm 0,59 \mu\text{mol l}^{-1}$  SDMA a u pacientů s hemodialýzou ( $n = 19$ )  $0,59 \pm 0,27 \mu\text{mol l}^{-1}$  ADMA a  $2,85 \pm 0,77 \mu\text{mol l}^{-1}$  SDMA oproti hladinám  $0,36 \pm 0,08 \mu\text{mol l}^{-1}$  ADMA a  $0,37 \pm 0,11 \mu\text{mol l}^{-1}$  SDMA u kontrolní skupiny ( $n = 7$ ).

## 7 ZÁVĚR

Byla zavedena a optimalizována metoda ultravysokoúčinné kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií pro stanovení L-argininu a jeho methylovaných derivátů ADMA a SDMA s předkolonovou derivatizací 1-butanolem. Tato metoda má velmi dobré analytické vlastnosti splňující podmínky pro validaci a je srovnatelná s metodami jiných autorů. Při porovnání s komerčně dostupnou metodou ELISA a na pracovišti již dříve zavedenou metodou HPLC s fluorescenční detekcí byla prokázána silná korelace mezi těmito metodami. Zavedená metoda byla použita k určení referenčních mezí ADMA a SDMA u kontrolního souboru dobrovolných dárců krve a pro stanovení ADMA a SDMA u pacientů s chronickým renálním selháním. Hodnoty koncentrací těchto dvou skupiny byly porovnány navzájem i s výsledky prací ostatních autorů, se kterými jsou ve shodě.

## POUŽITÉ ZKRATKY

90% CI	konfidenční interval s konfidenční úrovní 90 %
95% CI	konfidenční interval s konfidenční úrovní 95 %
ADMA	asymetrický dimethylarginin, $N^G, N^G$ -dimethyl-L-arginin
AGAT	arginin:glycin amidinotransferasa
AGXT2	alaninglyoxylátaminotransferasa 2
BH <sub>4</sub>	tetrahydrobiopterin
CaM	kalmodulin
CAT	transportér kationtových aminokyselin
CID	kolizí vyvolaná disociace
cNOS	konstituční NO synthasa
CV	variační koeficient
DDAH	dimethylarginindimethylaminohydrolasa
DMA	dimethylamin
DMGV	$\alpha$ -keto- $\delta$ -( $N,N$ -dimethylguanidino)valerová kyselina
DRM	dolní referenční mez
EIC	extrahovaný iontový chromatogram
ELISA	enzymová imunoanalýza na imunosorbentech
eNOS	endoteliální NO synthasa
E <sub>r</sub>	relativní chyba
FAD	flavinadenindinukleotid
FITC	fluorescein-5-isothiokyanát
FMN	flavinmononukleotit
HDL	lipoproteiny o vysoké hustotě
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPLC-FL	vysokoúčinná kapalinová chromatografie s fluorescenční detekcí
HRM	horní referenční mez
ICC	řízení iontového náboje
ICHS	ischemická choroba srdeční
iNOS	inducibilní NO synthasa
IS	interní standard
LC-MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LDL	lipoproteiny o nízké hustotě
MMA	monomethylarginin, $N^G$ -monomethyl-L-arginin
MP A	mobilní fáze A
MP B	mobilní fáze B
MRM	monitorování více reakcí
MS	hmotnostní spektrometrie
MS <sup>2</sup>	dvoustupňová tandemová hmotnostní spektrometrie
MS <sup>n</sup>	n-stupňová tandemová hmotnostní spektrometrie
NADP	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NF- $\kappa$ B	nukleární faktor kappa B
nNOS	neuronální NO syntasa
NOS	NO syntasa, nitroxidsyntasa
OPA/MPA	derivatizační činidlo <i>ortho</i> -ftaldialdehydu a 3-merkpto-propionové kyseliny
PRMT I	protein-arginin methyltransferasa typu I
PRMT II	protein-arginin methyltransferasa typu II
PRMT	protein-arginin methyltransferasa
QC	kontrola kvality
QC-H	kontrolní vzorek s vysokou hladinou koncentrací sledovaných analytů
QC-L	kontrolní vzorek s nízkou hladinou koncentrací sledovaných analytů
QC-M	kontrolní vzorek se střední hladinou koncentrací sledovaných analytů
ROS	reaktivní formy kyslíku
SD	směrodatná odchylka
SDMA	symetrický dimethylarginin, $N^G, N^{G'}$ -dimethyl-L-arginin
$t_R$	retenční čas
UHPLC-MS/MS	ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií



## POUŽITÁ LITERATURA

Aldámiz-Echevarría, L., Andrade, F., 2012. Asymmetric dimethylarginine, endothelial dysfunction and renal disease. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 11288–11311. <https://doi.org/10.3390/ijms130911288>

Anderstam, B., Katzarski, K., Bergström, J., 1997. Serum levels of NG, NG-dimethyl-L-arginine, a potential endogenous nitric oxide inhibitor in dialysis patients. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8, 1437–1442.

Arlouskaya, Y., Sawicka, A., Głowała, M., Giebułtowicz, J., Korytowska, N., Tałałaj, M., Nowicka, G. zyna, Wrzosek, M., 2019. Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Symmetric Dimethylarginine (SDMA) Concentrations in Patients with Obesity and the Risk of Obstructive Sleep Apnea (OSA). *J. Clin. Med.* 8, 897. <https://doi.org/10.3390/jcm8060897>

Bode-Böger, S.M., Scalera, F., Ignarro, L.J., 2007. The L-arginine paradox: Importance of the L-arginine/asymmetrical dimethylarginine ratio. *Pharmacol. Ther.* 114, 295–306. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.03.002>

Bode-Böger, S.M., Scalera, F., Kielstein, J.T., Martens-Lobenhoffer, J., Breithardt, G., Fobker, M., Reinecke, H., 2006. Symmetrical dimethylarginine: a new combined parameter for renal function and extent of coronary artery disease. *J. Am. Soc. Nephrol.* 17, 1128–1134. <https://doi.org/10.1681/ASN.2005101119>

Boelaert, J., Schepers, E., Glorieux, G., Eloot, S., Vanholder, R., Lynen, F., 2016. Determination of Asymmetric and Symmetric Dimethylarginine in Serum from Patients with Chronic Kidney Disease: UPLC-MS/MS versus ELISA. *Toxins* 8, 149. <https://doi.org/10.3390/toxins8050149>

Böger, R.H., 2008. All about ADMA: A novel risk factor is discovered, 2nd ed. DLD Diagnostika, Hamburg.

Böger, R.H., 2004. Asymmetric dimethylarginine, an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase, explains the “L-arginine paradox” and acts as a novel cardiovascular risk factor. *J. Nutr.* 134, 2842S-2847S; discussion 2853S.

Böger, R.H., Bode-Böger, S.M., Szuba, A., Tsao, P.S., Chan, J.R., Tangphao, O., Blaschke, T.F., Cooke, J.P., 1998. Asymmetric dimethylarginine (ADMA): A novel risk

factor for endothelial dysfunction. *Circulation* 98, 1842–1847.  
<https://doi.org/10.1161/01.CIR.98.18.1842>

Böger, R.H., Ron, E.S., 2005. L-Arginine improves vascular function by overcoming deleterious effects of ADMA, a novel cardiovascular risk factor. *Altern. Med. Rev. J. Clin. Ther.* 10, 14–23.

Burtis, C.A., Ashwood, E.R., Bruns, D.E., Tietz, N.W. (Eds.), 2013. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*, 5th ed. Saunders, St. Louis, MO.

Busch, M., Fleck, C., Wolf, G., Stein, G., 2006. Asymmetrical (ADMA) and symmetrical dimethylarginine (SDMA) as potential risk factors for cardiovascular and renal outcome in chronic kidney disease – possible candidates for paradoxical epidemiology? *Amino Acids* 30, 225–232. <https://doi.org/10.1007/s00726-005-0268-8>

Chen, S., Li, N., Deb-Chatterji, M., Dong, Q., Kielstein, J.T., Weissenborn, K., Worthmann, H., 2012. Asymmetric Dimethylarginine as marker and mediator in Ischemic stroke. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 15983–16004. <https://doi.org/10.3390/ijms131215983>

D’Apolito, O., Paglia, G., Tricarico, F., Garofalo, D., Pilotti, A., Lamacchia, O., Cignarelli, M., Corso, G., 2008. Development and validation of a fast quantitative method for plasma dimethylarginines analysis using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.* 41, 1391–1395.  
<https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2008.08.075>

Davids, M., Swieringa, E., Palm, F., Smith, D.E.C., Smulders, Y.M., Scheffer, P.G., Blom, H.J., Teerlink, T., 2012. Simultaneous determination of asymmetric and symmetric dimethylarginine, L-monomethylarginine, L-arginine, and L-homoarginine in biological samples using stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 900, 38–47. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.05.025>

Emrich, I.E., Zawada, A.M., Martens-Lobenhoffer, J., Fliser, D., Wagenpfeil, S., Heine, G.H., Bode-Böger, S.M., 2018. 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.* 107, 201–213. <https://doi.org/10.1007/s00392-017-1172-4>

- Feng, C., 2012. Mechanism of Nitric Oxide Synthase Regulation: Electron Transfer and Interdomain Interactions. *Coord. Chem. Rev.* 256, 393–411. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.10.011>
- Fleck, C., Schweitzer, F., Karge, E., Busch, M., Stein, G., 2003. Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases. *Clin. Chim. Acta* 336, 1–12.
- Horowitz, J.D., Heresztyn, T., 2007. An overview of plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine (ADMA) in health and disease and in clinical studies: Methodological considerations. *J. Chromatogr. B, Analysis of the L-Arginine/NO Pathway* 851, 42–50. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.09.023>
- Hu, X.L., Li, M.P., Song, P.Y., Tang, J., Chen, X.P., 2017. AGXT2: An unnegligible aminotransferase in cardiovascular and urinary systems. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 113, 33–38. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2017.09.010>
- Kielstein, J.T., Fliser, D., 2007. The past, presence and future of ADMA in nephrology. *Nephrol. Ther.* 3, 47–54. <https://doi.org/10.1016/j.nephro.2007.02.002>
- Kielstein, J.T., Veldink, H., Martens-Lobenhoffer, J., Haller, H., Burg, M., Lorenzen, J.M., Lichtinghagen, R., Bode-Böger, S.M., Kliem, V., 2011. SDMA is an early marker of change in GFR after living-related kidney donation. *Nephrol. Dial. Transplant.* 26, 324–328. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfq395>
- Krzystek-Korpaczka, M., Wiśniewski, J., Fleszar, M.G., Bednarz-Misa, I., Bronowicka-Szydełko, A., Gacka, M., Masłowski, L., Kędzior, K., Witkiewicz, W., Gamian, A., 2019. Metabolites of the Nitric Oxide (NO) Pathway Are Altered and Indicative of Reduced NO and Arginine Bioavailability in Patients with Cardiometabolic Diseases Complicated with Chronic Wounds of Lower Extremities: Targeted Metabolomics Approach (LC-MS/MS). *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/5965721>
- Lai, W.K.C., Kan, M.Y., 2015. Homocysteine-Induced Endothelial Dysfunction. *Ann. Nutr. Metab.* 67, 1–12. <https://doi.org/10.1159/000437098>
- Markowski, P., Baranowska, I., Baranowski, J., 2007. Simultaneous determination of L-arginine and 12 molecules participating in its metabolic cycle by gradient RP-HPLC

method: Application to human urine samples. *Anal. Chim. Acta* 605, 205–217. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2007.10.033>

Martens-Lobenhoffer, J., Bode-Böger, S.M., 2015. Amino acid N-acetylation: Metabolic elimination of symmetric dimethylarginine as symmetric N $\alpha$ -acetyldimethylarginine, determined in human plasma and urine by LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B* 975, 59–64. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.11.009>

Martens-Lobenhoffer, J., Bode-Böger, S.M., 2012. Quantification of L-arginine, asymmetric dimethylarginine and symmetric dimethylarginine in human plasma: A step improvement in precision by stable isotope dilution mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* 904, 140–143. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.07.021>

Martens-Lobenhoffer, J., Bode-Böger, S.M., 2007. Chromatographic-mass spectrometric methods for the quantification of L-arginine and its methylated metabolites in biological fluids. *J. Chromatogr. B* 851, 30–41. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.07.038>

Martens-Lobenhoffer, J., Bode-Böger, S.M., 2006. Fast and Efficient Determination of Arginine, Symmetric Dimethylarginine, and Asymmetric Dimethylarginine in Biological Fluids by Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* 52, 488–493. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.060152>

Martens-Lobenhoffer, J., Schwedhelm, E., Tsikas, D., 2009. Quantification of arginine and its mono- and dimethylated analogs NMMA, ADMA and SDMA in biological fluids by LC-MS/MS: Is LC superfluous? *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 877. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.07.003>

Martens-Lobenhoffer, J., Westphal, S., Awiszus, F., Bode-Böger, S.M., Luley, C., 2005. Determination of asymmetric dimethylarginine: liquid chromatography-mass spectrometry or ELISA? *Clin. Chem.* 51, 2188–2189. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2005.056788>

Masopust, J., Průša, R., 2003. *Patobiochemie buňky*, 1. ed. Univerzita Karlova, Praha.

Matuszewski, B.K., 2006. Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 830, 293–300. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.11.009>

Meinitzer, A., Puchinger, M., Winklhofer-Roob, B.M., Rock, E., Ribalta, J., Roob, J.M., Sundl, I., Halwachs-Baumann, G., März, W., 2007. Reference values for plasma

concentrations of asymmetrical dimethylarginine (ADMA) and other arginine metabolites in men after validation of a chromatographic method. *Clin. Chim. Acta* 384, 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.07.006>

Oliva-Damaso, E., Oliva-Damaso, N., Rodriguez-Esparragon, F., Payan, J., Baamonde-Laborda, E., Gonzalez-Cabrera, F., Santana-Estupiñan, R., Rodriguez-Perez, J.C., 2019. Asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA) dimethylarginines in chronic kidney disease: A clinical approach. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20153668>

Oner-Iyidogan, Y., Oner, P., Kocak, H., Gurdol, F., Bekpinar, S., Unlucerci, Y., Caliskan, Y., Cetinalp-Demircan, P., Kocak, T., Turkmen, A., 2009. Dimethylarginines and inflammation markers in patients with chronic kidney disease undergoing dialysis. *Clin. Exp. Med.* 9, 235–241. <https://doi.org/10.1007/s10238-009-0035-3>

Papageorgiou, N., Androulakis, E., Papaioannou, S., Charalambos Antoniadis, , Tousoulis, D., 2017. Homoarginine in the shadow of asymmetric dimethylarginine: from nitric oxide to cardiovascular disease. *Amino Acids* 47, 1741–1750. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2017-y>

Pecchini, P., Malberti, F., Mieth, M., Quinn, R., Tripepi, G., Mallamaci, F., Maas, R., Zoccali, C., Ravani, P., 2012. Measuring asymmetric dimethylarginine (ADMA) in CKD: a comparison between enzyme-linked immunosorbent assay and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Nephrol.* 25, 1016–1022. <https://doi.org/10.5301/jn.5000085>

Pilz, S., Meinitzer, A., Gaksch, M., Grübler, M., Verheyen, N., Drechsler, C., Hartaigh, B. ó, Lang, F., Alesutan, I., Voelkl, J., März, W., Tomaschitz, A., 2015. Homoarginine in the renal and cardiovascular systems. *Amino Acids* 47, 1703–1713. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-1993-2>

Pope, A.J., Karuppiah, K., Cardounel, A.J., 2009. Role of the PRMT–DDAH–ADMA axis in the regulation of endothelial nitric oxide production. *Pharmacol. Res., The DDAH-ADMA pathway* 60, 461–465. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.07.016>

Prokop, P., 2017. Stanovení symetrického a asymetrického dimethylargininu v lidské plazmě metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (Bakalářská práce). Univerzita Karlova, Hradec Králové.

- Rodionov, R.N., Martens-Lobenhoffer, J., Brilloff, S., Burdin, D.V., Jarzebska, N., Demyanov, A.V., Hohenstein, B., Weiss, N., Bode-Böger, S.M., 2016. Acetylation of asymmetric and symmetric dimethylarginine: an undercharacterized pathway of metabolism of endogenous methylarginines. *Nephrol. Dial. Transplant.* 31, 57–63. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfv390>
- Rodionov, R.N., Martens-Lobenhoffer, J., Brilloff, S., Hohenstein, B., Jarzebska, N., Jabs, N., Kittel, A., Maas, R., Weiss, N., Bode-Böger, S.M., 2014. Role of alanine:glyoxylate aminotransferase 2 in metabolism of asymmetric dimethylarginine in the settings of asymmetric dimethylarginine overload and bilateral nephrectomy. *Nephrol. Dial. Transplant.* 29, 2035–2042. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfu236>
- Saigusa, D., Takahashi, M., Kanemitsu, Y., Ishida, A., Abe, T., Yamakuni, T., Suzuki, N., Tomioka, Y., 2011. Determination of Asymmetric Dimethylarginine and Symmetric Dimethylarginine in Biological Samples of Mice Using LC/MS/MS. *Am. J. Anal. Chem.* 02, 303. <https://doi.org/10.4236/ajac.2011.23038>
- Schepers, E., Barreto, D.V., Liabeuf, S., Glorieux, G., Eloot, S., Barreto, F.C., Massy, Z., Vanholder, R., 2011. Symmetric dimethylarginine as a proinflammatory agent in chronic kidney disease. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 6, 2374–2383. <https://doi.org/10.2215/CJN.01720211>
- Schulze, F., Schwedhelm, E., Maas, R., Böger, R.H., 2006. Comparison of HPLC method and commercial ELISA assay for asymmetric dimethylarginine (ADMA) determination in human serum [1]. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 831. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.11.015>
- Schulze, F., Wesemann, R., Schwedhelm, E., Sydow, K., Albsmeier, J., Cooke, J.P., Böger, R.H., 2004. Determination of asymmetric dimethylarginine (ADMA) using a novel ELISA assay. *Clin. Chem. Lab. Med.* 42, 1377–1383. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2004.257>
- Schwedhelm, E., Maas, R., Tan-Andresen, J., Schulze, F., Riederer, U., Böger, R.H., 2007. High-throughput liquid chromatographic-tandem mass spectrometric determination of arginine and dimethylated arginine derivatives in human and mouse plasma. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.* 851, 211–219. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.11.052>

- Servillo, L., Giovane, A., D'Onofrio, N., Casale, R., Cautela, D., Castaldo, D., Balestrieri, M.L., 2013. Determination of Homoarginine, Arginine, NMMA, ADMA, and SDMA in Biological Samples by HPLC-ESI-Mass Spectrometry. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 20131–20138. <https://doi.org/10.3390/ijms141020131>
- Shek, P.Y.I., Zhao, J., Ke, Y., Siu, K.W.M., Hopkinson, A.C., 2006. Fragmentations of protonated arginine, lysine and their methylated derivatives: concomitant losses of carbon monoxide or carbon dioxide and an amine. *J. Phys. Chem. A* 110, 8282–8296. <https://doi.org/10.1021/jp055426k>
- Šíroká, R., Racek, J., Filipovský, J., 2005. Asymetrický dimethylarginin (ADMA). *Klin. Biochem. Metab.* 13 (34), 131–134.
- Šíroká, R., Trefil, L., Rajdl, D., Racek, J., Cibulka, R., 2007. Asymmetric dimethylarginine – comparison of HPLC and ELISA methods. *J. Chromatogr. B* 850, 586–587. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2006.12.009>
- Stipanuk, M.H., Caudill, M.A., 2018. *Biochemical, Physiological, and Molecular Aspects of Human Nutrition*, 4th ed. Elsevier Health Sciences.
- Teerlink, T., Luo, Z., Palm, F., Wilcox, C.S., 2009. Cellular ADMA: Regulation and action. *Pharmacol. Res., The DDAH-ADMA pathway* 60, 448–460. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2009.08.002>
- Teerlink, T., Nijveldt, R.J., de Jong, S., van Leeuwen, P.A.M., 2002. Determination of arginine, asymmetric dimethylarginine, and symmetric dimethylarginine in human plasma and other biological samples by high-performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 303, 131–137. <https://doi.org/10.1006/abio.2001.5575>
- Tran, C.T.L., Leiper, J.M., Vallance, P., 2003. The DDAH/ADMA/NOS pathway. *Atheroscler. Suppl., Proceedings of the First International Symposium on ADMA as a Cardiovascular Risk Factor; Hamburg, October 4-6, 2002* 4, 33–40. [https://doi.org/10.1016/S1567-5688\(03\)00032-1](https://doi.org/10.1016/S1567-5688(03)00032-1)
- Trocha, M., Merwid-Lad, A., Chlebda-Sieragowska, E., Szuba, A., Pieśniewska, M., Fereniec-Gołbiewska, L., Kwiatkowska, J., Szeląg, A., Sozański, T., 2013. Age-related changes in ADMA-DDAH-NO pathway in rat liver subjected to partial ischemia followed by global reperfusion. *Exp. Gerontol.* 50, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2013.11.004>

- Tsikakos, D., 2007. Analysis of the L-arginine/NO pathway. *J. Chromatogr. B, Analysis of the L-Arginine/NO Pathway* 851, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2007.02.020>
- Tsikakos, D., Böger, R.H., Sandmann, J., Bode-Böger, S.M., Frölich, J.C., 2000. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS Lett.* 478, 1–3. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01686-0](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01686-0)
- Tsikakos, D., Wu, G., 2015. Homoarginine, arginine, and relatives: Analysis, metabolism, transport, physiology, and pathology. *Amino Acids* 47, 1697–1702. <https://doi.org/10.1007/s00726-015-2055-5>
- U.S. Food and Drug Administration, 2020. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation guidelines.
- Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J., Moncada, S., 1992a. Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 20 Suppl 12, S60-62.
- Vallance, P., Leone, A., Calver, A., Collier, J., Moncada, S., 1992b. Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *The Lancet* 339, 572–575.
- Valtonen, P., Karppi, J., Nyssönen, K., Valkonen, V.-P., Halonen, T., Punnonen, K., 2005. Comparison of HPLC method and commercial ELISA assay for asymmetric dimethylarginine (ADMA) determination in human serum. *J. Chromatogr. B* 828, 97–102. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.09.023>
- van Dyk, M., Mangoni, A.A., McEvoy, M., Attia, J.R., Sorich, M.J., Rowland, A., 2015. Targeted arginine metabolomics: A rapid, simple UPLC-QToF-MSE based approach for assessing the involvement of arginine metabolism in human disease. *Clin. Chim. Acta* 447, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.05.014>
- Wang, S., Vicente, F.B., Miller, A., Brooks, E.R., Price, H.E., Smith, F.A., 2007. Measurement of arginine derivatives in pediatric patients with chronic kidney disease using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin. Chem. Lab. Med.* 45, 1305–1312. <https://doi.org/10.1515/CCLM.2007.277>



## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1:	Reakce vzniku NO z L-argininu.....	9
Obr. 2:	Mechanismus přenosu elektronu NO syntasou. ....	9
Obr. 3:	Arginin a jeho methylované deriváty. ....	11
Obr. 4:	Hydrolyza ADMA katalyzovaná DDAH. ....	13
Obr. 5:	Schéma syntézy a eliminace ADMA a SDMA. ....	14
Obr. 6:	Metabolismus a transport L-argininu, ADMA a SDMA.....	16
Obr. 7:	Syntéza L-homoargininu. ....	17
Obr. 8:	Hlavní biologické účinky ADMA a SDMA. ....	20
Obr. 9:	Butylestery sledovaných analytů a jejich interních standardů. ....	31
Obr. 10:	LC gradient.....	32
Obr. 11:	Fragmentace analytů a interních standardů. ....	35
Obr. 12:	Chromatogramy L-argininu, ADMA, SDMA a interních standardů. ....	42
Obr. 13:	Hmotnostní spektrum L-argininu. ....	43
Obr. 14:	Hmotnostní spektrum IS L-argininu- <sup>13</sup> C <sub>6</sub> .....	43
Obr. 15:	Hmotnostní spektrum ADMA. ....	44
Obr. 16:	Hmotnostní spektrum IS ADMA-d <sub>6</sub> .....	44
Obr. 17:	Hmotnostní spektrum SDMA.....	45
Obr. 18:	Hmotnostní spektrum IS SDMA-d <sub>6</sub> .....	45
Obr. 19:	Stabilita ADMA a SDMA ve zmrazeném vzorku.....	49
Obr. 20:	Porovnání ADMA ve vzorcích plazmy a séra.....	51
Obr. 21:	Porovnání SDMA ve vzorcích plazmy a séra.....	52
Obr. 22:	Porovnání metody LC-MS/MS a ELISA u ADMA. ....	54
Obr. 23:	Porovnání metody LC-MS/MS a ELISA u SDMA.....	55
Obr. 24:	Porovnání metody LC-MS/MS a HPLC-FL u ADMA. ....	57
Obr. 25:	Porovnání metody LC-MS/MS a HPLC-FL u SDMA.....	58
Obr. 26:	Krabicový graf ADMA u kontrolní skupiny a pacientů s CKD.....	61
Obr. 27:	Krabicový graf SDMA u kontrolní skupiny a pacientů s CKD.....	61

## SEZNAM TABULEK

Tab. 1:	Změny koncentrací ADMA a SDMA u CKD. ....	22
Tab. 2:	Přídavky standardů v kontrolních vzorcích. ....	30
Tab. 3:	Podmínky gradientové eluce. ....	32
Tab. 4:	Parametry fragmentace. ....	34
Tab. 5:	Koncentrace jednotlivých bodů kalibrační křivky. ....	36
Tab. 6:	Koncentrace kalibračních bodů pro ověření linearity. ....	36
Tab. 7:	Retenční časy L-argininu, jeho dimethylderivátů a interních standardů. ....	41
Tab. 8:	Charakteristiky kalibračních křivek L-argininu, ADMA a SDMA. ....	46
Tab. 9:	Charakteristiky kalibračních křivek pro ověření linearity. ....	46
Tab. 10:	Limit detekce a limit kvantifikace ADMA a SDMA. ....	47
Tab. 11:	Preciznost a přesnost stanovení L-argininu a jeho derivátů. ....	47
Tab. 12:	Charakteristiky kalibračních křivek připravených ve vodě a v matrici. ....	48
Tab. 13:	Variabilita kalibračních křivek připravených ve vodě a v matrici. ....	48
Tab. 14:	Koncentrace ADMA a SDMA po 1–4 cyklech zmrazení a rozmrazení. ....	49
Tab. 15:	Porovnání ADMA a SDMA ve vzorcích plazmy a séra. ....	50
Tab. 16:	Porovnání metod LC-MS/MS a ELISA ....	53
Tab. 17:	Porovnání metod LC-MS/MS a HPLC-FL. ....	56
Tab. 18:	Hodnoty ADMA a SDMA u výběrové referenční populace. ....	59
Tab. 19:	Referenční meze parametrickou metodou. ....	59
Tab. 20:	Referenční meze neparametrickou metodou. ....	60
Tab. 21:	Hodnoty ADMA a SDMA u pacientů s CKD. ....	60