



Zdravotně
sociální fakulta
Faculty of Health
and Social Studies

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Zdravotně sociální fakulta
Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Metody sledování profilu karnitinových metabolitů v moči a jejich využití v klinické diagnostice

Vypracovala: Martina Nováková
Vedoucí práce: RNDr. Petr Šimek, CSc.

České Budějovice 2014

Abstrakt

Tato práce se zabývá sledováním profilu karnitinových metabolitů v moči patientek s diagnostikovanou rakovinou prsu. L-karnitin je látka velice významná pro metabolismus tuků, a proto některé současné výzkumy ukazují, že by mohl sloužit jako podpůrný prostředek pro léčbu rakoviny postihující různé orgány či tkáně.

V teoretické části se práce zabývá obecnou charakteristikou a obecným popisem L-karnitinu a jeho účinkem na organismus. Tato část je rozdělena do kapitol, které shrnují různé informace o L-karnitinu a acylkarnitinech, například se zabývá metabolismem, dále různými účinky v organismu včetně popisu reakcí organismu na nedostatek těchto látek, či jakými metodami a z jakých biologických materiálů můžeme sledovat jejich hladinu. Metody sledování L-karnitinu jsou v práci popsány podrobněji a byly mezi sebou porovnávány na základě dříve publikovaných vědeckých výsledků. Autoři různých vědeckých prací uvádějí postupy a výhody či nevýhody jimi navržených metod pro stanovení L-karnitinu a acylkarnitinů, které byly v této práci podrobně zkoumány a analyzovány a na jejich základě byla navržena mnou prezentovaná metoda pro stanovení karnitinových metabolitů v moči. Závěrem této části je stručný popis nejčastěji používané metody pro stanovení karnitinových metabolitů, kterou je kapalinová chromatografie s hmotnostní detekcí (LC/MS). Pozitivní výsledky studií této metody mě motivovaly k použití této analytické metody i pro mou práci.

Výzkumná část zahrnuje vlastní popis práce při přípravě vzorků a celkové nastavení parametrů důležitých pro provedení metody. Vzorky pro výzkum byly získány od patientek s diagnostikovanou rakovinou prsu z českobudějovické nemocnice. V této části je také popsána úprava vzorků před detekcí, použité materiály, přístroje a chemikálie, a to včetně samotného postupu a nastavení přístroje pro analýzu.

Metodou byly získány chromatografické záznamy jednotlivých látek a hmotnostní spektra, která byla jednotlivě zpracovávána pro každou látku zvlášť. Při detekci L-karnitinu a acylkarnitinů v moči patientek s diagnostikovanou rakovinou prsu byly pro porovnání analyzovány i vybrané vzorky poskytnuté kontrolní skupinou zdravých žen,

které nám umožnily sledovat možné rozdíly. Pro přehlednost a základní vhléd byl sestaven graf, ve kterém je možné sledovat jen nepatrné rozdíly mezi hladinami karnitinových metabolitů u žen s rakovinou prsu versus kontrolní vzorky. Tento rozdíl není statisticky významný, a to zejména proto, že variabilita mezi jednotlivými jedinci je o řád vyšší než samotné rozdíly mezi sledovanými skupinami. Tento výsledek byl způsoben tím, že do studie nebyly zahrnuty další informace o pacientkách, jako například informace o jejich medikaci či zdravotním stylu, celkové kondici organismu atd. Podrobná studie těchto změn vyžaduje systematickou a časově velmi náročnou práci, která nebyla a ani nemohla být cílem mé bakalářské práce.

Klíčová slova:

L-karnitin, acylkarnitiny, LC/MS, HILIC

Abstract

This study deals with the profiling of carnitine metabolites in the urine of the patients with breast cancer. L-carnitine is a chemical compound that is very important for metabolism of lipids, and therefore some current research suggests that it could serve as a means for the treatment of cancer affecting various organs or tissues.

The theoretical part deals with the general characteristics and a description of the L-carnitine and its effect on the body. This part is divided into chapters that summarize various information about L-carnitine and acylcarnitines, for example the metabolism, different effects in the body including a description of responses to the lack of these substances, or methods that can be used for the detection of L-carnitine levels. Methods of monitoring L-carnitine were described in detail and were compared with previously published scientific studies. The authors of scientific studies show procedures, advantages and disadvantages of the proposed methods for determining L-carnitine and acylcarnitines, that were examined in this work in detail and the method for the determination of carnitine metabolites in urine has been proposed. A brief description of the most using methods for the determination of L-carnitine metabolites by liquid chromatography mass spectroscopy (LC / MS) is done the end of this part. I have been motivated with a positive results of studies and I have used this method for analysis in my work.

In the research part of my study, the sample preparation protocol and conditions for the application of the method are described. The samples from the hospital of České Budějovice have been obtained from patients with fresh breast cancer diagnosis. In this part, the treatment of samples prior to detection, the used materials, equipment, chemicals, process and device settings for analysis were described.

The method provided chromatograms and mass spectra of the individual substances. Samples of patients were compared with samples of control group of healthy women, which enabled us to observe possible differences.

For clarity, the graph was drawn up and it was possible to monitor only slight differences between the levels of carnitine metabolites in women with breast cancer versus the control samples. This difference is not statistically significant, especially because the variability between individuals is higher of an order of magnitude than the actual differences between the two groups. This result is due to the fact that the study has not included additional information on patients such as information about their medications or health style, the overall condition of the body, etc. A detailed study requires a systematic and very time consuming work, which was not the aim of my thesis.

Liquid chromatography with hydrophilic interactions method associated with mass detector used for monitoring of L-carnitine and its metabolites profiles gives positive results, is not time consuming, affordable and above all allow suitable for the detection of substances that have been selected for my work.

Key words:

L-carnitine, acylcarnitines, LC/MS, HILIC

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval(a) samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to – v nezkrácené podobě – v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných fakultou – elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 5. 5 2014

.....

Martina Nováková

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala RNDr. Petrovi Šimkovi CSc., Ing. Martinu Moosovi, Ph.D. a Ing. Janě Cimlové, Ph.D. za cenné rady, připomínky a vstřícnost při konzultacích a vypracování mé bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat Nemocnici České Budějovice a.s. za poskytnutí vzorků pro laboratorní výzkum.

Obsah

1	Teoretická část.....	12
1.1	Historie L-karnitinu.....	12
1.2	Struktura a vlastnosti L-karnitinu.....	12
1.3	Metabolismus karnitinu.....	13
1.3.1	Biosyntéza.....	14
1.4	Účinek L-karnitinu v organismu	15
1.5	L-karnitin a výživa	17
1.6	Nedostatek L-karnitinu.....	18
1.6.1	Primární poruchy	18
1.6.2	Sekundární poruchy	19
1.7	Význam jednotlivých karnitinových metabolitů	21
1.7.1	Butyryl-L-karnitin.....	21
1.7.2	Kreatinin	22
1.7.3	Trimethylamin-N-oxid (TMAO)	23
1.7.4	Acetyl-L-karnitin (ALC).....	24
1.7.5	Betain (N, N, N - trimethylglycin).....	25
1.7.6	L-karnitin	26
1.7.7	Kreatin	27
1.7.8	Acetylcholin (ACh).....	28
1.7.9	Cholin.....	29
1.8	Analytické metody pro stanovení L-karnitinu a acylkarnitinů	30
1.8.1	Enzymatická analýza	30
1.8.2	Chromatografické metody	31
1.8.3	Hmotnostní spektrometrie (MS) v analýze L-karnitinu.....	32
1.8.4	Metody MS/MS	33
1.9	Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)	35
1.9.1	Výhody metody HILIC	36
1.9.2	Aplikace metody HILIC	36
2	Cíle práce.....	37

3	Metodika.....	38
3.1	Použité chemikálie	38
3.2	Použité instrumenty.....	38
3.3	Příprava roztoků standardů pro analýzu.....	39
3.4	Příprava mobilní fáze pro analýzu HPLC	40
3.5	Popis použitých vzorků pro měření.....	40
3.6	Parametry HPLC analýzy.....	42
3.7	Parametry pro nastavení hmotnostního detektoru.....	43
4	Výsledky a diskuze.....	44
5	Závěr.....	59
6	Seznam použité literatury	61
7	Přílohy	65

Seznam použitých zkratk

TML	trimethyllysin
HTML	hydroxytrimethyllysin
TMABA	trimethylaminobutyraldehyd
BB	butyrobetain
OCTN2	Carnitine/Organic Cation Transporter
PCD	Primární deficit L-karnitinu
SCD	Sekundární deficit L-karnitinu
MCAD	Deficit acyl-CoA dehydrogenázy
DFI	Přímý nástřik vzorku (Direct Flow Injection)
SCAD	Deficit acyl-CoA dehydrogenázy
LC	Kapalinová chromatografie
MS	Hmotnostní spektrometrie
GC	Plynová chromatografie
HLPC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
TMAO	Trimethylamin-N-oxid
NMR	Nukleární magnetická resonance
ALC	Acetyl-L-karnitin
ACh	Acetylcholin
FAB	Ionizace rychlými ionty (Fast Atom Bombardment)
DCI	Desorpční chemická ionizace
API	Ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Ionization)
MALDI	Ionizace laserem za přítomnosti matrice
ESI	Ionizace elektrosprejem
SPME	Mikroextrakce tuhou fází (Solid Phase Microextraction)
ACN	Acetonitril
MeOH	Methanol
LTQ	Lineární iontová past
TSQ	Trojité kvadrupol
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie

Úvod

L-karnitin je kvartérní amin (3-hydroxy-4-trimethylaminobutyát) vyskytující se ve dvou formách L a D. Jeho aktivní formou je pouze forma L, která je biologicky aktivní a vyskytuje se v přírodě. Naopak forma D aktivní není a považujeme ji za toxickou. L-karnitin je látka velice významná v metabolismu tuků, jelikož má za úkol transportovat mastné kyseliny přes membránu mitochondrií a účastní se beta-oxidace mastných kyselin. Tuto látku můžeme převážně získat z potravy, největší množství L-karnitinu najdeme v červeném mase či mléčných výrobcích. Další možností je získat tuto látku endogenně, kdy si tělo dokáže vyrobit L-karnitin biosyntézou ze dvou aminokyselin lysinu a metioninu. Pro jeho účinek v metabolismu tuků se stal nedílnou součástí zdravého životního stylu sportovců, kteří ho užívají pravidelně před výkonem jako posilující prostředek. Má však i mnoho dalších tělu prospěšných účinků například při různých onemocněních spojených právě s poruchou metabolismu tuků, srdečními vadami, cukrovce, svalové slabosti apod. Lidé, jejichž strava je převážně založena na příjmu rostlinné potravy jsou vystaveny mnoha problémům souvisejícím právě s nedostatkem L-karnitinu, kterého je v rostlinné stravě minimum.

Hladinu L-karnitinu lze detekovat z tělních tekutin či tkání a to různými analytickými metodami, které umožňují tuto látku v jednotlivých tekutinách analyzovat. Jedná se především o enzymatickou analýzu a chromatografické metody. Nejčastěji používanou metodou je však metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí (HPLC/MS), která umožňuje nejcitlivější a nejpřesnější analýzu karnitinových metabolitů. Tato práce je zaměřena na problematiku stanovení L-karnitinu a jeho metabolitů s použitím metody HPLC/MS s elektrosprejem jako ionizační technikou ve vzorcích moči pacientů s diagnostikovanou rakovinou prsu. Tyto hodnoty byly poté korelovány se zjištěnými hodnotami u kontrolní skupiny zdravých jedinců.

1 Teoretická část

1.1 Historie L-karnitinu

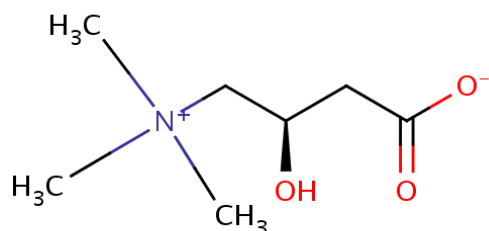
L-karnitin je látka, která byla poprvé objevena v roce 1906 ve zvířecím mase. Jeho název vznikl z latinského slova caro, v překladu maso, kde byl nalezen. Z počátku byl považován za vitamín, který byl řazen do skupiny vitamínu B. Karnitin je nazýván vitagenem, jelikož je z 30% syntetizován v těle. V roce 1927 odhalili Tomita a Sendju, že jde o dusíkatou látku, která je podobná aminokyselinám. Význam karnitinu popsali teprve v roce 1957 Friedman a Fraenkel. Spočívá v přesunu mastných kyselin do mitochondriální matrix, kde dochází k jejich oxidaci. Z těchto poznatků vyplývá význam pro energetický metabolismus buněk a tkání, které jsou závislé na získávání energie převážně touto cestou. V pozdějších letech docházelo k testování teoretických znalostí pomocí experimentálního výzkumu. Průmyslová výroba karnitinu začala v 80. letech minulého století, především jako dietní doplněk pro sportovce. Zde se ale různí názory zda má skutečně účinky jako je zvýšení výkonnosti a zlepšení regenerace. U jedinců s různými zdravotními problémy byl prokázán značný nedostatek karnitinu a po jeho doplnění byl zaznamenán pozitivní vliv. Dále byly zjištěny pozitivní výsledky při podávání karnitinu u některých srdečních onemocnění, chorob kosterních svalů, ale také při ovlivnění určitého typu mužské sterility a v neonatologii. Jelikož se věda stále vyvíjí, využití této látky bude v budoucnosti rozšířeno a specifikováno. (Steidl a Zbránková, 2000; Steidl a Vizinová, 2003; Cibulka, 2005; Steidl et al., 1995)

1.2 Struktura a vlastnosti L-karnitinu

L-karnitin je kvartérní amin (3-hydroxy-4-trimethylaminobutyrate). Je to bílá krystalická látka, která se na vzduchu rychle mění ve vodný roztok. Má typický zápach po mase a rybách, ale v roztoku nezapáchá. Je dobře rozpustný ve vodě. V průmyslové výrobě se vyskytuje jako forma L a D. Pouze forma L je biologicky aktivní a vyskytuje se v přírodě. Forma D je biologicky neúčinná, škodlivá a do určité míry i toxická,

jelikož inhibuje formu L, může tak vyvolat příznaky nedostatku L- karnitinu. Karnitin poskytuje buňce energii pomocí beta oxidace mastných kyselin, která u eukaryotních buněk probíhá uvnitř mitochondrií. V lidském těle ho najdeme většinou všude. Především však zásobuje energii srdce a kosterní svalstvo. Přes membrány prochází pouze acetyl karnitin, který je ve vyšších koncentracích toxický a vykazuje biologicky malý účinek. Nejvyšší množství karnitinu najdeme ve skopovém, jehněčím a hovězím mase. Nenajdeme ho však ve stravě rostlinného původu. Z chemického hlediska se karnitin označuje jako kyselina 3-hydroxy-4-N-trimethylaminomáselná. Je podobný aminokyselinám s tím rozdílem, že má atom dusíku umístěný na čtvrtém atomu uhlíku (u aminokyselin je na uhlíku druhém). Dusíkatý atom tedy poskytuje čtyři vazby, a proto ho označujeme za kvartérní amin. Karnitin je opticky aktivní. Jeho molekula obsahuje asymetrický uhlík, konkrétně se jedná o třetí atom uhlíkatého řetězce, který stáčí rovinu polarizovaného světla (Steidl a Zbránková, 2000; Steidl et al., 1995).

Obrázek č. 1: Vzorec L-karnitinu převzato z: <<http://www.hmdb.ca/metabolites>>.



1.3 Metabolismus karnitinu

Asi 25% L-karnitinu je vytvářeno v lidském těle ze dvou esenciálních mastných kyselin metioninu a lyzinu, v tomto případě jde o endogenní L-karnitin. Zbýlých 75% L-karnitinu má exogenní původ a získává se příjmem potravy. Produkují ho všechny

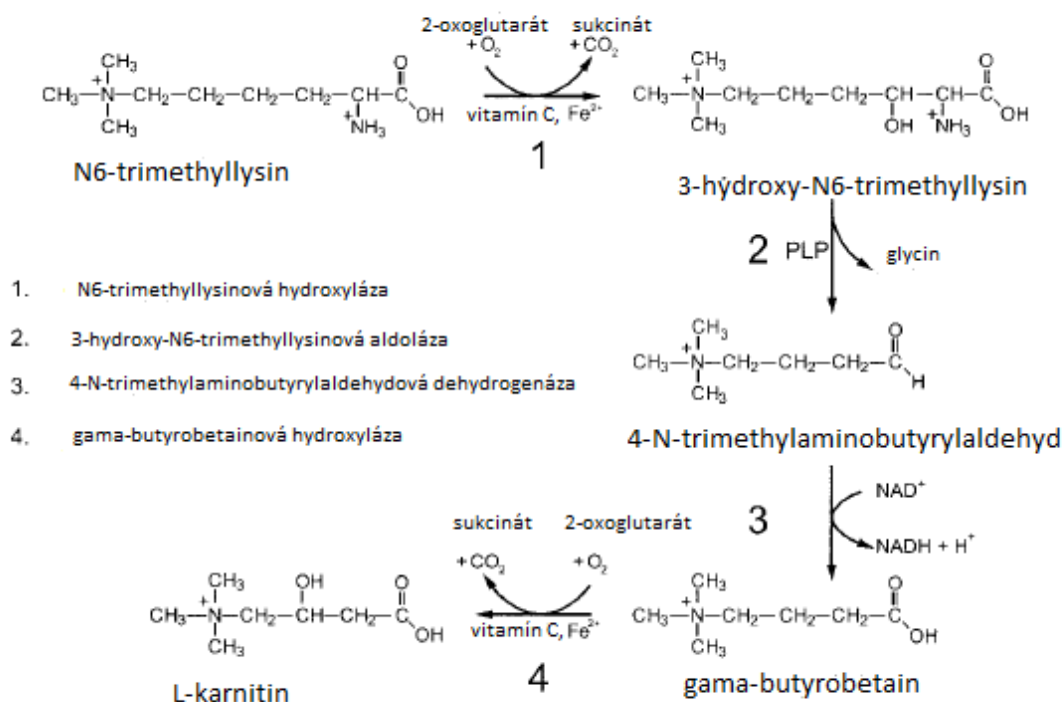
buňky těla, ale syntéza L-karnitinu probíhá především v mozku, ledvinách a játrech. Pro jeho tvorbu je zapotřebí přítomnost některých látek jako jsou vitamín C, pyridoxin tedy vitamín B6, niacin a železo. L-karnitin vzniká při pátém stupni přeměny, kdy z deoxykarnitinu vzniká karnitin (Steidl L., Zbránková B., 2000).

1.3.1 Biosyntéza

Biosyntéza L-karnitinu je děj, který probíhá v několika krocích. Vznik endogenního L-karnitinu, jak je již uvedeno výše, závisí na syntéze lysinu a metioninu. Lysin slouží jako zdroj dusíku a uhlíkatého řetězce, kdežto S-adenosylmethionin poskytuje tři methylové skupiny. V prvním kroku dochází k metylaci lysinu pomocí S-adenosylmethioninu. Reakci katalyzuje enzym lysinmethyl transferáza (epsilon-N-L-lysine methyltransferase) za vzniku epsilon-N-trimethyllysinu (TML). Tento krok vyžaduje přítomnost 2-oxoglutarátu, železnatého iontu, molekulárního kyslíku jako kofaktorů a dále přítomnost vitamín C pro udržení železa ve dvojmocném stavu. TML je poté hydroxylován v beta pozici TML-hydroxylázou (EC1.14.11.8) na beta-hydroxytrimethyllysin (HTML). HTML je dále štěpen HTML-Aldolázou (EC4.1.2.“X“) na gama-trimethylaminobutyraldehyd (TMABA) a glycin. TMABA je oxidován enzymem TMABA-dehydrogenázou (EC 1.2.1.47) na gama-butyrobetaín (gama-BB). V posledním kroku je gama-BB hydroxylován gama-BB-hydroxylázou (EC 1.14.11.1.) v beta pozici a vzniká konečný produkt, tedy L-karnitin. Enzym katalyzující poslední reakci biosyntézy je u člověka přítomen pouze v játrech, ledvinách a mozku. Domněnkou však je, že gama-BB je tvořen v periferních tkáních (především v kosterním svalstvu) a poté je transportován krví do tkání schopných konečné syntézy L-karnitinu. Vytvořený karnitin je vyplavován do krve, která ho transportuje do periferních tkání. Po syntéze se L-karnitin dostává do oběhu prostřednictvím aktivního transportu sodíku. Organický přepravce sodíku (OCTN2) je pravděpodobně zodpovědný za transport karnitinu do tkání a podílí se na tubulární reabsorpci karnitinu v ledvinách. Koncentrace L-karnitinu je ve většině tkání 20 až 50 krát vyšší než v plazmě. Rychlost biosyntézy závisí na přítomnosti trimethyllysinu na vnitřní straně

mitochondrie, kde se také nachází enzym trimethyllysinová hydroxyláza. Lidé jsou schopni syntetizovat přibližně 1 až 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ karnitinu za den. V těle člověka je asi 30 až 50% endogenně a exogenně vytvořeného trimethyllysinu přeměněno na L-karnitin, zbytek je vyloučen močí. Zdravý člověk vylučuje asi 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{kg}^{-1}$ karnitinu za den. (Steiber et al., 2004; Cibulka, 2005, Vaz et al., 2002).

Obrázek č. 2: Biosyntéza L-karnitinu z trimethyllysinu (použito ze článku Vaz F. et al., 2002).



1.4 Účinek L-karnitinu v organismu

Karnitin v lidském organismu hraje důležitou roli v metabolismu lipidů a v produkci energie (Mitchell, 1978). Jeho působení je výlučně intracelulární neboť přechází z extracelulární sérové tekutiny do jakékoliv tělní buňky, nejčastěji se jedná

o svalovou buňku. Doba tohoto přechodu nebyla dosud definována (Steidl a Vizinová, 2003).

Nejdůležitější funkcí karnitinu je působit jako nosič pro přenos aktivovaných mastných kyselin s dlouhými řetězci z cytosolu do mitochondriální membrány, kde probíhá beta-oxidace (Stribis et al., 2010). Podílí se na převodu produktů peroxizomální beta-oxidace včetně acetyl-CoA do mitochondrie. Neesterifikované mastné kyseliny jsou získávány hydrolýzou tuků (triacylglycerolů) z tukových zásob nebo z tuků získaných potravou. Z mastných kyselin s dlouhým řetězcem následně vznikají deriváty karnitinu, acylkarnitiny (estery karnitinu). L-karnitin mimo jiné také eliminuje toxické zbytky beta-oxidace, transportuje je v obráceném směru a podporuje vylučování zbytků ve formě acylkarnitinů z buňky, čímž obnovuje volnou frakci CoA. Nepůsobí pouze v metabolismu mastných kyselin, ale je také důležitý při výrobě energie z aminokyselin a sacharidů. (Vaz a Wanders, 2002)

L-karnitin dále napomáhá fungování kosterního svalstva u lidí, koní, psů nebo holubů. Většina sportovců a kulturistů využívá tuto látku jako posilující prostředek, neboť L-karnitin není řazen mezi zakázané, tedy dopingové látky. Jeho účinek je také antiischemický, neboť odstraňuje z nitra buněk mastné kyseliny a tím chrání buňku před smrtí. Příznivě působí při angíně pectoris a v období po cévní mozkové příhodě, neboť zvyšuje výdrž při zátěži (Steidl a Vizinová, 2003).

Dalším orgánem, ve kterém bezprostředně působí je mozek, a proto se L-karnitin považuje za částečný neurotransmiter. Při léčbě hepatocerebrálního Reyova syndromu navozuje regeneraci myelinových pochev v periferních nervech, čímž napomáhá při svalové slabosti a bolesti a zlepšuje metabolismus svalové buňky. Velice často je využíván při aktivním vykonávání sportu, neboť pouze krátkodobé použití L-karnitinu před výkonem má spíše psychologický význam, nikoliv účinný farmakologický. Svůj význam má i v neonatologii, kde je součástí parenterální výživy u předčasně narozených dětí a někteří výrobci ho přidávají i do sušeného mléka pro kojence (Steidl a Vizinová, 2003).

1.5 L-karnitin a výživa

Jednou z možností, jak karnitin můžeme získat kromě biosyntézy je potrava, která je velice důležitým zdrojem, ale ne nezbytným proto, aby tělo zásobovala karnitinem. Přibližně asi 75% celkového karnitinu v těle pochází právě z potravy nebo z lyzinu a metioninu a zbývajících 25% je syntetizováno v těle. Množství karnitinu přijatého potravou je pro každého člověka individuální a souvisí s koncentrací karnitinu v plazmě. Koncentraci karnitinu v plazmě také ovlivňuje pohlaví a skladba těla. Štíhlí jedinci, jejichž strava neobsahuje dostatek karnitinu mají koncentraci volného karnitinu v plazmě a moči poměrně nízkou. Při analýze hladiny karnitinu u dospělých jedinců bylo zjištěno, že ženy mají koncentraci celkového karnitinu nižší než muži, toto pravidlo platí i při jeho vylučování.

Karnitin najdeme primárně v živočišných zdrojích, ale malé množství se nachází i v obilovinách, ovoci a zelenině. V tabulce 1 můžeme vidět seznam jednotlivých potravin s obsahem karnitinu. Množství karnitinu v potravinách bylo měřeno buď spektrofotometricky a nebo radioenzymatickým testem, který byl podle studie efektivnější, ale přesto většina potravin byla měřena spektrofotometricky. Dále v tabulce nejsou uvedeny specifické údaje o potravinách, jako například jsou-li v syrovém stavu nebo tepelně upravené. Lidé, kteří nemají dostatek přísunu karnitinu potravou, jako jsou vegetariáni nebo lidé držící různé diety založené převážně na obilovinách, mají hladinu karnitinu výrazně nižší než lidé, jejichž strava se skládá převážně z živočišných bílkovin. Stejně tak mají snížené vylučování karnitinu močí.

Studie potvrdily také sníženou hladinu karnitinu u dětí trpící syndromem nedostatku bílkovin. Hladina karnitinů se při tomto syndromu měnila s délkou řetězců při oxidaci mastných kyselin, proto příjem potravy s vysokým obsahem tuku může měnit hladinu karnitinu. Stejně tak strava s vysokým příjmem sacharidů a vitamínu B₃ (niacinu), který zvyšuje koncentraci celkového karnitinu a i jeho vylučování. Pro metabolismus karnitinu je důležité je i množství stopových prvků jako je především vitamín C, železo, pyridoxin. Jejich nedostatek může způsobit různé zdravotní problémy (Steiber et al. , 2004).

Tabulka č. 1: Obsah karnitinu v potravinách dle Leibowitze 1998 a Cerretelliho et al. 1990.

Potravina	Celkový obsah karnitinu v mg na 100 g
ovčí maso	209
jehněčí maso	78
hovězí maso	65
vepřové maso	30
králičí maso	21
kuřecí maso	7
jehněčí játra	2
kravské mléko	3
pšeničné klíčky	1
květák, vajíčka, chleba	Pod 1
zelí, pomeranč, brambory	0

1.6 Nedostatek L-karnitinu

L-karnitin se nachází v plazmě a tkáních jako volný karnitin a nebo je vázaný na mastné kyseliny jako derivát acylkarnitinů. Snížení nebo změny koncentrací karnitinu a acylkarnitinů souvisejí často se získanými vrozenými poruchami, které jsou popsány jako primární nebo sekundární (Walter, 1996).

Nedostatek karnitinu má velký vliv na metabolické změny v buňce a ty mohou vézt až k nekróze celé buňky (Steidl a Zbránková, 2000).

1.6.1 Primární poruchy

Jak už bylo zmíněno v předchozích kapitolách, L-karnitin může být syntetizován v játrech, ale častěji je do těla dodáván potravou. Jsou známy dvě odlišné primární poruchy způsobující nedostatek karnitinu a v některých případech je velice obtížné je od sebe odlišit (Flanagan J L., et al., 2010). Primární genetické poruchy vznikají

v důsledku nedostatku zděděných enzymů, které převádějí tuky s dlouhými řetězci přes membrány mitochondrií (Walter, 1996).

Primární deficit L-karnitinu (PCD) je vzácná autozomálně recesivní porucha v oxidaci mastných kyselin, při které není karnitin přepravován přes plazmatickou membránu v důsledku snížené hodnoty OCTN2 v plazmě, který karnitin přenáší. V tomto případě nemůže být karnitin dopravován do tkání (srdce, kosterní svalstvo) a dochází ke zvýšenému vylučování karnitinu ledvinami, což může způsobit až systémové vyčerpání karnitinu. Kvůli poruše vstřebávání volného karnitinu je karnitin u pacientů s primární poruchou vylučován močí z těla a to vede až k několika násobnému snížení hladin karnitinu ve tkáních (Flanagan et al., 2010).

PCD se vyskytuje u 1-5 lidí na 10 000 obyvatel v různém věku. Nejběžnějším projevem PCD jsou hypoketotická hypoglykemická encefalopatie a také kardiomyopatie. Gen způsobující PCD je SLC22A5 a má za následek několik mutací. PCD poškozuje převážně orgány a tkáně jako jsou srdeční sval (s ním spojená kardiomyopatie), nervový systém (spojený s hypoketotickou hypoglykemickou encefalopatií) a kosterní svalstvo (a s ním spojená myopatie). U pacientů s těmito problémy je možné podáváním L-karnitinu zachránit život.

Tato porucha byla popsána u třech různých věkových skupin, dospělých, dětí a u dětí před narozením či krátce po něm. Tyto skupiny byly všechny ovlivněné autozomálně recesivní dědičností. Různé mutace v genu SLC22A5 mohou vést k rozdílným závažnostem a nástupem onemocnění, proto je důležité hlídat hladinu volného a celkového L-karnitinu v plazmě (Flanagan et al., 2010).

1.6.2 Sekundární poruchy

Sekundární deficit L-karnitinu (SCD) je charakteristický zvýšeným vylučováním L-karnitinu močí, který má formu acylkarnitinu a k vylučování dochází v důsledku nahromadění organických kyselin. V tomto případě může být nedostatek L-karnitinu způsoben také farmakologickou léčbou, dědičnou poruchou metabolismu, špatným stravováním, malabsorpcí karnitinu či zvýšenou tubulární ztrátou volného L-karnitinu

(tzv. Fanconioho syndrom), hemodialýzou, peritoneální dialýzou a mnoha dalšími aspekty. Tento deficit je méně závažný vzhledem k jeho krátkodobým klinickým dopadům a také se vyskytuje častěji než deficit primární. Rozdílem také je, že k SCD dochází v důsledku nebo spojení s další poruchou, nejčastěji jater a ledvin, včetně defektů v metabolismu mastných kyselin nebo při podávání farmakologických činidel (pivampicilin, kyselina valproová). SCD se také nachází u pacientů s renální tubulární poruchou, při které dochází k nadměrnému vylučování karnitinu a u pacientů na hemodialýze. Pouze u pacientů na hemodialýze nebo i u lidí trpících renální tubulární poruchou je deficit způsobený nedostatečným prostupem karnitinu přes dialyzační membránu a to u některých může vést až k vyčerpání karnitinu a současně ke zvýšení jeho esterifikované formy (Flanagan et al. 2010).

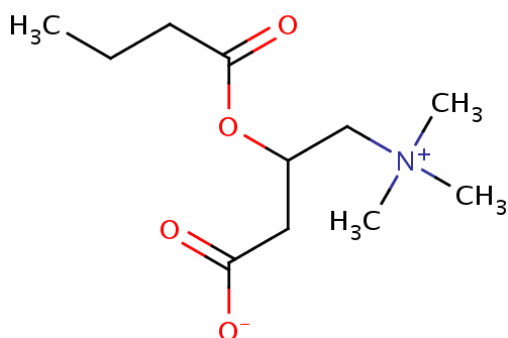
Nejčastější sekundární poruchou je nedostatek acyl-CoA dehydrogenázy (MCAD) vyskytující se v bílé etnické skupině obyvatel. Lidé s touto poruchou obvykle nejprve onemocní hypoketotickou glykemií nebo Reyeovým syndromem, a to už v 9. měsíci po narození. SCD lze odhalit pomocí hmotnostní spektrometrie, kterou můžeme určit vylučovanou hladinu karnitinu (Walter, 1996).

Podáváním karnitinu může dojít ke zlepšení několika zdravotních problémů, které mohou nastat například u uremických pacientů, pacientů s poruchami srdce a pohybových schopností, při chudokrevnosti a řadě dalších (Flanagan et al., 2010).

1.7 Význam jednotlivých karnitinových metabolitů

1.7.1 Butyryl-L-karnitin

Obrázek č. 3: Vzorec Butyryl-L-karnitinu převzato z: <http://www.hmdb.ca/metabolites>.



Chemické vlastnosti

Chemický vzorec: $C_{11}H_{21}NO_4$

Průměrná molekulová hmotnost: 231,289

Monoizotopická molekulová hmotnost: 231,147 Da

Obecná charakteristika

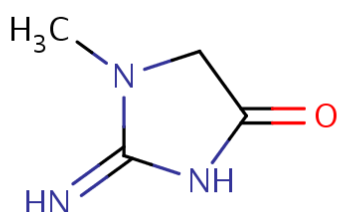
Je organická sloučenina pevného skupenství patřící mezi lipidy, přesněji estery mastných kyselin a v této skupině je zařazena mezi acylkarnitiny. Získat ji můžeme z potravy či endogenně syntézou. Zajišťuje signalizaci mezi buňkami a slouží jako zdroj energie pro katabolismus lipidů a přepravu mastných kyselin. Nachází se ve třech tělních tekutinách (krev, mozkomíšní mok, moč) a ve tkáních ji nalezneme ve fibroblastu (Young et al., 2003; Bhala et al., 1995; <http://www.hmdb.ca/metabolites>).

Koncentrace této sloučeniny v moči byla stanovena metodou DFI-MS/MS (Direct Flow Injection / Mass Spectrometry) a u dospělých jedinců může dosahovat hladin

v rozmezí 0,12-1,81 $\mu\text{mol}\cdot\text{mmol}^{-1}$ kreatininu (Bouatra et al., 2013). Zvýšenou hladinu tohoto metabolitu obvykle nacházíme u pacientů s nedostatkem enzymu acyl-CoA-dehydrogenázy (SCAD), u dětí s akutní acidózou a u dospělých středního věku trpících chronickou myopatií ve svalech (Young et al., 2003; Bhala et al., 1995; <http://www.hmdb.ca/metabolites>).

1.7.2 Kreatinin

Obrázek č. 4: Vzorec Kreatininu převzato z: <<http://www.hmdb.ca/metabolites>>.



Chemické vlastnosti

Chemický vzorec: C₄H₇N₃O

Průměrná molekulová hmotnost: 113,118

Monoizotopická molekulová hmotnost: 113,059 Da

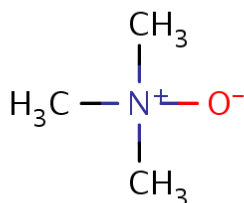
Obecná charakteristika

Kreatinin je organická sloučenina pevného skupenství patřící mezi alifatické heteromonocyklické sloučeniny a v buňce se nachází v cytoplazmě. Může být také označován jako anhydrid kreatinu. Kreatinin se přemísťuje z krevní plazmy do ledvin a vylučuje se glomerulární filtrací. Jeho produkce v těle probíhá nepřetržitě a hladinu kreatininu, která nám slouží jako ukazatel správné funkce ledvin, lze získat ze séra. Zvýšená hladina této sloučeniny je obvykle spojena s poškozenou funkcí nefronů. Referenční rozmezí kreatininu je pro ženy 60-110 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a pro muže 45-90 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Metabolismus kreatininu probíhá v ledvinách, svalech, játrech, slinivce břišní

a nalezneme ho v buněčných tekutinách (moč, krev, mozkomíšní mok, plodová voda a sliny) (Rule et al., 2004; <http://www.hmdb.ca/metabolites>). Normální koncentrace kreatininu v moči u dospělého člověka je asi $12475 \pm 7955 \mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a byla stanovena metodou LC-MS/MS (Liquid Chromatography / Mass Spectrometry) (Bouatra et al., 2013).

1.7.3 Trimethylamin-N-oxid (TMAO)

Obrázek č. 5: Vzorec Trimethylaminu-N-oxidu převzato z: <http://www.hmdb.ca/metabolites>.



Chemické vlastnosti

Chemický vzorec: $\text{C}_3\text{H}_9\text{NO}$

Průměrná molekulová hmotnost: 75,109

Monoizotopická molekulová hmotnost: 75,068 Da

Obecná charakteristika

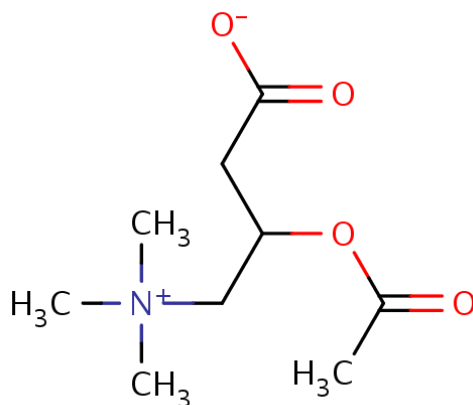
TMAO je organická, alifatická acyklická sloučenina. Vzniká oxidací trimethylaminu a najdeme ho u zvířat i lidí. Má charakteristický zápach po rybách. TMAO je využívám k vyrovnání zvýšených koncentrací močoviny a může být použit jako biomarker pro problémy s ledvinami. V krvi se hladiny TMAO zvyšují po požití potravin obsahující karnitin nebo lecitin. V přítomnosti TMAO dochází k ukládání cholesterolu ve stěnách tepen. V buňce se nachází v cytoplazmě v pevném skupenství

či tělních tekutinách (krev, moč, sliny) nebo tkáních (pokožka, ledviny, játra) (<http://www.hmdb.ca/metabolites>; Chung et al., 2005; Podadera et al., 2005).

Koncentrace TMAO byla stanovena metodou NMR (Nuclear Magnetic Resonance) a u dospělých jedinců v moči se pohybuje v rozmezí 4,8 - 509 $\mu\text{mol}\cdot\text{mmol}^{-1}$ kreatininu (Bouatra S et al., 2013).

1.7.4 Acetyl-L-karnitin (ALC)

Obrázek č. 6: Vzorec Acetyl-L-karnitinu převzato z: <http://www.hmdb.ca/metabolites>.



Chemické vlastnosti

Chemický vzorec: $\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}_4$

Průměrná molekulová hmotnost: 203,236

Monoizotopická molekulová hmotnost: 203,116 Da

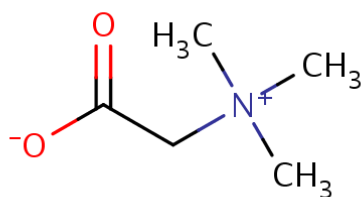
Obecná charakteristika

Acetyl-L-karnitin je ester L-karnitinu a kyseliny octové, který umožňuje pohyb acyl-CoA do matrix savčích mitochondrií za probíhající oxidace mastných kyselin. Je důležitým metabolitem pro metabolismus lipidů, ale má i roli neuroprotektivní a může pomáhat při různých chorobných procesech. ALC lze získat z potravy

či syntézou a v organismu zajišťuje buněčnou signalizaci, slouží jako zdroj energie a zajišťuje pevnost membrány. Lze ho použít jako stabilizátor nebo jako emulgátor. V buňce se obvykle nachází v cytoplazmě, mitochondriích, cytoplazmatickém retikulu. Dále ho najdeme v tělních tekutinách jako krev, moč, mozkomíšni mok nebo tkáních mozek, svaly, nervové buňky (Kamimori et al., 1994; Zanelli et al., 2005; <http://www.hmdb.ca/metabolites>). Normální koncentrace ALC u dospělých osob v moči je 0,4-5,9 $\mu\text{mol}\cdot\text{mmol}^{-1}$ kreatininu a byla stanovena metodou DFI-MS/MS (Bouatra et al., 2013).

1.7.5 Betain (N, N, N - trimethylglycin)

Obrázek č. 7: Vzorec Betainu převzato z: <<http://www.hmdb.ca/metabolites>>.



Chemické vlastnosti

Chemický vzorec: $\text{C}_6\text{H}_{11}\text{NO}_2$

Průměrná molekulová hmotnost: 117,146

Monoizotopická molekulová hmotnost: 117,789 Da

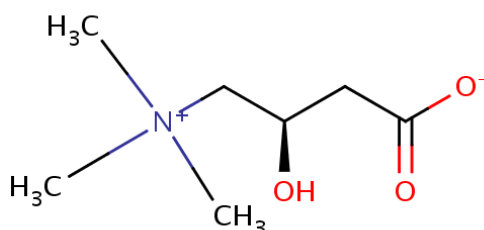
Obecná charakteristika

Betain je N-trimethylová aminokyselina objevená v 19. Století v cukrové řepě (Beta vulgaris), odtud pochází i jeho název. Často je označován jako glycinbetain, aby se odlišil od jiných betainů, které se nacházejí v mikroorganismech, rostlinách i živočiších. Betain je dobrým dárcem methylové skupiny a tím usnadňuje některé chemické procesy, zajišťující správné fungování jater, buněčné dělení a detoxikaci. Betain je také

důležitý při tvorbě karnitinu a zajišťuje správné fungování ledvin. Můžeme ho získat z potravy nebo oxidací cholinu. Jeho nedostatek může vést k metabolickému syndromu, poruchám metabolismu tuků, cukrovce a cévním chorobám. Betain je používán pro léčbu onemocnění jater, hyperkalemie, homocysteinemie a gastrointestinálních poruch. V buňce se nachází v cytoplazmě a v organismu slouží jako složka metabolismu glycinu, serinu a treoninu. Lze ho nalézt v následujících tělních tekutinách (krev, moč) či tkáních (tuková, kůra nadledvin, močový měchýř, střevo, ledviny, játra, svaly). (Lever a Slow, 2010; <http://www.hmdb.ca/metabolites>). Koncentrace v moči dospělých jedinců je v rozmezí 2,7-24,7 $\mu\text{mol}\cdot\text{mmol}^{-1}$ kreatininu a byla zjištěna pomocí metody NMR (Nuclear Magnetic Resonance) (Bouatra et al., 2013).

1.7.6 L-karnitin

Obrázek č. 8: Vzorec L-karnitinu převzato z: <<http://www.hmdb.ca/metabolites>>.



Chemické vlastnosti

Chemický vzorec: $\text{C}_7\text{H}_{15}\text{NO}_3$

Průměrná molekulová hmotnost: 161,199

Monoizotopická molekulová hmotnost: 161,105 Da

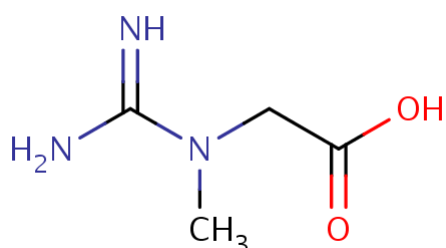
Obecná charakteristika

L-karnitin není esenciální aminokyselina, je syntetizován v těle a zajišťuje energii všem svalům, včetně srdečního. Je označován za vitamin, aminokyselinu a základní metabolit. Jako vitamin B obsahuje karnitin dusík a je velmi snadno rozpustný ve vodě.

Jeho funkcí je přepravovat lipidy do mitochondrií svalových buněk, většina karnitinu se do těla dostává z potravy. Nedostatek L-karnitinu je spojen s poruchami funkce jater a svalovou slabostí. L-karnitin se nachází v buňce v cytoplazmě, mitochondriích, endoplazmatickém retikulu či extracelulárně. L-karnitin je přítomen v tělních tekutinách (krev, mozkomíšní mok, moč) a tkáních (tuková, erytrocyty, mozek, močový měchýř, játra, plíce, srdeční sval, nervové buňky) (<http://www.hmdb.ca/metabolites>). Normální koncentrace L-karnitinu v moči u dospělého člověka je v rozmezí 0,62-15,21 $\mu\text{mol}\cdot\text{mmol}^{-1}$ kreatininu. Tato koncentrace byla stanovena metodou DFI-MS/MS (Bouatra et al., 2013).

1.7.7 Kreatin

Obrázek č. 9: Vzorec Kreatininu převzato z: <<http://www.hmdb.ca/metabolites>>.



Chemické vlastnosti

Chemický vzorec: C₄H₉N₃O₂

Průměrná molekulová hmotnost: 131,133

Monoizotopická molekulová hmotnost: 131,069 Da

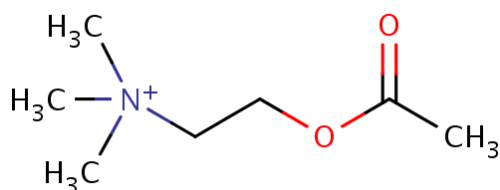
Obecná charakteristika

Kreatin je aminokyselina nacházející se ve tkáních, moči a svalech obratlovců jako kreatinfosfát. Je vylučován jako kreatinin do moči a je důležitým zdrojem energie pro buňky. U člověka je kreatin syntetizován především v játrech za pomoci třech různých aminokyselin argininu, glycinu a metioninu. Kreatin má pevné skupenství a v buňce je

uložen v cytoplazmě a mitochondriích. Dále ho můžeme najít v tělních tekutinách (krev, moč, mozkomíšní mok) a tkáních (tuková, mozek, kůže, močový měchýř, srdce, ledviny, játra) (Yoshizumi a Tsourounis, 2004; <http://www.hmdb.ca/metabolites>). Koncentrace kreatinu v moči u dospělých jedinců se pohybuje v rozmezí 3 - 448 $\mu\text{mol}\cdot\text{mmol}^{-1}$ kreatininu a byla stanovena metodou NMR (Bouatra et al., 2013).

1.7.8 Acetylcholin (ACh)

Obrázek č. 10: <Vzorec Acetylcholinu převzato z: <<http://www.hmdb.ca/metabolites>>.>



Chemické vlastnosti

Chemický vzorec: $\text{C}_7\text{H}_{16}\text{NO}_2$

Průměrná molekulová hmotnost: 146,207

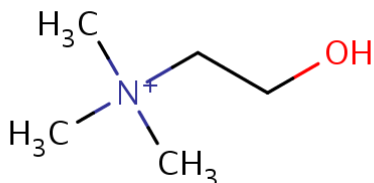
Monoizotopická molekulová hmotnost: 146,118 Da

Obecná charakteristika

Acetylcholin je neurotransmitter, který je důležitý pro nervový systém. U obratlovců je důležitý zejména pro nervové ploténky, parasimpatikus a další místa centrálního nervového systému. V organismu člověka slouží jako složka metabolismu glycerofosfolipidů a v buňce ho najdeme v cytoplazmě či jádrech. ACh lze detekovat z mozkomíšního moku a tkání (tuková tkáň, střevo, ledviny, močový měchýř, plíce, svaly, nervové buňky) (<http://www.hmdb.ca/metabolites>; Shirahata et al., 2007). Normální koncentrace acetylcholinu v mozkomíšním moku se pohybuje okolo $0,034 \pm 0,009 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Jia et al., 2004).

1.7.9 Cholin

Obrázek č. 11: Vzorec Cholinu převzato z: <<http://www.hmdb.ca/metabolites>>.



Chemické vlastnosti

Chemický vzorec: C₅H₁₄NO

Průměrná molekulová hmotnost: 104,171

Monoizotopická molekulová hmotnost: 104,108 Da

Obecná charakteristika

Cholin je základní stavební složkou lecitinu, který se nachází převážně v rostlinách a orgánech živočichů. Vzniká syntézou acetylcholinu a poskytuje methylovou skupinu pro různé metabolické procesy, zejména pro metabolismus tuků. V současné době je cholin považován za důležitý vitamín, který člověk může získat převážně z potravy. Potraviny obsahující cholin jsou vejce, játra a arašídny. Největší množství cholinu se nachází ve fosfatidylcholinu nebo lecitinu. Cholin lze detekovat z tělních tekutin (moč, krev, mateřské mléko, sliny, mozkomíšni mok) a tkání (bazální ganglia, močový měchýř, mozek, kůže, střevo, ledviny, játra, svaly). Nedostatek cholinu může vést k poruchám jater a až k jejich celkovému poškození (<http://www.hmdb.ca/metabolites>). Normální koncentrace cholinu u dospělého člověka se pohybuje v rozmezí 1,4 - 1,6 $\mu\text{mol}\cdot\text{mmol}^{-1}$ kreatininu a byla zjištěna pomocí metody NMR (Bouatra et al., 2013).

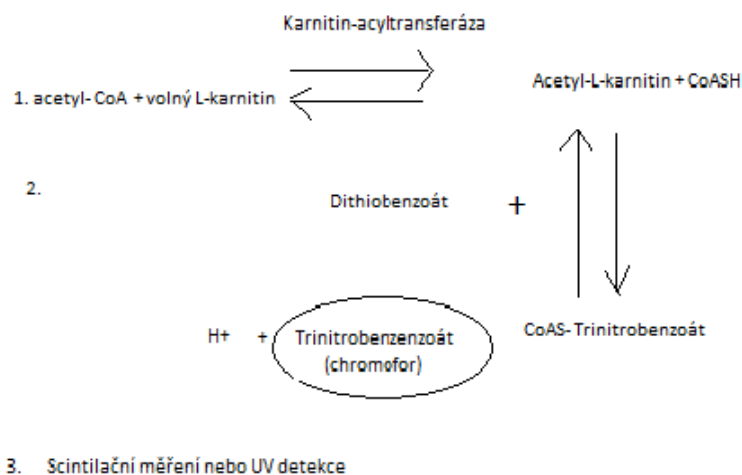
1.8 Analytické metody pro stanovení L-karnitinu a acylkarnitinů

Pro rozbor L-karnitinu a acylkarnitinů se používá široká škála odlišných metod založených na zcela různých analytických principech. Metody stanovující L-karnitin (volný, celkový L-karnitin) a acylkarnitiny jsou široce používané v klinických laboratořích. K současným metodám pro stanovení volného karnitinu a jeho esterů patří spektrofotometrické a radioenzymatické testy za použití [acetyl-1-¹⁴C] CoA. Mezi složitější metody pro určení L-karnitinu a jeho esterů patří chromatografické postupy jako je například vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) s UV detekcí, GC/MS (plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií) a kapilární elektroforéza (Möder et al., 2005).

1.8.1 Enzymatická analýza

Kvantitativní analýza L-karnitinu je určena pro vzorky moči, plazmy a tkáně. V této analýze se testuje L-karnitin pomocí L-karnitin-acyltransferázy s nebo bez hydrolyzy esterů L-karnitinu. Tato reakce umožňuje zjišťovat pouze volný karnitin a acylkarnitiny musí být hydrolyzovány. Rozdíl celkového a volného L-karnitinu udává množství acylkarnitinů ve vzorku. Metoda určuje volný L-karnitin pomocí nástřiku do bioreaktoru, kde se nachází acyltransferáza, která minimalizuje spotřebu acetylu-CoA. Tuto reakci znázorňuje schéma na obrázku č. 12 (Möder et al., 2005).

Obrázek č. 12: Schéma enzymatické reakce volného karnitinu (M.Möder et al., 2005).



Po reakci s karnitin-acyltransferázou, acetylem-CoA a dithiobenzoátem je volný L-karnitin stanoven spektrofotometricky. Pro ověření se používá vícestupňová enzymatická kaskáda zahrnující adenosinmonofosfát. Citlivost a reprodukovatelnost této metody garantuje přesné měření koncentrace karnitinu i na μ molekulární úrovni. Spektrofotometrie je velice často ovlivněna UV absorpcí sloučenin s podobnou vlnovou délkou a tím dochází k falešně pozitivním výsledkům L-karnitinu. Tato metoda je tedy vhodná pro analýzu celkového a volného karnitinu, ale není vhodná pro diagnostiku speciálních diagnostických poruch charakterizovaných nahromaděním a vylučováním jednotlivých esterů karnitinu (Möder et al., 2005).

1.8.2 Chromatografické metody

Analýzu L-karnitinu lze provést jak pomocí plynové tak kapalinové chromatografie.

Plynová chromatografie (GC)

Jednou z metod pro analýzu L-karnitinu je již zmiňovaná plynová chromatografie s hmotnostní detekcí, která při využití chemické ionizace na rozdíl od elektronové ionizace šetří čas potřebný pro předúpravu vzorku (přeměnu L-karnitinu do jeho tepelně stabilních těkavých derivátů). Pro přesnou identifikaci a kvantifikaci L-karnitinu se používají značené estery L-karnitinu jako vnitřní standardy.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)

Další metodou stanovující L-karnitin je HPLC umožňující screening profilu celkového a volného karnitinu, ale i kvantitativní stanovení acylkarnitinů. Analýza probíhá za použití předklonky, která je určena pro chemickou derivatizaci, následuje separační kolona a detekce na UV případně fluorescenčním detektoru. Použité množství vzorku pro analýzu je asi 150 mm³ plazmy, 350 mm³ moči nebo 20 mg tkáň. Při analýze HPLC dojde k oddělení derivátů L-karnitinu od derivátů ostatních látek (Möder et al., 2005). Pro přečištění karnitinu byl použit 4'-fenacylbromid rozpuštěný

v acetonitrilu s 40 % roztokem hydroxidu tetrabutylamonného. Přečištění vzorku umožňuje získat dobré výsledky i pro L-karnitin v séru. Metoda HPLC má také své nevýhody, jelikož je velice pracná a je obtížné získat informace o neznámých látkách, ale stále patří k nejpoužívanějším chromatografickým technikám pro analýzu L-karnitinu (Möder et al., 2005).

1.8.3 Hmotnostní spektrometrie (MS) v analýze L-karnitinu

Vzhledem k omezené iontové povaze a nedostatečné volatilitě karnitinu při GC-MS a LC-MS byly vyvinuty alternativnější přístupy ionizace. A to rozbíjení rychlými atomy (FAB) MS, desorpční chemická ionizace (DCI) MS, ionizace za atmosférického tlaku (API) MS, a nebo ionizace laserem za přítomnosti matrice (MALDI) MS. Metoda MS poskytuje informace o profilu acylkarnitinů i o koncentracích jednotlivých látek bez předběžné separace a je vhodná pro stanovení kvartérních amoniových léčiv strukturně podobných karnitinu. Interpretace MS spekter je ale někdy obtížná, protože dochází ke vzniku šumu, který doprovází jednotlivé látky. Selektivita a citlivost hmotnostní spektrometrii může být zlepšena technikami MS-MS, které přesně definují cílové analyty a jsou používány pro kvantifikaci a poskytují znalosti o analytech v rámci studií (Möder et al., 2005).

Ionizace elektrosprejem (ESI)

Pro analýzu L-karnitinu je nejvhodnější ionizační technikou ionizace elektrosprejem, která se vyznačuje vysokonapětovým nástřikem obsahujícím kovovou kapiláru na kterou je vkládáno vysoké napětí (3-5 kV), která za přispění zmlžujícího plynu umožní vznik kapiček, obsahujících na povrchu velké množství nábojů po následném odpaření rozpouštědla dojde ke zvýšení hustoty povrchového náboje. Při dosažení kritické hodnoty povrchového náboje dojde k tzv. Coulombické explozi a vzniku mnoha menších kapiček s rozděleným původním nábojem. V konečné fázi ionizace vznikají ionty analytů v našem případě L-karnitinu. L-karnitin se jeví jako

obojetný ion (uvnitř molekuly se nacházejí kladné a záporné náboje). (Möder et al., 2003).

Speciální metodou pro stanovení acylkarnitinů je kombinace mikroextrakce na pevné fázi (SPME - Solid Phase Microextraction) a elektrosprejové ionizace s hmotnostní spektrometrií (ESI-MS). Tato Metoda je vhodná pro vzorky moče a plazmy obsahující nízké koncentrace L-karnitinu a acylkarnitinů (Möder et al., 2005).

1.8.4 Metody MS/MS

Při tandemové hmotnostní spektrometrii či analýze MS/MS slouží první analyzátor k oddělení prvotního (prekurzorového) iontu od směsi iontů vytvořené během ionizačního procesu (například ESI). Oddělené ionty poté procházejí kolizním článkem, který je naplněný kolizním plynem. Ionty se rozpadají dle podmínek nastavených v kolizní cele (kolizní indukovaná disociace) a následně může být za pomoci druhého hmotnostního analyzátoru provedena analýza fragmentů vzniklých při kolizi. Výsledné hmotnostní spektrum obsahuje všechny fragmenty předem vybraného iontu a poskytuje informace o struktuře látek. (Mueller et al., 2003).

Analýza acylkarnitinů v plazmě pomocí ESI-MS-MS je účinnou a rychlou metodou pro určení poruch souvisejících s membránovými transportními procesy a díky tomu může být léčba zahájena okamžitě. V současné době jsou ale nejvíce používány analytické metody pro analýzu L-karnitinu využívající kapalinovou chromatografii spojenou s hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS) (Möder et al., 2005).

Tabulka č. 2: Přehled metod pro stanovení karnitinových metabolitů v moči (Mansour et al., 2013).

analyty	matrice	Metoda stanovení	Derivatizační činidlo	detekce
C0, C2, C3,C4, C5, C5-OH, C6, C8, C8:1, C10, C10:1, C12, C14, C14:1,C14OH, C16, C16:1, C16OH, C16:1OH, C18, C18OH, C18:1OH, C18:2OH	moč	ESI- MS/MS	Butanol-HCl	MS/MS
C0, C2	moč	HILIC	-	MS
C0, C2, C3, C5,C6, C8, C14, C16, C18	moč	IPLC	HFBA	MS/MS
C3, C4, C5, C5:1, C6, C8	moč	GC	DIPEA	MS
C0, C2, C3, C5, C6, C8	moč	CE	BPTS	UV při 260 nm

C0 karnitin, C2 acetyl-L-karnitin, C3 propionylkarnitin, C4 butyrylkarnitin, C5 valerylkarnitin, C5:1 triglylkarnitin, C5-OH 3-hydroxy-isovalerylkarnitin, C6 hexanoylkarnitin, C8 octanoylkarnitin, C8:1 octenoylkarnitin, C10 decanoylkarnitin, C10:1 decenoylkarnitin, C12 laurylkarnitin, C14 myristoylkarnitin, C14-OH 3-hydroxytetradecanoylkarnitin, C14:1 tetradecenoylkarnitin, C16 palmitoylkarnitin, C16:1 hexadecenoyl-L-karnitin, C16:1OH-3-hydroxy-palmitoleoylkarnitin, C16OH-3-hydroxy-hexadecanoylkarnitin, C18 stearoylkarnitin, C18:1 oleylkarnitin, C18:1OH 3-hydroxyoctadecenoyl, C18:2OH 3-hydroxylinoleylkarnitin, C18OH 3-hydroxyoctadecanoyl, CE kapilární elektroforéza, DIPEA N,N-diisopropylethylamin, HFBA kyselina heptafluorobutyrová, BPTS 4'-bromfenacyl trifluoromethansulfonát, IPLC iontově párovací kapalinová chromatografie.

1.9 Hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)

Toto označení bylo poprvé použito v roce 1990 pro chromatografickou techniku, při které analyty interagují s hydrofilní stacionární fází, a eluce probíhá za pomoci binární hydrofilní mobilní fáze, která obsahuje složku vody jako eluční činidlo. Mechanismus metody HILIC není stále plně objasněn a mezi doporučované postupy patří rozdělování mezi hydrofobní částí mobilní fáze a silně hydrofilní vrstvou vody. Hydrofilní vrstva vody je na povrch polární stacionární fáze, která má za úkol přenášet vodu. Mezi nejvíce používané stacionární fáze patří silikagel a silikagel modifikovaný aminopropylovou funkční skupinou. Pro retenci a selektivní separaci analytů zásaditého charakteru je vhodnější použití stacionární fáze modifikované amidovou nebo zwitteriontovou sulfbetainovou skupinou. Pro ovlivnění retence se používá přídavek pufrů do mobilní fáze s tím, že obvykle retence klesá, zatímco se zvyšuje koncentrace solí. Toto není podmínkou a může vzniknout i opačný jev. Pro spojení HILIC s MS jsou aplikovány těkavé amonné soli kyseliny mravenčí a octové za použití mobilní fáze s vysokým obsahem acetonitrilu. Volba pH mobilní fáze záleží na vlastnostech analytu.

V mobilní fázi HILIC je zastoupeno vysoké procento organické složky (především acetonitril (ACN) s obsahem > 50 %) a vodná složka je tvořena z malého procenta vody či těkavého pufru. Pro dodržení podmínek pro vodnou HILIC by měl být obsah vodné složky minimálně 2,5 %. Volba organického rozpouštědla ovlivňuje retenci při HILIC separaci a eluční síla organických rozpouštědel se zvyšuje se vzrůstající polaritou rozpouštědla. Nejvíce používaným rozpouštědlem je ACN při čemž ostatní jsou používány spíše ke změně selektivity systému. Účinek separace HILIC je také závislá na rozpouštědle, ve kterém je rozpuštěn vzorek, ten by měl být rozpuštěn v rozpouštědle podobnému složení jako je mobilní fáze při analýze. Pokud je pro separaci použit vzorek rozpuštěný v rozpouštědle s vysokým obsahem vody, dochází ke ztrátám účinnosti separace, snížení retence a distorzi píku. Tvar píku ovlivňuje také dávkovaný objem a ten by měl být co nejmenší, aby nedocházelo k rozmývání chromatografických píků (Nováková, 2013).

1.9.1 Výhody metody HILIC

Metoda HILIC je vhodná pro spojení s ionizací pomocí elektrospreje a to díky mobilním fázím s vysokým obsahem ACN a dále poskytuje dobrou retenci pro polární látky. Umožňuje přímý nástřik extraktů získaných z RP extrakce na tuhou fázi a to bez odpařování a opětovného rozpuštění. Použití vysokých průtoků mobilní fáze snižuje zpětný tlak v systému. HILIC je jednoduchou náhradou chromatografie na normálních fázích, která je špatně reprodukovatelná a způsobuje problémy při spojení s MS detekcí (Nováková, 2013).

1.9.2 Aplikace metody HILIC

Tato metoda se stala v poslední době velice používanou v oblasti farmacie a bioanalytiky. Pomocí této metody lze předejít problémům při vývoji analytické metody. Nejpoužívanější stacionární fází v okruhu HPLC je kolona Atlantis HILIC na bázi klasického silikagelu (Nováková, 2013).

2 Cíle práce

Shromáždit literaturu o metabolismu karnitinů, jejich složení v moči a významu v klinické diagnostice.

Připravit přehled o současných metodách analýzy profilu karnitinů v moči nebo krevním séru.

Získat základní laboratorní trénink v přípravě vzorků a analýze karnitinů instrumentální metodou kapalinové chromatografie -hmotnostní spektrometrie (LC-MS).

Vyzkoušet metodu pro stanovení profilu karnitinů v moči a porovnat kontrolní vzorky se vzorky pacientů s diagnostikovanou rakovinou.

3 Metodika

3.1 Použité chemikálie

Všechny použité chemikálie byly analytické čistoty vhodné pro analýzy s využitím kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. Všechny chemikálie použité v mé práci jsou sumárně uvedeny v tabulce číslo 3.

Tabulka č. 3: Chemikálie použité pro analýzu.

Látka	Výrobce
Karnitin	Sigma–Aldrich (Německo)
D3-karnitin	Chemical Innovations Limited (Velká Británie)
Acetyl karnitin	Santa Cruz Biotechnology (Německo)
Butyrylkarnitin	Santa Cruz Biotechnology (Německo)
Isobutyrylkarnitin	Santa Cruz Biotechnology (Německo)
Betain	Calbiochem (Německo)
Cholin	Fluka (Německo)
Trimethylamin-N-oxid	Sigma -Aldrich (Německo)
Kreatin	Chemapol (Velká Británie)
Kreatinin	Sigma -Aldrich (Německo)
Acetylcholin	Fluka (Německo)
Acetonitril (ACN)	Fisher Scientific (Velká Británie)
Methanol (MeOH)	Fisher Scientific (Velká Británie)
Hydroxid amonný (30%)	Sigma-Aldrich (Německo)
Uhličitan amonný	Sigma –Aldrich (Německo)

3.2 Použité instrumenty

Accela Autosampler (Thermo Scientific, USA)

Accela 600 Pump (Thermo Scientific, USA)

Hmotnostní detektor (lineární iontová past) LTQ-XL (Thermo Scientific, USA)

Analytické váhy - typ R-200D (Sartorius, Německo)

Centrifuga - Universal 320 R (Hettich Zentrifugen, Německo)

pH metr – typ HI 9024 (HANNA Instruments, Německo)

3.3 Příprava roztoků standardů pro analýzu

Jednotlivé standardy byly naváženy na analytických vahách a následně rozpuštěny v 10 ml deionizované vody s výjimkou Isobutyrylkarnitinu, který byl rozpuštěn v 5 ml deionizované vody. Takto připravené roztoky byly dále ředěny pomocí deionizované vody až na výslednou koncentraci $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ každého standardu.

Tabulka č. 4: Příprava roztoků standardů o koncentraci $0,5 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Název	MW	MW · HCl	m [mg]	$V_{\text{H}_2\text{O}}$ [ml]	c [nmol · μl^{-1}]	V_{A} [μl]	V_{B} [μl]
Karnitin	162,21	197,7	1,58	10:1	0,974	513	487
D3-karnitin	165,23	200,62	1,56	10:1	0,944	530	470
Acetylkarnitin	204,25	239,7	2,05	10:1	1,004	498	502
Butyry karnitin	232,3	267,77	2,31	10	0,994	503	497
Isobutyrylkarnitin	232,3		1,00	5	0,861	581	419
Betain	118,16	153,6	1,52	10	0,990	505	495
Cholin	104,17	139,63	4,35	10	3,115	161	839
Trimethylamin-N-oxid	76,12		0,84	10	1,104	453	547
Kreatin	131,14		1,37	10	1,045	478	522
Kreatinin	113,12		1,18	10	1,044	479	521
Acetylcholin	146,21	181,67	1,88	10	1,032	484	516

$V_{\text{H}_2\text{O}}$ = Objem vody, v níž byla rozpuštěna základní navážka standardu, takto byl připraven pracovní roztok o koncentraci c ($\text{nmol} \cdot \mu\text{l}^{-1}$); V_{A} = Objem standardu pro přípravu výsledného

roztoku standardu o koncentraci $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$; V_B = Objem vody pro přípravu výsledného roztoku o koncentraci $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$.

3.4 Příprava mobilní fáze pro analýzu HPLC

Jako mobilní fáze pro analýzu byly připraveny dva roztoky. První mobilní fáze (A) byla složena z $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ roztoku uhličitanu amonného, u kterého bylo upraveno pH na 9,2 pomocí 30% hydroxidu amonného. Druhou mobilní fází (B) byl 90 % ACN.

3.5 Popis použitých vzorků pro měření

Pro skupinu pacientů bylo použito 43 vzorků moči žen různého věku, rozdílné medikace a rozdílného stádia nemoci, u kterých byla diagnostikována rakovina prsu. Jako kontrolní skupina bylo zvoleno 6 zdravých žen ve věku od 30 do 60 let.

Tabulka č. 5: Vzorky použité pro měření na hmotnostním analyzátoru LTQ.

pořadové číslo	pacient kód	pohlaví	věk	anamnéza	C_{kreatin} [$\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$]
1	1F-22	žena	71	RP	4.848
2	1F-24	žena	62	RP	3.644
3	1F-25	žena	58	RP	8.809
4	1F-28	žena	63	RP	5.539
5	1F-30	žena	59	RP	7.547
6	1F-32	žena	73	RP	9.707
7	1F-34	žena	67	RP	13.823
8	1F-36	žena	58	RP	8.503
9	1F-39	žena	50	RP	4.636
10	1F-40	žena	68	RP	8.271
11	1F-41	žena	62	RP	10.307
12	1F-42	žena	73	RP	8.776
13	1F-43	žena	65	RP	4.784

14	1F-44	žena	64	RP	12.401
15	1F-45	žena	45	RP	2.321
16	1F-46	žena	63	RP	4.751
17	1F-47	žena	58	RP	19.365
18	1F-48	žena	60	RP	7.059
19	1F-49	žena	72	RP	18.538
20	1F-50	žena	67	RP	10.839
21	1F-51	žena	62	RP	14.473
22	1F-52	žena	57	RP	3.851
23	1F-53	žena	60	ORP	10.286
24	1F-54	žena	58	RP	3.644
25	1F-56	žena	52	RP	3.84
26	1F-57	žena	67	RP	4.126
27	1F-59	žena	81	RP	14.917
28	1F-60	žena	65	RP	3.321
29	1F-61	žena	62	RP	13.061
30	1F-63	žena	61	RP	1.566
31	1F-67	žena	72	RP	13.38
32	1F-68	žena	56	RP	5.839
33	1F-70	žena	51	RP	2.47
34	1F-72	žena	51	RP	9.337
35	1F-73	žena	55	RP	11.596
36	1F-75	žena	70	RP	1.341
37	1F-76	žena	62	RP	1.496
38	1F-78	žena	73	RP	12.984
39	1F-82	žena	67	RP	9.985
40	1F-90	žena	64	RP	17.394
41	1F-97	žena	72	RP	21.499
42	1F-100	žena	61	RP	8.406
43	1F-101	žena	57	RP	7.106
44	1F-83	žena	54	K	5.654
45	1F-84	žena	33	K	15.358
46	1F-85	žena	30	K	5.531

47	1F-89	žena	58	K	8.197
48	1F-92	žena	43	K	14.109
49	1F-93	žena	38	K	16.758

RP= rakovina prsu; ORP= oboustranná rakovina prsu; K = kontrola

3.6 Parametry HPLC analýzy

Pro LC-MS analýzu byla použita kolona ZIC-pHILIC, 150x4,6mm, 5 μ m (Merck, Německo), během analýzy byl kolonový prostor vyhříván na 35°C. Pro analýzu byly připraveny mobilní fáze dle postupu uvedeného výše. Mobilní fázi A byl 20 mmol·l⁻¹ roztok (NH₄)₂CO₃ o pH=9,2 a mobilní fázi B byl 90% ACN. Gradient pro analýzu byl nastaven podle tabulky číslo 6. Průtok mobilní fáze byl 400 μ l/min a nástřik vzorků 5 μ l.

Tabulka č. 6: Gradient použitý pro HPLC separaci.

RT	A	B
[min]	[%]	[%]
0	80	20
20	20	80
20,1	5	95
23,3	5	95
23,4	80	20
30	80	20

RT = retenční čas; A = mobilní fáze A; B = mobilní fáze B

3.7 Parametry pro nastavení hmotnostního detektoru

Tabulka č. 7 Parametry hmotnostního detektoru LTQ.

Teplota na kapiláře [°C]	300
Teplota iontového zdroje [°C]	250
Sušící plyn 1	30
Sušící plyn 2	20
Sušící plyn 3	1
Napětí na zdroji [kV]	2,50
Napětí na kapiláře [V]	40
Napětí na čočkách [V]	90
Rychlost skenování	1 sken/25 milisekund
Hmotnostní rozsah [Da]	75-850

4 Výsledky a diskuze

V této bakalářské práci bylo zkoumáno 49 vzorků moči žen s diagnózou rakoviny prsu a to jak jednostranné tak oboustranné varianty. Vzorky moči byly poskytnuty pro analýzu z Nemocnicí České Budějovice a.s. Analýza probíhala pomocí kapalinového chromatografu s hmotnostní detekcí (lineární iontová past). Jak už bylo zmíněno výše, ze vzorků moči byly detekovány následující látky: L-karnitin, Acetyl-L-karnitin, Butyryl-L-karnitin, Isobutyryl-L-karnitin, Kreatinin, Kreatin, Trimethylamin-N-oxid, Acetylcholin, Cholin, Betain a to metodou kapalinové chromatografie s hmotnostní detekcí. V tabulce č. 8 jsou jednotlivé analyty vypsány a doplněny o hodnoty získané z chromatogramů a hmotnostních spekter jednotlivých analytů. Tabulka č. 8 obsahuje následující veličiny retenční čas, molekulovou hmotnost, monoizotopickou, hmotu protonované molekuly a hmotu nejintenzivnějšího fragmentu. Dále jsou přiloženy jednotlivé rekonstruované chromatogramy a hmotnostní spektra (MS, MS/MS) pro všechny sledované analyty. Všechna hmotnostní spektra byla snímána formou dependentního skenu při kolizní energii 30 (kolizní indukovaná disociace - CID)

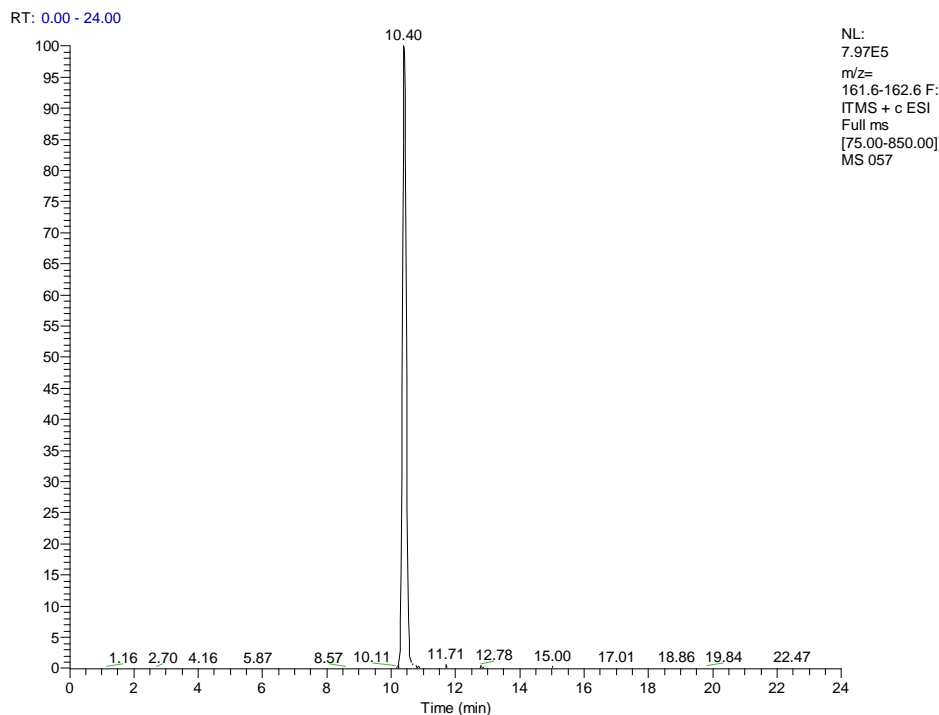
Tabulka č. 8 Hodnoty získané z chromatogramů a hmotnostních spekter jednotlivých analytů.

Název	RT [min]	M_w [g·mol ⁻¹]	M [Da]	MS [M+H] ⁺	MS ²
L-karnitin	10,4	161,2	161,1	162,2	103,0
Acetyl-L-karnitin	8,8	203,2	203,1	204,2	144,9
Butyryl-L-karnitin	7,2	231,2	231,1	232,2	173,0
Kreatinin	7,8	113,1	113,0	114,1	86,0
Kreatin	11,5	131,1	131,0	132,2	90,0
Betain	8,9	117,1	117,7	118,1	59,0
Trimethylamin-N-oxid	8,6	75,1	75,0	76,1	58,1
Acetylcholin	12,4	146,2	146,1	146,2	87,0
Cholin	15,5	104,2	104,1	104,1	60,1

*RT je retenční čas detekované látky
M [Da] monoizotopická hmota látky*

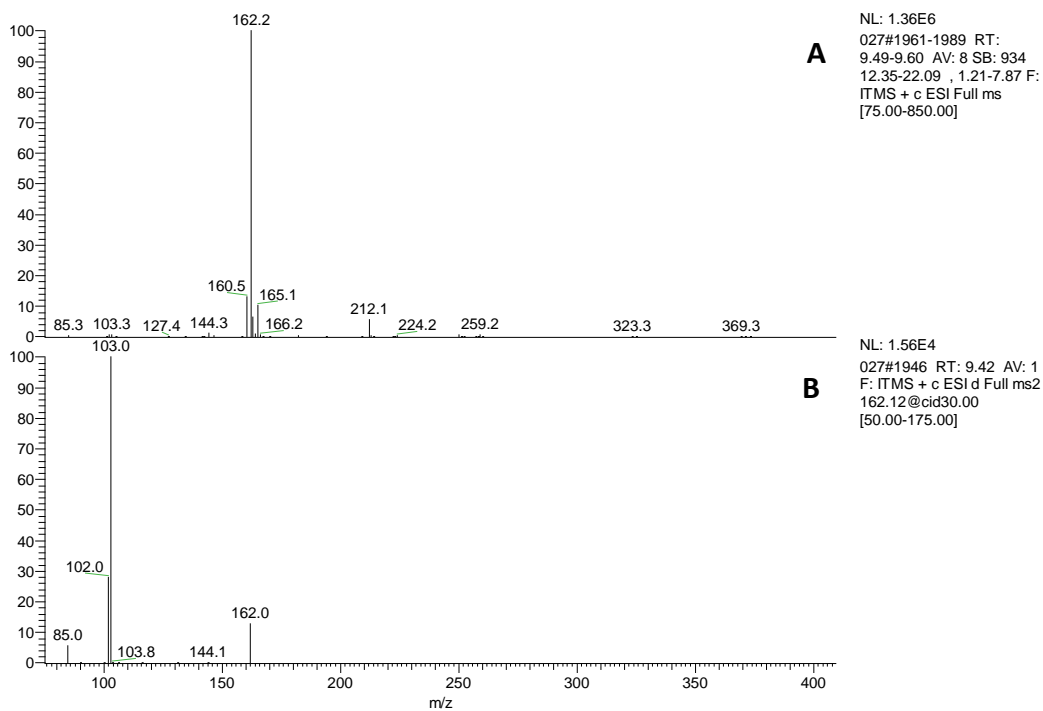
Jednotlivé studované metabolity látky byly podrobeny kvalitativní a kvantitativní analýze. Kvalitativní analýza probíhala na základě porovnání retenčních časů a hmotnostních spekter (MS i MS/MS) s roztoky standardů sledovaných metabolitů. Pro kvantitativní analýzu byla v prvním kroku využita externí kalibrace jednotlivých analytů, v druhém kroku byla pro přesnější kalibraci navržena metoda kalibrace na izotopicky značené interní standardy. Tato metoda nebyla v práci plně využita z důvodu extrémní časové a finanční náročnosti pořízení těchto standardů.

Obrázek č. 13: Chromatografický záznam (chromatogram) L-karnitinu.



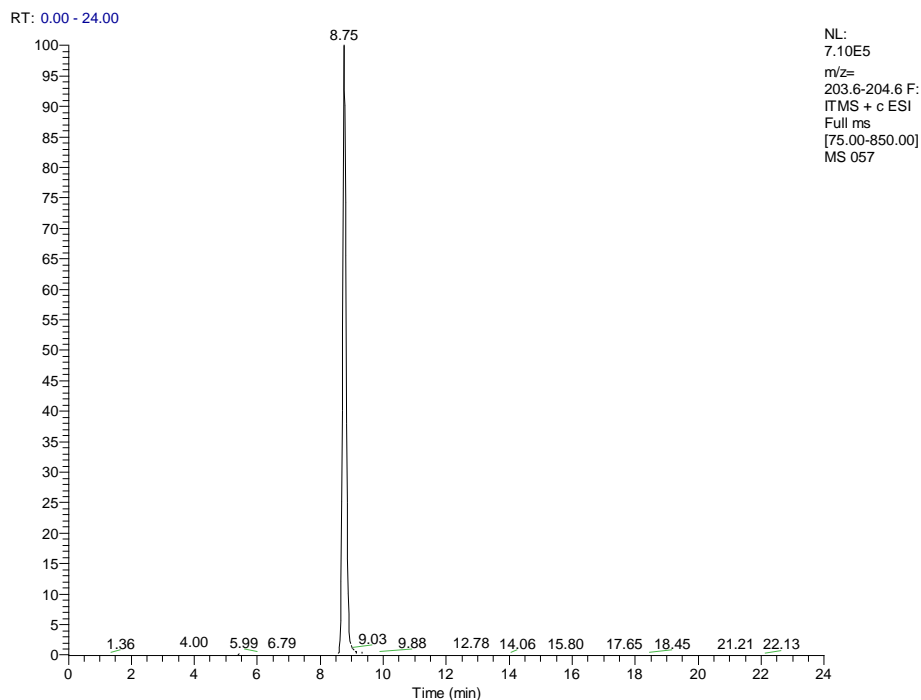
Rekonstruovaný chromatogram (XIC) pro hmotu [162,1±0,5 Da]

Obrázek č. 14: Hmotnostní spektra L-karnitinu.



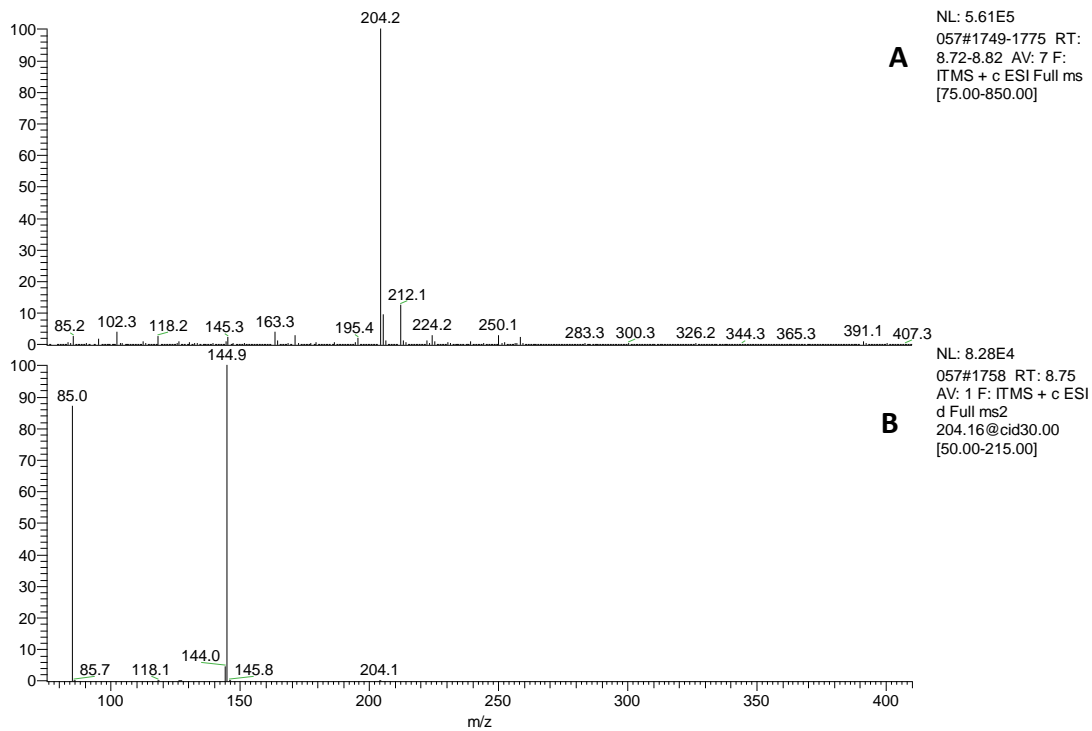
A: Plný sken: ESI+ (75-400 Da); B: MS/MS mode: ESI+ (50-175 Da), CID 30

Obrázek č. 15: Chromatogram Acetyl-L-karnitinu.



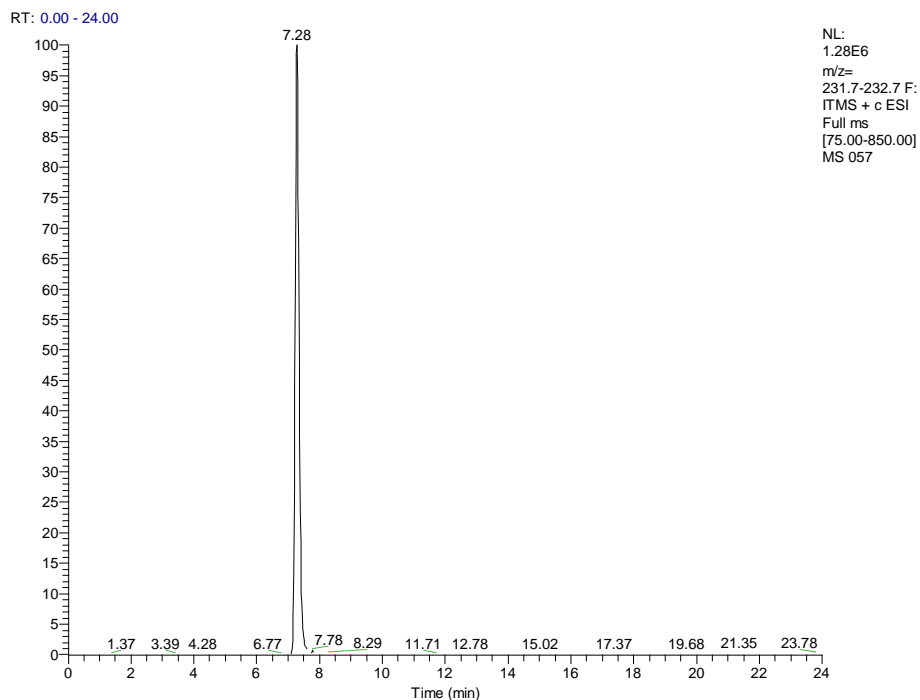
Rekonstruovaný chromatogram (XIC) pro hmotu 204, $I \pm 0,5$ Da.

Obrázek č. 16: Hmotnostní spektra Acetyl-L-karnitinu.



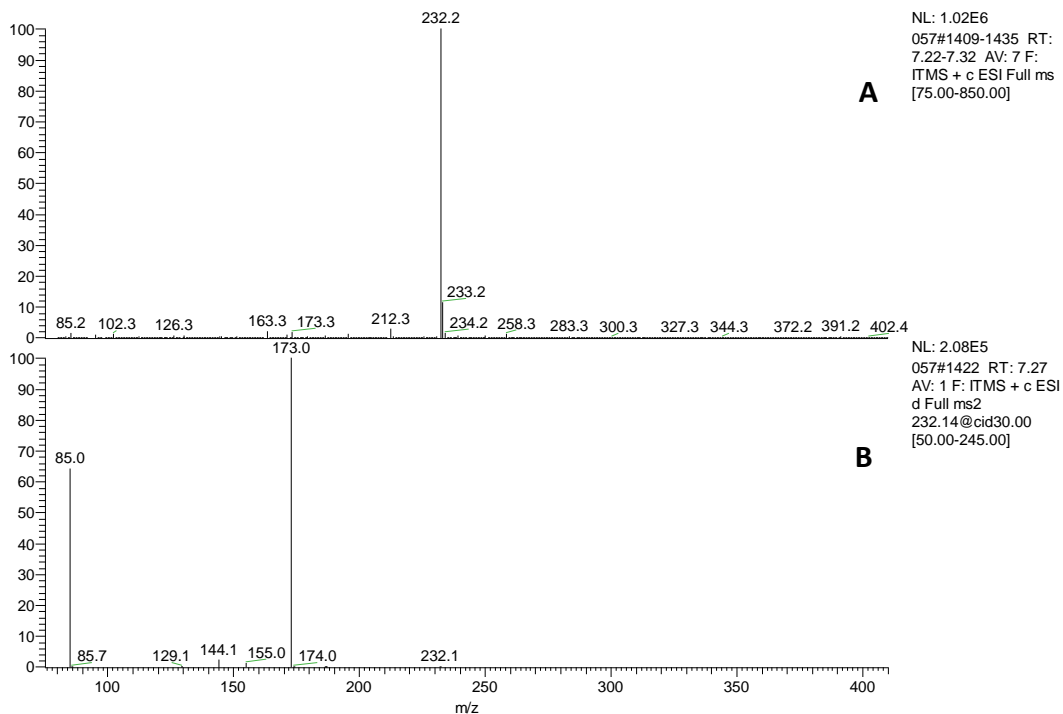
A: Plný sken: ESI+ (75-400 Da); B: MS/MS mode: ESI+ (50-215 Da), CID 30

Obrázek č. 17: Chromatogram Butyryl a isobutyryl-L-karnitinu.



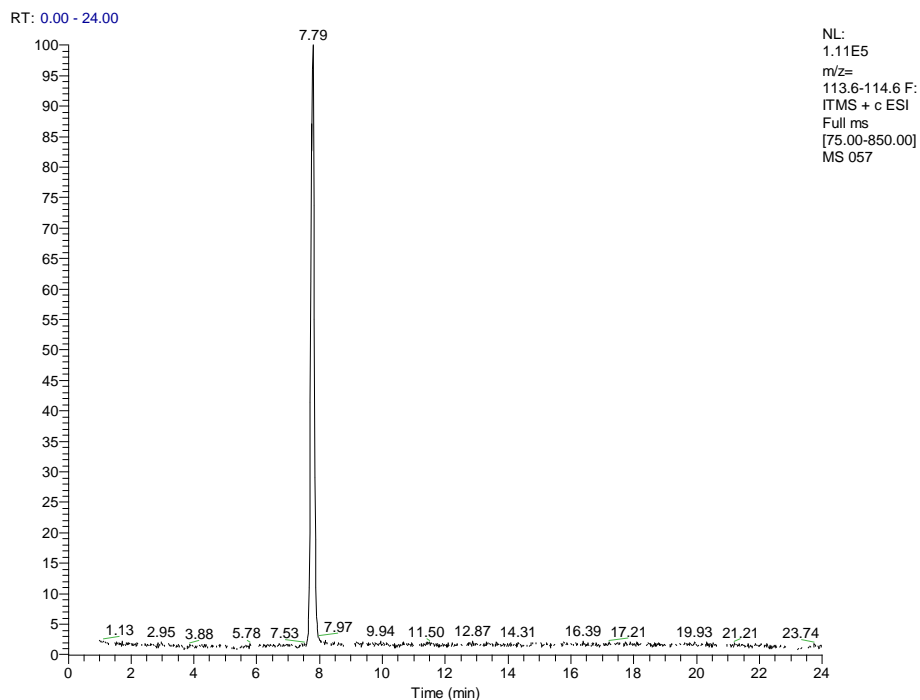
Rekonstruovaný chromatogram (XIC) pro hmotu 232,2±0,5 Da.

Obrázek č. 18: Hmotnostní spektra Butyryl-L-karntinu a isobutyryl-L-karnitinu.



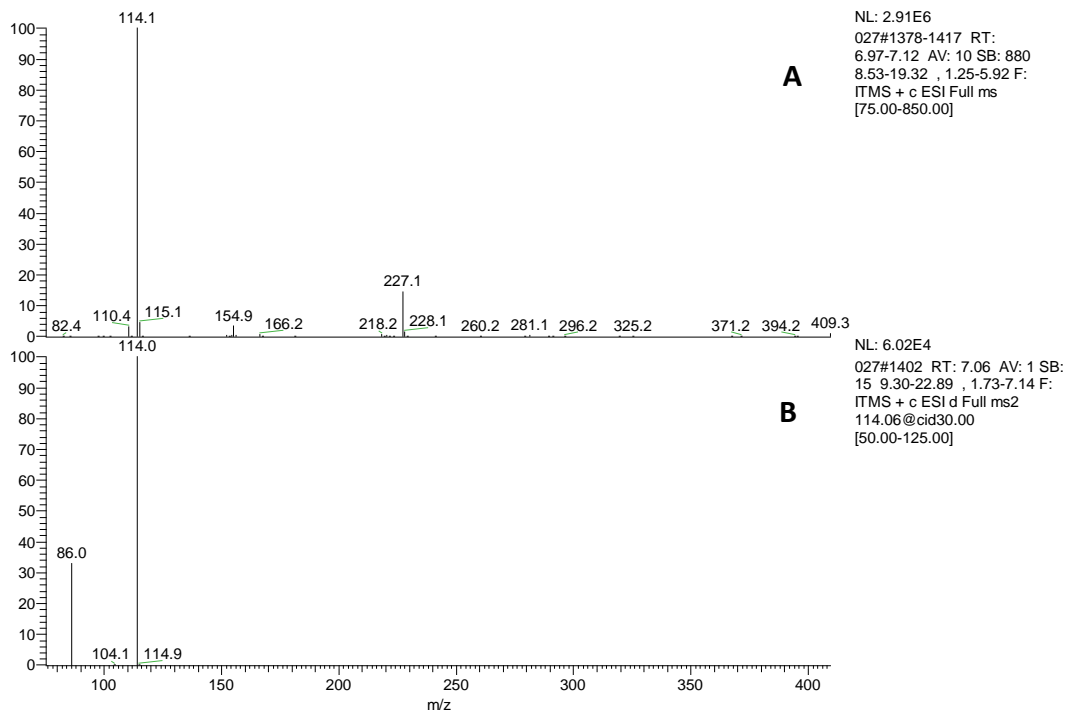
A: Plný sken: ESI+ (75-400 Da); B: MS/MS mode: ESI+ (50-245 Da), CID 30

Obrázek č. 19: Chromatogram Kreatininu.



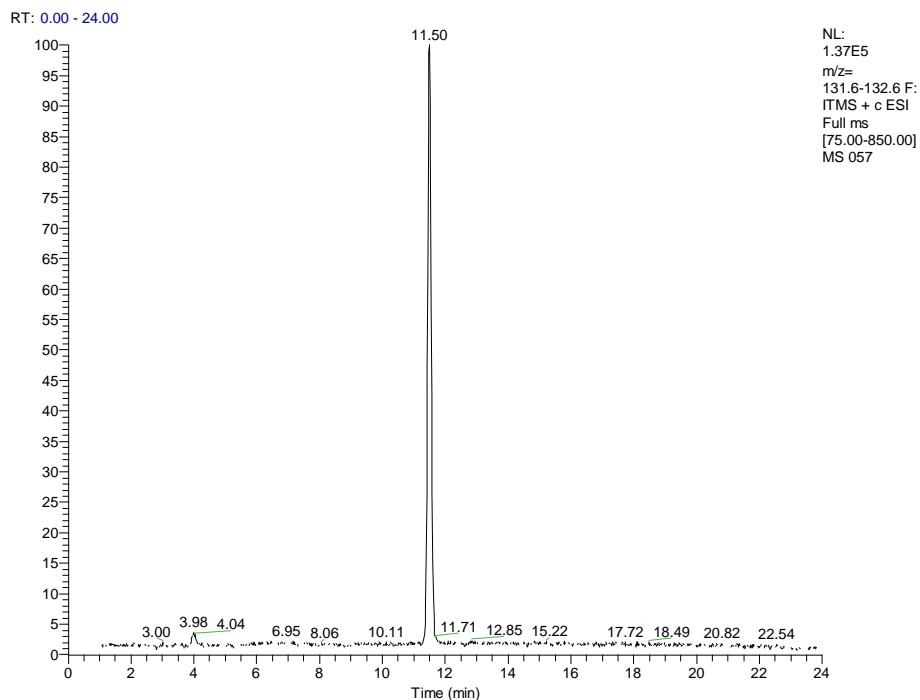
Rekonstruovaný chromatogram (XIC) pro hmotu 114,1±0,5 Da.

Obrázek č. 20: Hmotnostní spektra Kreatininu.



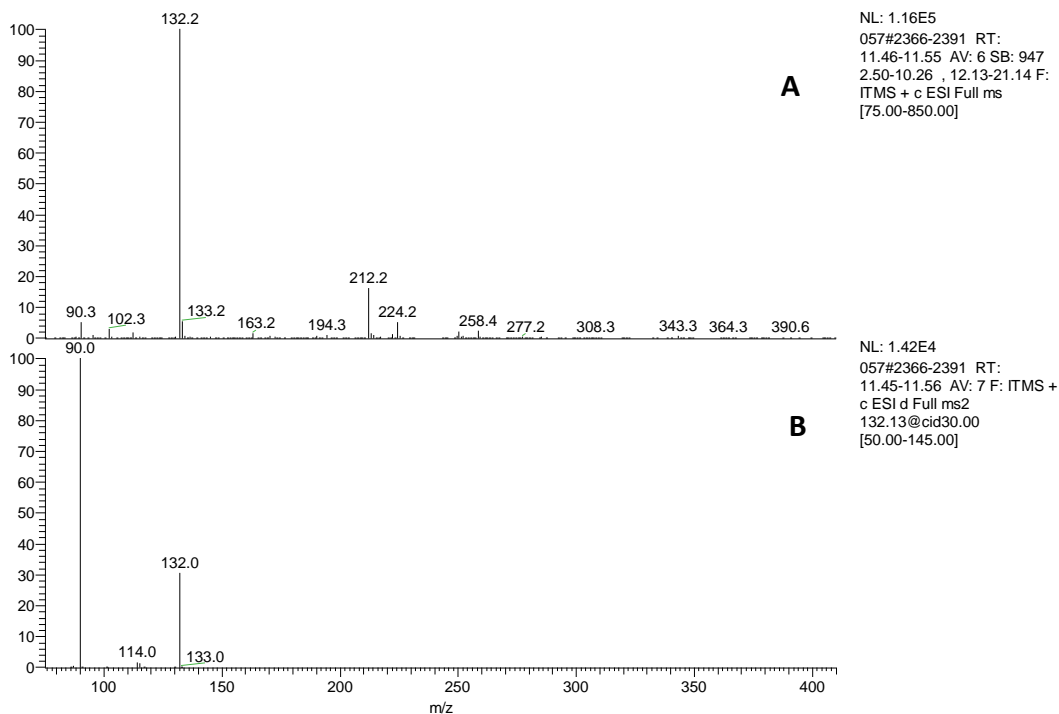
A: Plný sken: ESI+ (75-400 Da); B: MS/MS mode: ESI+ (50-125 Da), CID 30

Obrázek č. 21: Chromatografický záznam Kreatinu.



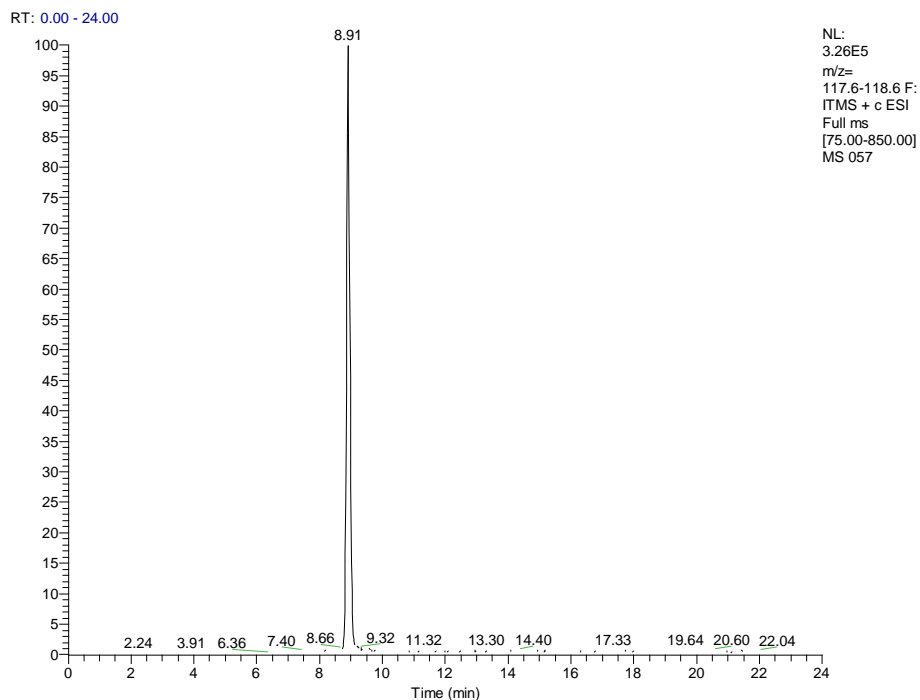
Rekonstruovaný chromatogram (XIC) pro hmotu 132,1±0,5 Da.

Obrázek č. 22: Hmotnostní spektra Kreatinu.



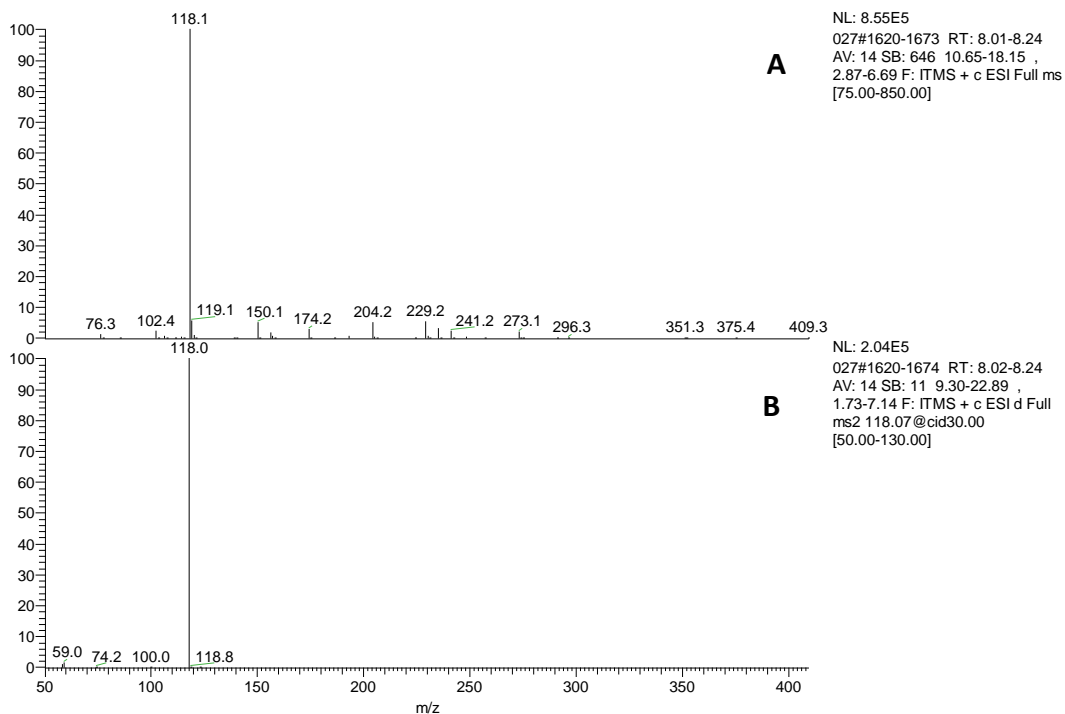
A: Plný sken: ESI+ (75-400 Da); B: MS/MS mode: ESI+ (50-145 Da), CID 30

Obrázek č. 23: Chromatografický záznam Betainu.



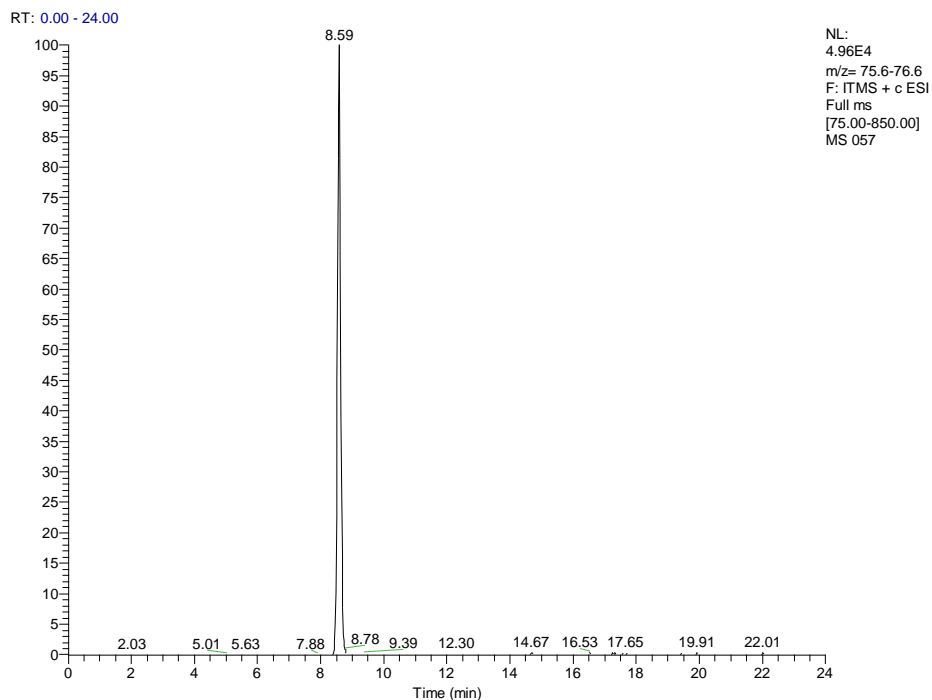
Rekonstruovaný chromatogram (XIC) pro hmotu 118,1±0,5 Da.

Obrázek č. 24: Hmotnostní spektra Betainu.



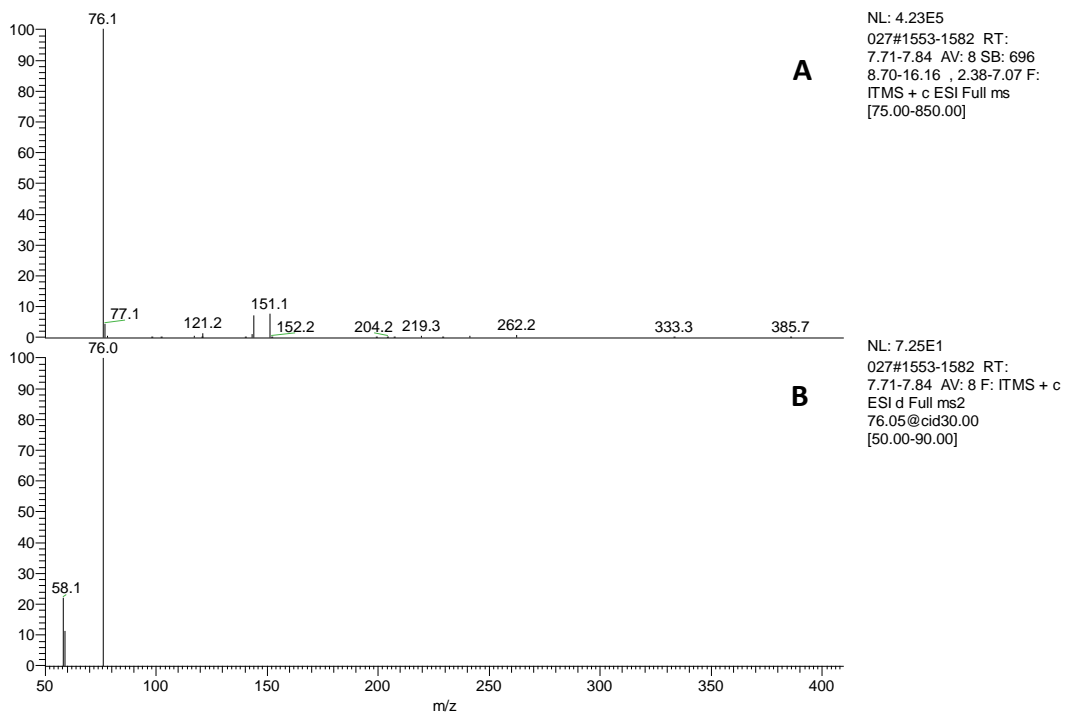
A: Plný sken: ESI+ (75-400 Da); B: MS/MS mode: ESI+ (50-130 Da), CID 30

Obrázek č. 25: Chromatogram Trimethylaminu-N-oxidu.



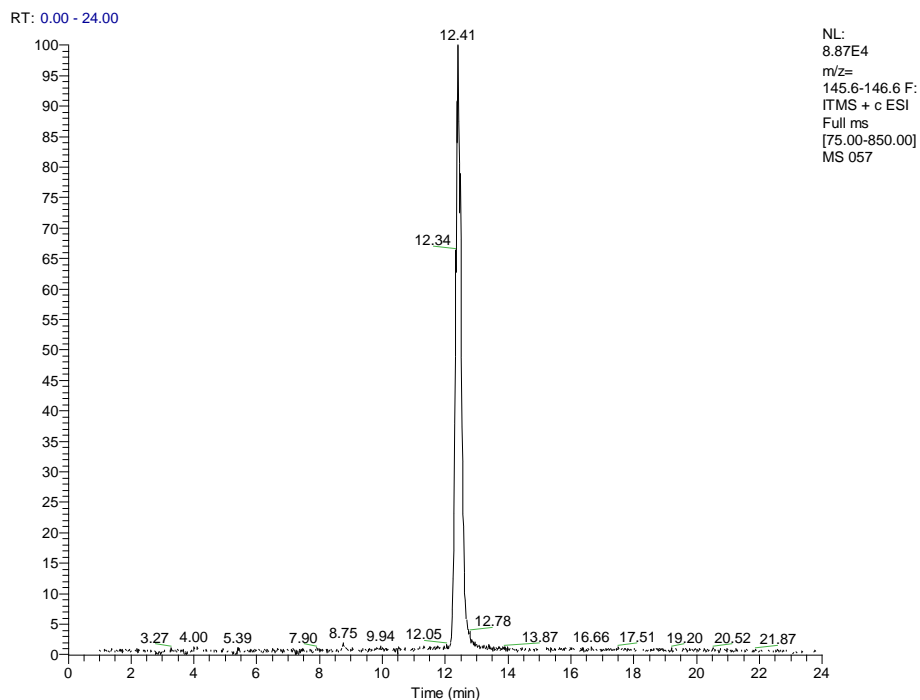
Rekonstruovaný chromatogram (XIC) pro hmotu 76,1±0,5 Da.

Obrázek č. 26: Hmotnostní spektra Trimethylaminu-N-oxidu.



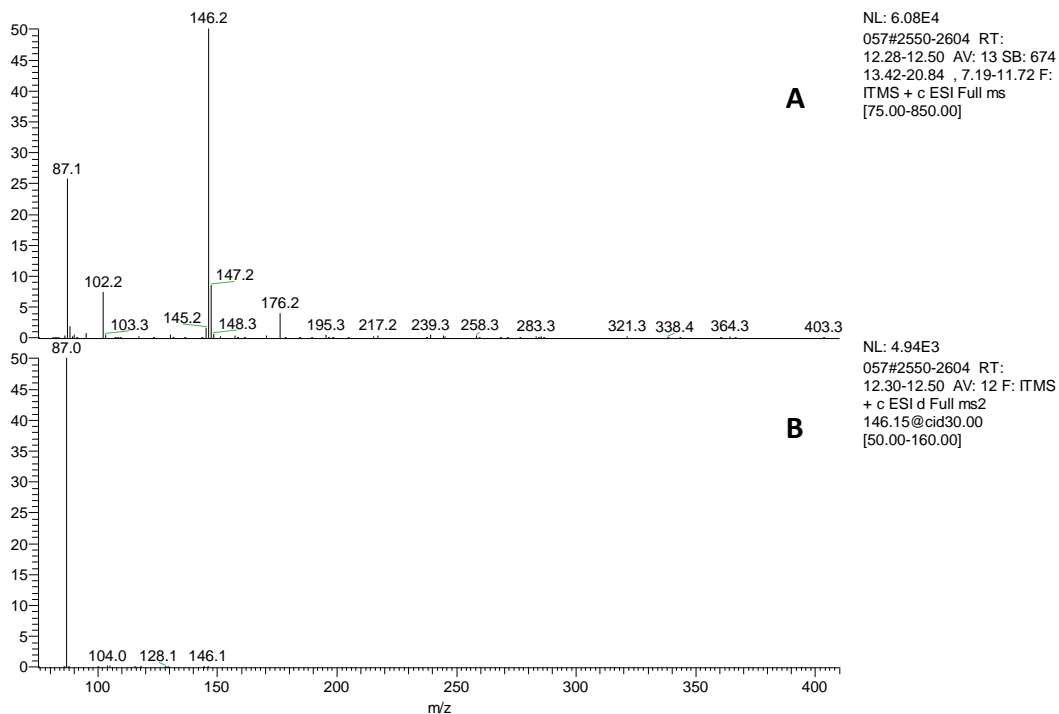
A: Plný sken: ESI+ (75-400 Da); B: MS/MS mode: ESI+ (50-90Da), CID 30

Obrázek č. 27: Chromatogram Acetylcholinu.



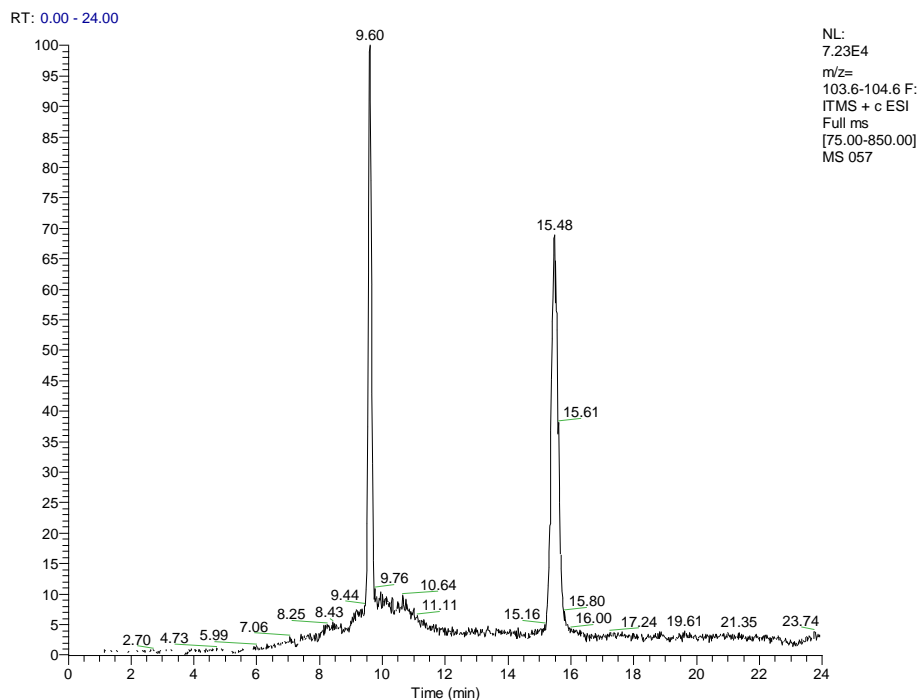
Rekonstruovaný chromatogram (XIC) pro hmotu $146,1 \pm 0,5$ Da.

Obrázek č. 28: Hmotnostní spektra Acetylcholinu.



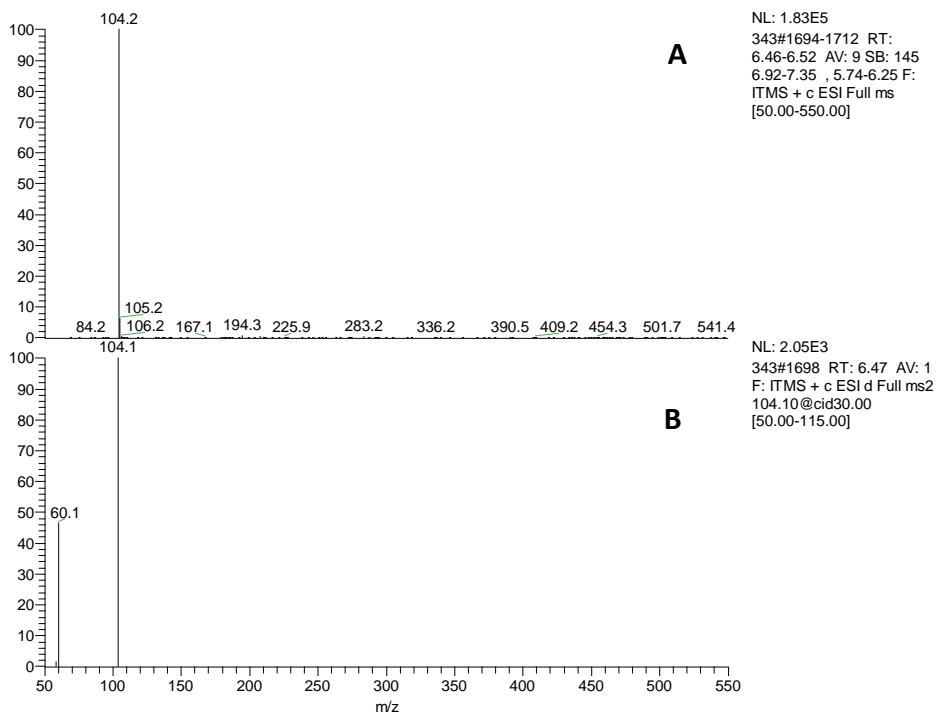
A: Plný sken: ESI+ (75-400 Da); B: MS/MS mode: ESI+ (50-160 Da), CID 30

Obrázek č. 29: Chromatogram Cholinu.



Rekonstruovaný chromatogram (XIC) pro hmotu 104,1±0,5 Da.

Obrázek č. 30 Hmotnostní spektra Cholinu.



A: Plný sken: ESI+ (75-400 Da); B: MS/MS mode: ESI+ (50-115 Da), CID 30

Rekonstruovaný chromatogram (XIC) pro hmotu $104,1 \pm 0,5$ Da obsahuje dva píky, jeden pík v retenčním čase 15,48 min patří námi analyzované látce Cholinu a druhou látkou s retenčním časem 9,60 min je N,N-dimethylglycin. Tyto dvě látky mají stejnou molekulovou hmotnost, a proto zde vidíme dva píky. N,N-dimethylglycin není kvartérní amin, a proto jsem se touto látkou dále nezabývala.

Analýza karnitinových metabolitů v moči

Jedním z cílů této práce byla analýza L-karnitinu a jemu podobných metabolitů v moči u pacientek s rakovinou prsu a tyto data porovnat s naměřenými hodnotami zdravých žen.

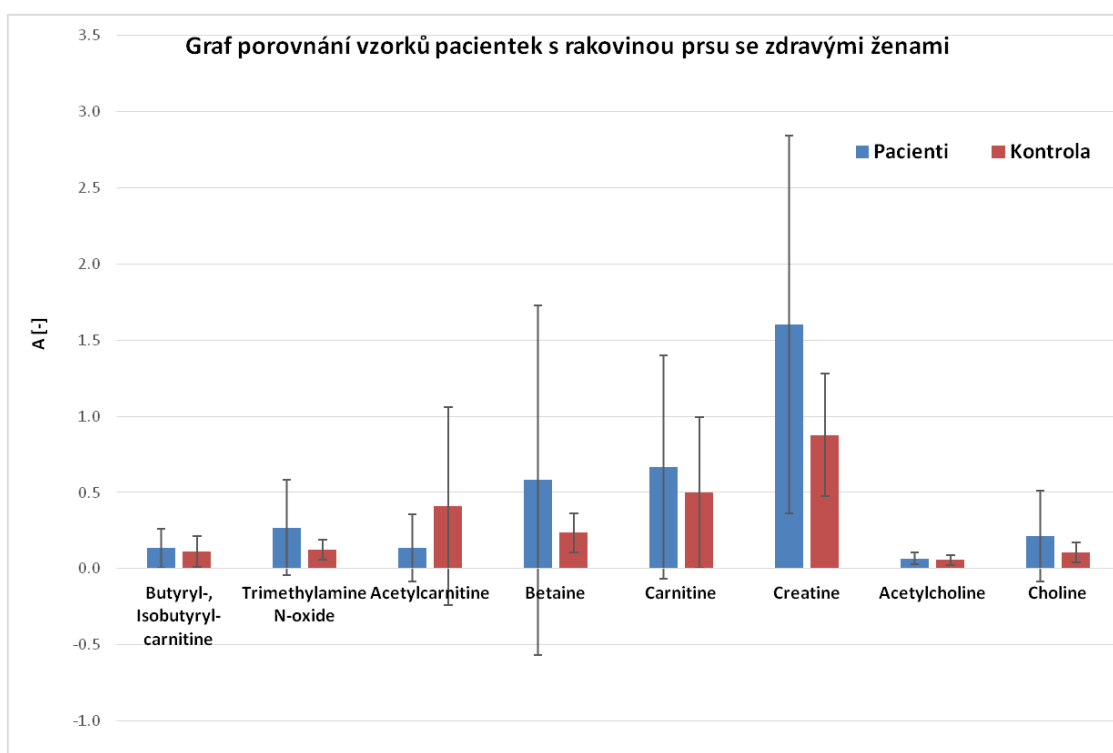
Tabulka č. 9: Hodnoty průměru a směrodatné odchylky vypočtené z detekovaných ploch píků jednotlivých metabolitů vztažených na plochu píku interního standardu (D3-karnitin) a koncentraci kreatininu u pacientek s rakovinou prsu.

Metabolit	Butyryl-L-karnitin a Isobutyryl-L-karnitin	Trimethylamin-N-oxid	Acetyl-L-karnitin	Betain	Karnitin	Kreatin	Acetylcholin	Cholin
Průměr	0,134	0,270	0,137	0,582	0,668	1,604	0,067	0,214
SD	0,128	0,312	0,223	1,148	0,732	1,240	0,039	0,295

Tabulka č. 10: Hodnoty průměru a směrodatné odchylky vypočtené z detekovaných ploch píků jednotlivých metabolitů vztažených na plochu píku interního standardu (D3-karnitin) a koncentraci kreatininu zdravých žen.

Metabolit	Butyryl-L-karnitin a Isobutyryl-L-karnitin	Trimethylamin-N-oxid	Acetyl-L-karnitin	Betain	Karnitin	Kreatin	Acetylcholin	Cholin
Průměr	0,115	0,124	0,413	0,235	0,500	0,876	0,057	0,105
SD	0,101	0,067	0,649	0,129	0,496	0,402	0,034	0,066

Obrázek č. 31: Grafické znázornění hodnot sledovaných analytů u žen s rakovinou prsu v porovnání s hodnotami nalezenými u kontrolní skupiny zdravých žen.



A je poměr plochy píku jednotlivých analytů vztažený na plochu píku interního standardu (D3 karnitin) a koncentraci kreatininu ve vzorku.

Z obrázku č. 31 je patrné, že průměrné hodnoty se u některých sledovaných analytů liší (Betain, Acetylkarnitin atd.), ale v rámci směrodatných odchylek pro jednotlivá měření se tento rozdíl jeví jako naprosto nesignifikantní. Velké směrodatné odchylky byly způsobeny variabilitou jednotlivých vzorků moči, které byly poskytnuty ženami s odlišným věkem, odlišnými stravovací návyky, rozdílnou medikací atd. Protože toto porovnání nebylo primárním cílem mé práce a vyžadovalo by velmi podrobné a časově náročné studium problematiky, které není v rámci bakalářské práce možné realizovat, jsem se dále touto problematikou nezabývala.

Jak už bylo výše zmíněno, v současné době je nejčastěji pro stanovení L-karnitinu a acylkarnitinů v biologickém materiálu využívána metoda kapalinové chromatografie (HPLC) spojená s různými detekčními systémy. Tuto metodu jsem i já ve své práci použila pro stanovení karnitinových metabolitů v moči. Tato metoda může ale probíhat více způsoby a lze ji stále vylepšovat různými volbami separačních kolon či změnou mobilní fáze. Nejvíce používanou stacionární fází v HPLC je reverzní fáze (RP), která je principiálně méně polární než mobilní fáze. Zlepšení podmínek separace a detekce v HPLC můžeme dosáhnout i změnou typu detektoru. Nejpoužívanějšími detektory pro stanovení karnitinových metabolitů je UV detektor, fluorescenční, případně hmotnostní detektor. Kapalinovou chromatografií kombinovanou s hmotnostním spektrometrem (LC/MS) jsem si zvolila pro svou práci stanovení karnitinových metabolitů v moči. Pro mou práci byla použita kolona ZIC-p-HILIC (Merck), podrobný popis mnou využitě metody je v části metodika. Tato metoda umožnila detekci výše uvedených acylkarnitinů v moči pacientek s rakovinou prsu a v moči zdravých žen. Podle prostudované literatury si myslím, že takto nastavená metoda byla vyhovující a umožnila tak odhalit acylkarnitiny v moči u zdravých i nemocných žen s mírnými odchylkami. Velmi podobnou metodu pro separaci a detekci acylkarnitinů popsal Jáuregui et al., 2007. Metodou HILIC separovali acylkarnitiny s dlouhými řetězci v buněčném extraktu za použití kolony Atlantis HILIC Silic metodou ESI/MS (Mansour et al., 2013). Peng et al., 2013 použil HILIC metodu pro separaci karnitinu a acylkarnitinu v plasmě, tato metoda byla vyvinuta pro rychlé skriningové vyšetření

a diagnostiku poruchy β -oxidace mastných kyselin a organické acidemie. Pro detekci byl využit hmotnostní detektor (QTRAP MS/MS).

5 Závěr

První část teoretické části této bakalářské práce shrnuje obecné vlastnosti L-karnitinu a karnitinových metabolitů jako celku, práce se zaměřuje na popis metabolismu, biosyntézy, účinků v organismu a v neposlední řadě také na působení karnitinových metabolitů při různých onemocnění. Druhá část teoretické části je věnována především přehledu kvalitativního a kvantitativního stanovení karnitinových metabolitů, různými analytickými metodami v biologických vzorcích. Cílem práce bylo shromáždit co nejvíce informací o L-karnitinu (acylkarnitinech) a metodách jejich stanovení a otestovat metodu, která bude vyhovující pro stanovení L-karnitinu a jeho metabolitů v moči pacientek s rakovinou prsu a porovnat je s výslednými hodnotami zdravých žen. Problematika stanovování L-karnitinu je ale stále v procesu bádání a zkoumání, jelikož se objevují stále nové analytické metody, kterými lze tuto látku detekovat.

Pro tuto práci byla použita metoda LC-MS s elektrosprejovou ionizací, která se jevila jako nejvíce používaná a dostatečně citlivá pro detekci L-karnitinu. Tato metoda byla i co se týče úpravy vzorku a doby stanovení nenáročná. Pro LC-MS byla použita kolona ZIC-p-HILIC, která umožnila detekovat L-karnitin a acylkarnitiny ve vzorcích moči a to bez předešlé složité úpravy vzorku. Pomocí této metody byl analyzován L-karnitin a acylkarnitiny v moči pacientek s rakovinou prsu. Ženy s diagnostikovanou rakovinou byly různého věku a nebyla u nich určena blíže jejich léčba či další informace o jejich životním stylu. Naměřené výsledky těchto pacientek byly po analýze porovnávány s naměřenými výsledky zdravých žen různého věku.

Z výsledného grafu je možno vidět jen nepatrné rozdíly hodnot mezi vzorky. Hladiny L-karnitinů mohou být ovlivněny i farmaceutickými přípravky, které pacientky používají pro léčbu. Výsledek mohou také zkreslovat látky běžně se v moči vyskytující.

Mnou použitá metoda a uváděné výsledky vyžadují další podrobné zkoumání, které zahrnuje velmi časově náročné kroky (validace metody, naměření většího množství dat,

statistické zpracování atd.), které ovšem není možné obsáhnout v této bakalářské práci a nebylo ani mým cílem. Myslím, že tato problematika je velice perspektivní zejména proto, že jednoduché a rychlé stanovení karnitinových metabolitů v tělních tekutinách se do budoucna dá využít pro diagnózu širokého spektra chorob.

6 Seznam použité literatury

1. Bhala A, Willi S M, Rinaldo P, Bennett M J, Schmidt-Sommerfeld E, Hale D E: Clinical and biochemical characterization of short-chain acyl-coenzyme a dehydrogenase deficiency. *J Pediatr.* 910-915, 1995.
2. Binzak B A, Vockley J G, Jenkins R B, Vockley J: Structure and analysis of the human dimethylglycine dehydrogenase gene. *Mol Genet Metab.* 181-187, 2000.
3. Bouatra S, Aziat F, Mandal R, Guo A C, Wilson M R, Knox C, Bjorndahl T C, Krishnamurthy R, Saleem F, Liu P, Dame Z T, Poelzer J, Huynh J, Yallou F S, Psychogios N, Dong E, Bogumil R, Roehring C, Wishart D S. The human urine metabolome. *PLoS One.* [online].[cit. 2014-05-14], 2013. Dostupné z: <<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0073076>>.
4. Cerretelli P a Marconi C. L-Carnitine supplementation in humans: The effect of physical performance. *Internat. J. Sports Med.* 1-14, 1990.
5. Cibulka R. Metabolické účinky karnitinu a jeho význam v medicíně. *Vnitřní lékařství.* 1068-1069, 2005.
6. Cibulka R. Metabolické účinky karnitinu a jeho význam v medicíně. *Klin. Biochem. Metab.* 24-28, 2005.
7. Flanagan J L, Simmons P A, Vehige J, Willcox M, Garrett Q. Role of carnitine in disease. *Nutrition and Metabolism.* 1-14, 2010.
8. Chung Y L, Rider L G, Bell J D, Summers R M, Zemel L S, Rennebohm R M, Passo M H, Hicks J, Miller F W, Scott D L: Muscle metabolites, detected in urine by proton spectroscopy, correlate with disease damage in juvenile idiopathic inflammatory myopathies. *Arthritis Rheum.* 565-570, 2005.
9. Jia J P, Jia J M, Zhou W D, Xu M, Chu C B, Yan X, Sun Y X: Differential acetylcholine and choline concentrations in the cerebrospinal fluid of patients

- with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Chin Med J (Engl)*. 1161-1164, 2004.
10. Kamimori H, Hamashima Y, Konishi M: Determination of carnitine and saturated-acyl group carnitines in human urine by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Biochem*. 417-424, 1994.
 11. LEIBOVITZ, Brian E. *L-carnitine: the energy nutrient*. Los Angeles, CA: Keats Pub, 1998. ISBN 978-087-9839-628.
 12. Lever M, Slow S: The clinical significance of betaine, an osmolyte with a key role in methyl group metabolism. *Clin Biochem*. 732-744, 2010.
 13. Mansour R F, Wei W, Danielson D D. Separation of carnitine and acylcarnitines in biological samples: a review. *Biomed.Chromatogr*. 1339-1353, 2013.
 14. Mitchell E. PhD. Carnitine metabolism in human subjects I. Normal metabolism. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 293-306, 1978.
 15. Möder M, Kiessling A, Löster H. Current Methods for Determination of L-Carnitine and Acylcarnitines. *Monatshefte für Chemie*. 1279-1291, 2005.
 16. Mueller P, Schulze A, Schindler I, Ethofer T, Buehrdel P, Ceglarek U. Validation of an ESI-MS/MS screening method for acylcarnitine profiling in urine specimens of neonates, children, adolescents and adults. *Clin Chim Acta*. 47-57, 2003.
 17. NOVÁKOVÁ, Lucie. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 2013, 299 s. ISBN 978-80-260-4243-3.
 18. Penga M, Liua L, Jianga M, Lianga C, Zhaoa X, Caia Y, Shenga H, Oua Z, Luob H. Measurement of free carnitine and acylcarnitines in plasma by HILIC-ESI-MS/MS without derivatization. *Journal of Chromatography B*. 12-18, 2013.
 19. Podadera P, Sipahi A M, Areas J A, Lanfer-Marquez UM: Diagnosis of suspected trimethylaminuria by NMR spectroscopy. *Clin Chim Acta*. 149-154, 2005.

20. Rule A D, Larson T S, Bergstralh E J, Slezak J M, Jacobsen S J, Cosio F G. Using serum creatinine to estimate glomerular filtration rate: accuracy in good health and in chronic kidney disease. *Ann Intern Med.* 929-37, 2004.
21. Shirahata M, Balbir A, Otsubo T, Fitzgerald RS: Role of acetylcholine in neurotransmission of the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol.* 93-105, 2007.
22. Steiber A, Janos K, Hoppel Ch, Carnitine: a nutritional, biosynthetic, and functional perspective. *Molecular Aspects of Medicine.* 455-473, 2004.
23. Steidl L, Vizinová H. Úloha karnitinu v lékařství a vlastní zkušenosti. *Praktický lékař.* 125-128, 2003.
24. Steidl L., Zbránek M., Dostál A. Karnitin. *Praktický lékař.* 534-537, 1995.
25. STEIDL, Ladislav a Barbora ZBRÁNKOVÁ. *Význam karnitinu a jeho použití v medicíně.* Vyd. 1. V Praze: Triton, 2000, 135 s.
26. Stribis K, Vaz F, Distel B. Ezymology of the carnitine Biosynthesis Pathway. *IUBMB Life.* 357-362, 2010.
27. THE METABOLOMICS INNOVATION CENTRE. *Human Metabolome Database*[online]. [cit. 2014-04-30]. Dostupné z: <<http://www.hmdb.ca/metabolites/>>.
28. THERMO FISHER SCIENTIFIC. *Thermo Scientific*[online]. [cit. 2014-07-15]. Dostupné z: <<http://www.thermoscientific.fr/com/cda/landingpage/1,,6848,00.html>>.
29. Vaz F, Melegh B, Bene J, Cuebas D, Gage D A, Bootsma A, Vreken P, Gennip A H, Bieber L L, Wanders R J A. Analysis of carnitine biosynthesis metabolites in urine by HPLC–Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry.* 826-834, 2002.
30. Vaz F, Wanders R J A. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochemical Society.* 417-429, 2002.
31. Walter J H. L-Carnitine. *Archives of disease in childhood.* 457-478, 1996

32. Yoshizumi W M, Tsourounis C: Effects of creatine supplementation on renal function. *J Herb Pharmacother.* 1-7, 2004.
33. Young S P, Matern D, Gregersen N, Stevens R D, Bali D, Liu H M, Koeberl D D, Millington D S. A comparison of in vitro acylcarnitine profiling methods for the diagnosis of classical and variant short chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Clin Chim Acta.* 103-113, 2003.
34. Zanelli S A, Solenski N J, Rosenthal R E, Fiskum G: Mechanisms of ischemic neuroprotection by acetyl-L-carnitine. *Ann N Y Acad Sci.* 153-161, 2005.

7 Přílohy

Obrázek č. 32: Použitý chromatografický systém použito z:
<<http://www.thermoscientific.fr/com/cda/landingpage/1684800.html>>.

