



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

Moč, její složení a vliv věku na její metabolický obraz

Bakalářská práce

Autor práce: Roman Menhart

Studijní program: Specializace ve zdravotnictví

Studijní obor: Zdravotní laborant

Vedoucí práce: RNDr. Petr Šimek, CSc.

Datum odevzdání práce: 5. 5. 2015

Abstrakt

Tato práce je zaměřená na sledování vlivu věku na složení moči. Korelace věku se složením moči byla zkoumána cíleným výzkumem čtyř vybraných analytů - kreatininu, acetylkarnitinu, karnitinu a alaninu u anonymizované skupiny lidí ve věku 15, 25, 35, 45 a 55 let.

V teoretické části je obecně popsána anatomie a funkce ledvin, je zde definováno co je to moč, jaké organické a anorganické látky obsahuje. Popsány jsou faktory, které se podílejí na změnách složení moči, jako je index tělesné hmotnosti, barva pleti a především věk, který je hlavním předmětem zkoumání této práce. Dále jsou uvedeny metody používané v klinické praxi, ale i ve výzkumu, sloužící k analýze moči.

Metodická část zahrnuje postupy odběru, uchování a předanalytické přípravy moči. Je zde uveden seznam všech chemikálií, pomůcek, vnitřních standardů, standardů a přístrojového vybavení, použitých pro přípravu a analýzu vzorků, a také popis HPLC/MS metody.

Výstupní data z použité LC/MS metody byla zpracována v počítačovém programu XcaliburTM. Jedná se o chromatogramy a hmotnostní spektra kreatininu, acetylkarnitinu, karnitinu a alaninu získaných analýzou padesáti vzorků močí lidí různých věkových skupin, které proběhly ve třech opakováních. Pomocí tabulek a přehledných grafů byly zpracovány hodnoty ploch píků pro jednotlivé látky, které následně byly přepočítané na plochu píku kreatininu z důvodu jejich normalizace.

Řešené téma je velice komplexní a nelze ho celé obsáhnout v rámci mé bakalářské práce.

Klíčová slova:

moč, věk, LC/MS, HILIC

Abstract

This work is aimed at monitoring the impact of age on the composition of urine. The correlation of age with the composition of urine was examined by focused research four selected analytes - creatinine, acetylcarnitine, carnitine and alanine in anonymous groups of people aged 15, 25, 35, 45 and 55 years.

In the theoretical part the anatomy and function of the kidneys are generally described. The definition of urine and organic and inorganic substances contained in it are defined. Described are factors that contribute to changes in urine composition such as body mass index, skin color and especially age, which is the main subject of this research. The methods used for analyzing urine in clinical practice but also in research are also stated.

Procedures for collection, preservation and preanalytical preparation of urine are included in methodological section. The list of all chemicals, equipment, internal standards, standards, instrumentation used for the preparation and analysis of samples and HPLC/MS methodology are described.

The output data from LC/MS method used were processed in a computer program XcaliburTM. There are the chromatograms and mass spectra of creatinine, acetylcarnitine, carnitine and alanine obtained by analyzing the 50 urine samples (in triplicate) of people of different ages. By using the clear graphs and tables peak areas for the individual substances were standardized by creatinine amount.

Studied urine issues are very complex and can not be encompassed completely in the context of my thesis.

Keywords:

urine, age, LC/MS, HILIC

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala 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. 2015

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Rád bych touto cestou poděkoval RNDr. Petrovi Šimkovi CSc., Ing. Martinovi Moosovi Ph.D. a Ing. Pavle Kružberské za ochotu, vstřícnost a cenné rady při vypracování mé bakalářské práce. Všem výše zmíněným pak děkuji za přátelskou atmosféru, kterou se jim podařilo v laboratoři vytvořit.

Obsah

1	Teoretická část	10
1.1	Anatomie a fyziologie ledviny	10
1.1.1	Anatomie ledviny	10
1.1.2	Fyziologie ledviny	10
1.2	Moč	11
1.2.1	Primární moč	11
1.2.2	Definitivní moč	11
1.3	Chemické složení moči	12
1.3.1	Historie	12
1.3.2	Anorganické a organické složení moči	15
1.4	Faktory vyvolávající změny složení moči	16
1.4.1	Věk	16
1.4.2	BMI index	16
1.4.3	Barva pleti	17
1.5	Metody analýzy moči	18
1.5.1	Kapalinová chromatografie	19
1.5.2	Chromatografie hydrofilních interakcí	19
1.5.3	Hmotnostní spektrometrie	20
1.5.3.1	Elektrosprejová ionizace	21
2	Cíle práce a hypotéza	22
2.1	Cíle práce	22
2.2	Hypotéza	22
3	Metodika	23
3.1	Sběr materiálu	23
3.2	Příprava vzorků před analýzou	24

3.3	Příprava mobilní fáze.....	24
3.4	Pomůcky a reagensie	24
3.4.1	Chemikálie	25
3.4.2	Vnitřní standardy	25
3.4.3	Standardy	25
3.4.4	Pomůcky a přístrojové vybavení.....	25
3.5	Analýza vzorků moči	27
3.5.1	Metoda LC/MS	27
4	Výsledky	28
4.1	Hmotnostní spektra	29
4.2	Chromatogramy	32
4.2.1	První série měření	33
4.3	Celkové semikvitatativní zhodnocení naměřených dat	39
5	Diskuze	45
6	Závěr	46
7	Seznam použité literatury	47
8	Přílohy.....	50

Seznam použitých zkratk

ACN	acetonitril
NASA	Národní úřad pro letectví a kosmonautiku
BMI	index tělesné hmotnosti
GC	plynová chromatografie
LC	kapalinová chromatografie
MS	hmotnostní spektrometrie
ESI	elektrosprejová ionizace
HILIC	chromatografie hydrofilních interakcí
Q	kvadrupól
IT	iontová past
TOF	průletový analyzátor
LIT	lineární iontová past
FT-ICR	cyklotronová iontová resonance s Fourierovou transformací
HDC	vysokoenergetická fragmentační cela
RPM	otáčky za minutu
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie

Úvod

Tématem mé bakalářské práce je složení moči v korelaci s věkem. Toto téma je velmi zajímavé, protože složení moči je jedním z nejjednodušších, nejběžnějších ukazatelů stavu metabolismu a vnitřního prostředí. Její odběr je snadný a patří mezi nejméně invazivní způsoby odběru tělních tekutin v laboratorní diagnostice.

Ve své práci jsem si vytyčil tři hlavní cíle. Prvním je v teoretické části zpracovat literární rešerší všechny dostupné informace o vylučovacích orgánech, vylučování, složení moči a faktorech významně ovlivňujících její složení. Dalším cílem je osvojení si jedné z metod používaných k analýze metabolitů moči. Použil jsem metodu kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (LC/MS). Jako třetí cíl jsem si stanovil zhodnocení změn složení moči v průběhu života. Tyto změny jsem zkoumal na čtyřech vybraných analytech - na kreatininu, karnitinu, acetylkarnitinu a alaninu. Odběry vzorků moči proběhly u pěti kontrolních věkových skupin (15, 25, 35, 45 a 55 let) u anonymizovaných dobrovolných dárců. Poznatky mnou zjištěné jsou diskutovány s informacemi zjištěnými v odborné literatuře.

1 Teoretická část

1.1 Anatomie a fyziologie ledviny

1.1.1 Anatomie ledviny

Ledvina je párový, retroperitoneálně uložený vylučovací orgán s průměrnými rozměry 12x6x4 cm. Na povrchu má vazivové pouzdro, které bývá obaleno vrstvou tuku s ochrannou funkcí. Pod pouzdem je pět až sedm milimetrů silná vrstva ledvinové kůry. Následuje dřev ledviny, tvořená přibližně dvaceti pyramidovými útvary, jejichž vrcholy ční do ledvinné pánvičky. Základní stavební jednotkou ledviny je nefron. Skládá se z glomerulu (klubíčko vlásečnic, kapilár) a tubulárního systému, který vyúsťuje do vrcholu pyramidy¹.

1.1.2 Fyziologie ledviny

Ledviny jsou funkčně poměrně heterogenní orgán. Do moči se ledvinami vylučují látky, kterých je v těle nadbytek. Jedná se zejména o vodu a ionty. Dále se vylučují zplodiny metabolismu – jako je kyselina močová, močovina a kreatinin. V některých případech lze v moči nalézt látky, které se za normálních okolností nevyskytují². Jedná se například o bílkovinu (proteinurie), jejíž nález v moči může mít různé příčiny od pouhé zvýšené zátěže organismu až povážné poškození funkce ledvin. Dále může být v moči přítomna glukóza. Tento stav se nazývá glykosurie a nastává, pokud glykémie má hodnotu vyšší než 8,88 mmol·l⁻¹ ³. Tento stav se dá využít při odhalení diabetes mellitus.

Ledviny mají i endokrinní funkci. Ta spočívá v tvorbě reninu a erythropoetinu. Renin je hormon, produkováný jako odpověď na snížené prokrvení ledviny, nebo na sníženou koncentraci sodíku a chloridů. Tento hormon je součástí systému renin - angiotenzin - aldosteron, udržujícího složení krevní plazmy a regulující krevní tlak².

Významnou roli hrají ledviny v udržování acidobazické rovnováhy. Zvýšeným vylučováním vodíkových nebo bikarbonátových iontů udržují pH krve ve fyziologickém rozmezí $7,40 \pm 0,04^3$. Ledviny mitochondriálním enzymem 25-hydroxyvitamin-D3-1-hydroxylasou hydroxylují 25-hydroxycholecalciferol v pozici 1 na biologicky aktivní formu⁴.

1.2 Moč

Moč je tělní odpadní tekutina, vznikající v ledvinách a dostupná často bez nutnosti invazivního zásahu při odběru. Jedná se o zahuštěný ultrafiltrát krevní plazmy³. Její analýzou získáváme cenné informace o stavu organismu a jeho metabolismu.

1.2.1 Primární moč

Primární moč vzniká ultrafiltrací krevní plazmy přes bazální membránu glomerulu. Denně jí vzniká asi 180 litrů. Má velice podobné složení jako krevní plazma, neobsahuje téměř žádné proteiny, jelikož ty při filtraci neprojdou přes membránu⁵. Primární moč putuje po průchodu glomerulem do systému tubulů. Zde dochází k resorpci anorganických iontů a vody. Za zpětné vstřebávání vody a regulaci vodního a iontového hospodářství organismu je zodpovědný hormon adiuretin³.

1.2.2 Definitivní moč

O definitivní moči lze mluvit ve chvíli, kdy primární moč projde glomerulem a tubulárním systémem do ledvinné pánvičky, kde je shromažďována. Následně je levým a pravým močovodem transportována do močového měchýře. Její množství je okolo $500 \text{ ml} \cdot \text{den}^{-1}$. Za fyziologického stavu by měla obsahovat látky již pro organismus nevyužitelné (zplodiny, zbytky metabolismu), tzn. látky, které jsou svou koncentrací v těle nadbytečné, dále nosiče vylučovaných látek a látky tělu cizorodé (léky, drogy, atd.)².

1.3 Chemické složení moči

1.3.1 Historie

Vyšetření moči patří historicky k nejstarším vyšetřením, bylo prováděno již za Hippokrata, tj. v 5. století před naším letopočtem a patří doposud k nejstarším laboratorním vyšetřením v lékařství vůbec³. Na sladkou chuť moči diabetiků upozornil už v roce 1674 Angličan Thomas Willis, sto let nato jeho krajan Matthew Dobson dokázal, že sladká chuť moči je způsobena cukrem⁶. S rozvojem vědy a novými možnostmi zmapoval národní úřad pro letectví a kosmonautiku (NASA) v roce 1971 velice podrobně složení moči. Důvodem byla potřeba zjistit, k jakým změnám metabolismu dochází během vesmírných letů a po návratu z nich. V literárním zdroji i tabulce č. 1 jsou uvedeny pouze analyty, jejichž maximální koncentrace v moči byla vyšší než 10 mg·l⁻¹ ⁷.

Tabulka č. 1: Chemické složení moči (NASA červenec 1971)⁷

Látka	Vzorec	Molekulová hmotnost (Da)	Rozptyl mg·l ⁻¹
Močovina	CH ₄ N ₂ O	60,1	9300 - 23300
Chloridy	Cl ⁻	35,5	1870 - 8400
Sodík	Na ⁺	23,0	1170 - 4390
Draslík	K ⁺	39,1	750 - 2610
Kreatinin	C ₄ H ₇ N ₃ O	113,1	670 - 2150
Kyselina hippurová	C ₉ H ₉ NO ₃	179,2	50 - 1670
Celkový fosfor	P	31,0	470 - 1070
Kyselina citrónová	C ₆ H ₈ O ₇	192,1	90 - 930
Kyselina glukuronová	C ₆ H ₁₀ O ₇	194,1	70 - 880
Amoniak	NH ₃	17,0	200 - 730
Kyselina močová	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	168,1	40 - 670
Uropepsin	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181,2	70 - 560

Látka	Vzorec	Molekulová hmotnost (Da)	Rozptyl mg·l ⁻¹
Hydrogenuhlíčitany	HCO ³⁻	61,0	20 - 560
Kreatin	C ₄ H ₉ N ₃ O ₂ * H ₂ O	149,2	0 - 530
Organická síra	S	32,1	77 - 470
Glycin	C ₂ H ₅ NO ₂	75,1	90 - 450
Fenoly	C ₆ H ₅ *OH	94,1	130 - 420
Kyselina mléčná	C ₃ H ₆ O ₃	90,1	30 - 400
Vápník	Ca ²⁺	40,1	30 - 390
Histidin	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂	155,2	40 - 330
Kyselina glutamová	C ₅ H ₉ NO ₄	147,1	7 - 320
Androsteron	C ₁₉ H ₃₀ O ₂	290,5	2 - 280
1-Methylhistidin	C ₇ H ₁₁ N ₃ O ₂	169,2	30 - 260
Hořčík	Mg	24,3	20 - 205
Deriváty imidazolu	C ₃ H ₄ N ₂	68,1	90 - 200
Glukosa	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,1	30 - 200
Taurin	C ₂ H ₇ NO ₃ S	125,2	5 - 200
Kyselina asparagová	C ₄ H ₇ NO ₄	133,1	7 - 170
Uhličitany	CO ₃ ²⁻	60,0	100 - 150
Cystein	C ₃ H ₆ NO ₂ S	240,3	7 - 130
Citrulin	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	175,2	0 - 130
Threonin	C ₄ H ₉ NO ₃	119,1	10 - 120
Lysin	C ₆ H ₁₄ N ₂ O ₂	146,2	5 - 110
Kyselina indoxylsírová	C ₈ H ₉ NO ₅ S	231,2	3 - 110
Kyselina m-hydroxyhippurová	C ₉ H ₉ NO ₄	195,2	1 - 100
Kyselina p-hydroxyfenyl-hydrokrylová	C ₉ H ₁₀ O ₄	182,2	1 - 100
Kyselina aminisomáselná	C ₄ H ₉ NO ₂	103,1	3 - 120

Látka	Vzorec	Molekulová hmotnost (Da)	Rozptyl mg·l ⁻¹
Urobilin	C ₃₃ H ₄₀ N ₄ O ₆	588,7	7 - 9
Tyrosin	C ₃ H ₄ O ₃	181,2	10 - 70
Kyselina pyrohroznová	C ₃ H ₄ O ₃	88,1	7 - 70
Albumin		66437,0 - 66600,0	2 - 70
Asparagin	C ₄ H ₈ N ₂ O ₃	132,1	20 - 70
Tryptofan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	286,8	5 - 60
Aceton	C ₃ H ₆ O	58,1	10 - 50
Serin	C ₃ H ₇ NO ₃	105,1	20 - 50
Alanin	C ₃ H ₇ NO ₂	89,1	15 - 50
Purinové báze	C ₅ H ₄ N ₄	120,1	0 - 50
Arginin	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	174,2	7 - 40
Kyselina askorbová	C ₆ H ₈ O ₆	176,1	3 - 40
Kyselina šťavelová	C ₂ H ₂ O ₄	90,0	1 - 30
Bilirubin	C ₃₃ H ₃₆ N ₄ O ₆	584,7	3 - 30
Valin	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117,2	7 - 30
Fenylalanin	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165,2	6 - 30
Allantoin	C ₄ H ₆ N ₄ O ₃	158,1	2 - 25
Kyselina oxoglutarová	C ₅ H ₆ O ₅	146,1	13 - 25
Leucin	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,2	8 - 25
Kyselina guanidinoctová	C ₃ H ₇ N ₃ O ₂	117,1	9 - 25
Isoleucin	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131,2	4 - 22
Urobilinogen	C ₃₃ H ₄₂ N ₄ O ₆	590,7	0 - 17
Ethanolamin	C ₂ H ₇ NO	61,1	3 - 15
Guanidin	CH ₅ N ₃	59,1	7 - 13
Methionin sulfoxid	C ₅ H ₁₁ NO ₃ S	165,2	0 - 13
Kyselina anhydroaskorbová	C ₆ H ₆ O ₆	174,1	3 - 13

Látka	Vzorec	Molekulová hmotnost (Da)	Rozptyl mg·l ⁻¹
Inositol	C ₆ H ₁₂ O ₆	180,2	5 - 100
Kyselina mravenčí	CH ₂ O ₂	46,0	20 - 90

1.3.2 Anorganické a organické složení moči

Nejvíce zastoupené anorganické látky v definitivní moči jsou především soli ve formě svých iontů. Nejvýznamnější procentuální zastoupení mají vápenaté, sodné a draselné kationty, z aniontů jsou to chloridové, hydrogenuhličitanové a uhličitanové. Velký podíl mají také anorganická síra a fosfor^{7,8}.

Co se týče organických komponent moči, je jich možné naleznout nepřehledné množství. Nejvíce je zastoupena močovina, až padesát procent. Ta vzniká z amoniaku, který je produktem deaminace aminokyselin. Kreatinin vzniká odštěpením fosfátu z kreatinfosfátu, který je ve svalích jako zdroj energie pro svalovou kontrakci. Jeho tvorba je obrazem velikosti svalové hmoty. Karnitin je látka podílející se na transportu mastných kyselin s dlouhými řetězci (C₁₂ - C₁₈) do mitochondrií⁹. Při zvýšené zátěži je karnitin za přítomnosti acetyl-CoA přeměněn na acetylkarnitin s cílem snazšího využití mastných kyselin jako zdroje energie¹⁰. Moč dále obsahuje rozmanité množství organických kyselin – zejména kyselinu askorbovou, šťavelovou, pyrohroznovou, citrónovou, která je součástí metabolicky významného Krebsova cyklu a kyselinu mléčnou, tvořenou při anaerobním metabolismu. Do moči se také vylučují aminokyseliny viz. tabulka č. 1. Z enzymů je významným analytem především amyláza, její zvýšené hodnoty poukazují na poškození pankreatu. Stanovuje se její aktivita v moči (referenční rozptyl amylázy je 1,70 – 33,0 μkat·l⁻¹). Některé hormony se do moči vylučují přímo, jako estrogeny a progesteron. V případě hormonů adrenalinu a noradrenalinu se do moči vylučuje jejich metabolit, kyselina vanilmandlová^{3,7}.

1.4 Faktory vyvolávající změny složení moči

1.4.1 Věk

V doposud provedených studiích byl zjištěn vlivem stárnutí pokles pH moči, obsahu vápníku, amoniaku, kreatininu, karnitinu, acetylkarnitinu, alaninu, kyseliny mléčné, fosforečnanu vápenatého, přesycení (super saturace) šťavelanu vápenatého (CaOx). S věkem se dále zvyšuje množství citrátu a hodnota přesycení kyseliny močové. Koncentrace zinku v moči se vlivem věku významně nemění, lze však pozorovat nepatrný nárůst v dětství a po 50. roce života. Měď dosahuje nejvyšších hodnot v dětském věku, okolo 20. roku života poklesne na hladinu, kterou si udržuje až do stáří. Koncentrace železa nijak významně nekoreluje s věkem. Nutno zmínit, že při hodnotách pH moči vyšších než 7 značně klesá koncentrace zinku. Na hladiny železa a zinku má hodnota pH zanedbatelný vliv^{11,12,13}.

1.4.2 BMI index

Vyšší hodnoty body mass indexu (BMI) jsou rizikovým faktorem pro vznik ledvinových kamenů. Bylo zjištěno, že lidé s vyššími hodnotami BMI vylučují do moči více šťavelanu, kyseliny močové, sodíku a fosfátu než dobrovolníci s nižší hodnotou BMI. Při porovnání močí mužů s normálním BMI a mužů obézních lze zjistit, že obézní mladí muži vykazovali vyšší hodnoty triglyceridů, celkový cholesterol a nižší testosteron, než muži normálních hmotností^{14,15,16}.

Tabulka č. 2: Údaje a množství analytů u mužů s různým indexem tělesné hmotnosti¹⁶

Parametr	S normální váhou	Obézní	Jednotky
Věk	21,4 ± 2,0	20,8 ± 1,8	rok
Výška	173,5 ± 6,0	177,7 ± 5,3	cm
Váha	62,2 ± 6,8	101,1 ± 12,1	kg
BMI	20,6 ± 1,5	32,0 ± 3,8	kg.m ⁻¹
Množství tuku	10,6 ± 3,1	30,9 ± 5,4	kg
Triglyceridy	0,9 ± 0,3	2,2 ± 0,7	mmol.l ⁻¹
Celkový cholesterol	3,6 ± 0,5	4,6 ± 0,9	mmol.l ⁻¹
Inzulín	5,4 ± 1,9	13,8 ± 5,5	mU.l ⁻¹
Testosteron	22,6 ± 5,0	18,9 ± 6,7	mml.l ⁻¹

1.4.3 Barva pleti

Při analýze moči žen s černou a bílou barvou pleti, kdy věk (průměrně 65,8 -67,9 let) a BMI (průměrně 26,1- 29,3) měly téměř podobný, se zjistilo, že jsou zde nuance v koncentraci některých močí vylučovaných analytů. Ženy s tmavou pletí denně vylučují méně vápníku, draslíku, fosfátu. Exkrece š'avelanu, kreatininu a hodnota pH moči je ale vyšší, nežli je tomu tak u žen s bílou barvou pleti¹⁷.

Tabulka č. 3: Množství látek v moči žen s tmavou a bílou barvou pleti¹⁷

Ženy		
Parametr	S bílou barvou pleti	S tmavou barvou pletí
kreatinin (mg)	1036,0	1225,0
vápník (mg)	183,0	118,0
oxalát (mg)	28,0	30,0
citrát (mg)	686,0	653,0
kyselina močová (mg)	448,0	450,0
sodík (mEq)	137,0	142,0
draslík (mEq)	64,0	55,0
hořčík (mg)	104,0	93,0
fosfát (mg)	743,0	623,0
sulfát mmol)	17,0	14,0
pH	6,1	6,2

1.5 Metody analýzy moči

V klinické praxi se používají metody snadné, rychlé a levné. Jedná se například o spektrofotometrické stanovení. Tímto způsobem se dá cíleně měřit pouze omezené množství látek. Složitějšími metodami, které je možno použít, jsou metody chromatografické - plynová (GC), kapalinová chromatografie (HPLC). Popřípadě tyto metody v kombinaci s hmotnostní detekcí (GC/MS, LC/MS), kdy se dostává elementární informace o monoisotopické molární hmotnosti a lze takto určit velké množství látek.

1.5.1 Kapalinová chromatografie (HPLC)

Kapalinová chromatografie je separační metoda, která funguje na principu rozdělení složek směsi mezi proudící mobilní fází a stacionární fází¹⁸. Separace probíhá v chromatografické koloně na základě různorodé retence jednotlivých analytů ke stacionární fázi.

1.5.2 Chromatografie hydrofilních interakcí (HILIC)

Mechanismus zodpovědný za HILIC separaci není stále plně objasněn. Mezi navrhovanými principy figuruje mechanismus rozdělování mezi hydrofobní částí mobilní fáze a silně hydrofobní vrstvou vody, která je imobilizována na povrchu polární stacionární fáze. Dále je předpokládán velký vliv vodíkových vazeb a iontových interakcí, mechanismus HILIC separace je tedy považován za komplexní¹⁹. Při HILIC separaci se jako stacionární fáze využívá například silikagel nebo stacionární fáze obsahující hydroxyethylovou, aminovou skupinu či zwitterion. Stacionární fáze využívané pro HILIC můžeme rozdělit do tří základních skupin. Neutrální – bez elektrostatických interakcí, nabité – silné elektrostatické interakce a Zwitterionty – slabé elektrostatické interakce¹⁹. Technika chromatografie hydrofilních interakcí našla nejprve uplatnění při separacích sacharidů, aminokyselin a peptidů²⁰. V posledních letech ale rychle roste počet nově vyvinutých kolon pro HILIC a aplikací pro separace v oblasti analýz životního prostředí, potravin, přírodních látek, syntetických léčiv i iontových a neiontových tenzidů. Jednou z významných výhod HILIC separací je zvýšená citlivost LC/MS analýz díky zlepšené ionizaci elektrosprejem (ESI) v mobilních fázích s vysokým obsahem acetonitrilu^{21,22}.

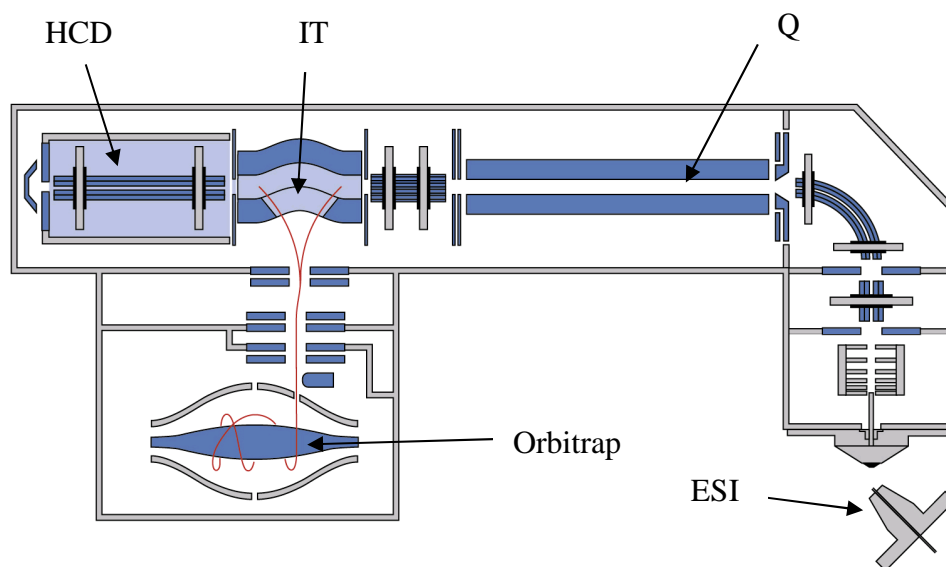
1.5.3 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie je separační technika, která převádí vzorek na ionizovanou plynnou fázi a vzniklé ionty separuje podle podílu jejich hmotnosti (m) a náboje (z) m/z . Používá se pro detekci molekul v závislosti na jejich hmotnosti, z toho dále pramenící možnosti určení elementárního složení neznámých látek, či pro objasnění chemické struktury molekul na základě MS/MS experimentů. Vzorek je při analýze pomocí hmotnostní spektrometrie odpařen a ionizován, následně jsou ionty vedeny a akcelerovány do hmotnostního analyzátoru (filtru), kde dochází k jejich separaci na základě poměru m/z a následné detekci iontů. Kombinací dvou či více hmotnostních analyzátorů vznikají tzv. tandemové hmotnostní spektrometry (MS/MS). Principem těchto přístrojů je pomocí prvního hmotnostního analyzátoru vyseparovat požadované ionty, následně je podrobit vysokoenergetické kolizi s neutrálním plynem a pomocí dalšího hmotnostního analyzátoru vniklé ionty analyzovat. Na základě přesnosti měřené hmotnosti se hmotnostní spektrometry dělí na dvě skupiny: nízko a vysokorozlišovací instrumenty^{22,23}.

V dnešní době existuje velké množství různých hmotnostních spektrometrů od různých firem kombinujících různé hmotností analyzátorů - kvadrupól (Q), iontová past (IT), průletový analyzátor (TOF) a speciální typy iontových pastí jako je lineární iontová past (LIT), Orbitrap či iontová cyklotronová resonance s Fourierovou transformací (FT-ICR) a proto podrobněji popíší pouze mnou využívaný hmotnostní spektrometr Orbitrap Q Exactive plus. Ionty ze zdroje (ESI) jsou podtlakem nasávány k iontové optice se systémem čoček. V další části MS je usměrněna dráha letu nabitých částic o 90 stupňů, čímž dochází k selekci fotonů a nenabitých částic, které proletí rovně. Kvadrupol sloužící jako první hmotnostní analyzátor (filtr) umožňuje díky unikátnímu použití kvadrupolových tyčí s hyperbolickým průřezem zvýšit selektivitu s minimální ztrátou citlivosti. V části nazývané c-trap (iontová past), dochází ke kumulaci iontů do malého prostoru. Odtud jsou následně podle typu skenu vystřeleny buď do vysokoenergetické fragmentační cely (HCD) nebo do vysokorozlišovacího hmotnostního analyzátoru (Orbitrap) k detekci. Ve všech částech MS je přítomno

vakuu, vyjma ESI, která probíhá za atmosférického tlaku. Vakuum se kaskádovitě snižuje ve směru letu iontů^{23,24,25}.

Obrázek č. 1: Schéma hmotnostní analyzátoru Orbitrap



1.5.3.1 Elektrosprejová ionizace (ESI)

Při ionizaci elektrosprejem prochází eluát po výstupu z chromatografické kolony kapilárou, na jejíž konec je vloženo vysoké napětí (3-6 kV), takže malé kapičky vznikající na výstupu z kapiláry nesou vlivem vysokého gradientu elektrického pole kladný nebo záporný náboj podle polaritě vloženého napětí na kapiláru. Dalším odpařováním rozpouštědla dochází ke zmenšení velikosti kapiček a tím i ke zvýšení hustoty povrchového náboje, až dojde ke coulombické explozi (rozpadu na menší kapičky s povrchovým nábojem) až nakonec v pozitivním módu dojde ke vzniku protonovaného molekulárního iontu, nebo aduktu molekuly nejčastěji se sodným, draselným nebo amonným iontem. V případě negativní ionizace ke vzniku deprotonovaného molekulového iontu. Takto vzniklé ionty jsou vakuem nasávány do MS¹⁸.

2 Cíle práce a hypotéza

2.1 Cíle práce

Literární rešerší zjistit poznatky o anorganickém a organickém složení moči. Porovnat faktory, mající vliv na složení moči, zejména pak vliv věku. Osvojení si metody LC-MS používané k charakterizování metabolického obrazu moči. Použití této metody k analýze čtyř vybraných analytů v moči pacientů různých věkových skupin. Vybranými analyty byly kreatinin, acetylkarnitin, karnitin a alanin.

2.2 Hypotéza

H01: Koncentrace metabolitů v moči různých věkových skupin pacientů nebude stejná.

HA1: Koncentrace metabolitů v moči různých věkových skupin pacientů bude stejná.

3 Metodika

3.1 Sběr materiálu

Pro analýzu metabolického obrazu metodou LC-MS byla sbírána ranní moč. Sbírá se střední proud na lačno do standartní odběrové zkumavky v objemu do 10 ml a označené kódem. Jako zkoumaný soubor jsem si vybral 50 anonymizovaných dobrovolníků. Ty jsem rozdělil do pěti věkových skupin 15, 25, 35, 45 a 55 let. V jednotlivých kategoriích bylo vždy po pěti mužích a ženách a ponechal jsem věkový rozptyl pro jednotlivé skupiny 5 let.

Tabulka č. 4: Kódování a roztrídění vzorků močí

Ženy				
J. G. 15	L. Š. 25	R. D. 35	M. M. 45	J. N. 55
I. F. 15	L. M. 25	L. K. 35	R. N. 45	I. Š. 55
A. G. 15	E. H. 25	O. F. 35	D. G. 45	D. H. 55
K. F. 15	L. L. 25	R. G. 35	V. D. 45	L. F. 55
T. V. 15	K. S. 25	E. H. 35	J. S. 45	J. S. 55

Muži				
L. M. 15	L. S. 25	J. H. 35	R. M. 45	L. J. 55
J. P. 15	T. K. 25	L. F. 35	M. B. 45	L. S. 55
M. Be. 15	R. M. 25	M. M. 35	A. B. 45	J. H. 55
T. J. 15	J. Č. 25	A. T. 35	J. P. 45	L. M. 55
M. B. 15	D. K. 25	J. F. 35	A. S. 45	J. B. 55

Moč je třeba analyzovat co nejrychleji. Při delším skladování je dobré moč uchovávat v mrazáku či chladničce nebo konzervovat azidem sodným, abychom předešli degradačním procesům.

Měření bylo opakováno ve třech sériích s časovým rozestupem 10 a 5 dní. U anonymizovaných dobrovolníků se formou dotazníku zjistily základní parametry důležité pro vyhodnocení výsledků jako: věk, váha výška, složení potravy, probíhající onemocnění, užívání léků atd. Využitý dotazník je přílohou této práce.

3.2 Příprava vzorků před analýzou

Ze zkumavek se vzorky respondentských močí bylo odpipetováno automatickou pipetou 200 μl močí do eppendorf zkumavek, označených stejnými kódy jako na odběrových zkumavkách. Dále se pro precipitaci bílkovin a nutnosti obsahu minimálně 70% organické fáze ve vzorku (z důvodu funkčnosti HILIC separace) přidalo 800 μl ACN, následně byla provedena centrifugace při 10 000 RPM a 20 °C po dobu 10 minut. Do kódem označených autosamplerových vialek byla napipetována směs dvou vnitřních standardů (D3-karnitin, D3-kreatinin) o 50 μM koncentraci v objemu 10 μl . Ke směsi vnitřních standardů bylo přidáno 90 μl supernatantu ze zcentrifugované zkumavky s močí a ACN. Zkumavky byly seřazeny do stojánku a dány do autosamplerové přihrádky.

3.3 Příprava mobilní fáze

Jako první mobilní fázi (A) byl použit roztok uhličitanu amonného ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$) o koncentraci 20 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Za použití pH metru a roztoku hydroxidu amonného (NH_4OH) došlo k finální úpravě pH mobilní fáze na hodnotu 9,2. Druhou mobilní fázi byl 90% roztok acetonitrilu.

3.4 Pomůcky a reagentie

V následujícím výčtu jsou uvedeny chemikálie, pomůcky a přístrojové vybavení, které byly použity pro přípravu a analýzu vzorků.

3.4.1 Chemikálie

- uhličitán amonný - Sigma-Aldrich (Německo)
- acetonitril - Fischer Scientific (UK)
- hydroxid amonný, 25% roztok - Fluka analytical (Kanada)
- Azid sodný - Sigma (Německo)

3.4.2 Vnitřní standardy

- L-karnitin-methyl-d3-hydrochlorid - Cambrige isotope laboratories (USA)
- kreatinin-methyl-d3 - Isotech (USA)

3.4.3 Standardy

- Alanin - Sigma-Aldrich (Německo)
- Acetyl-L-karnitin chlorid - Santa Cruz biotechnology (USA)
- Kreatinin - Sigma-Aldrich (Německo)
- DL-karnitin- Sigma-Aldrich (Německo)

3.4.4 Pomůcky a přístrojové vybavení

- automatická pipeta - Eppendorf research plus (Kanada)
- pipetovací špičky - Eppendorf (Kanada)
- plastové eppendorfovy zkumavky - Eppendorf (Kanada)
- odběrové zkumavky na moč
- autosamplerové zkumavky se septovým uzávěrem - Thermo scientific (USA)
- stojan na zkumavky
- stojan na eppendorf zkumavky
- stojan na autosamplerové vialky
- kolona pro kapalinovou chromatografii typ ZIC-pHILIC - Merck (Německo)

- centrifuga Hettich universal 320R - Fischer scientific
- pH metr toledo FEP - Fischer scientific
- Orbitrap Q exactive plus - Thermo scientific
- Shaker ÚOCHB - (ČR)
- Dionex ultimate 3000 XRS pump - Thermo Scientific
- Dionex ultimate 3000 XPS open autosampler - Thermo Scientific
- Dionex ultimate 3000 RS Column compartment - Thermo Scientific

Obrázek č. 2: Kapalinový chromatograf Dionex a hmotnostní spektrometr Orbitrap zdroj: <<http://masspec.fas.harvard.edu/pages/instrumentss>>



3.5 Analýza vzorků moči

3.5.1 Metoda LC-MS

Jedná se o spojení dvou přístrojů - kapalinového chromatografu a hmotnostního spektrometru. Úkolem kapalinového chromatografu je odseparovat jednotlivé analyty z mobilní fáze na stacionární fázi. Výstupem je chromatogram, na kterém je pro každou vyseparovanou látku viditelný pík. Za pomoci počítačového softwaru je možno o píku získat informace jako jeho plochu, retenční čas, šířku píku v polovině jeho výšky. Pro analýzu vzorků moči byl použit kapalinový chromatograf Dionex ultimate 3000 složený z pumpy, otevřeného autosamleru a kolonového prostoru. Použita byla kolona ZIC-pHILIC, 150x4,6mm, 5 μ m. V této koloně lze separovat látky principem hydrofilních interakcí. Stacionární fáze je tvořena tuhým sorbentem s hydrofilním filmem. Mobilní fáze je v tomto případě tvořena acetonitrilem a uhličitánem amonným. Při analýze byla kolona temperována na 35 °C.

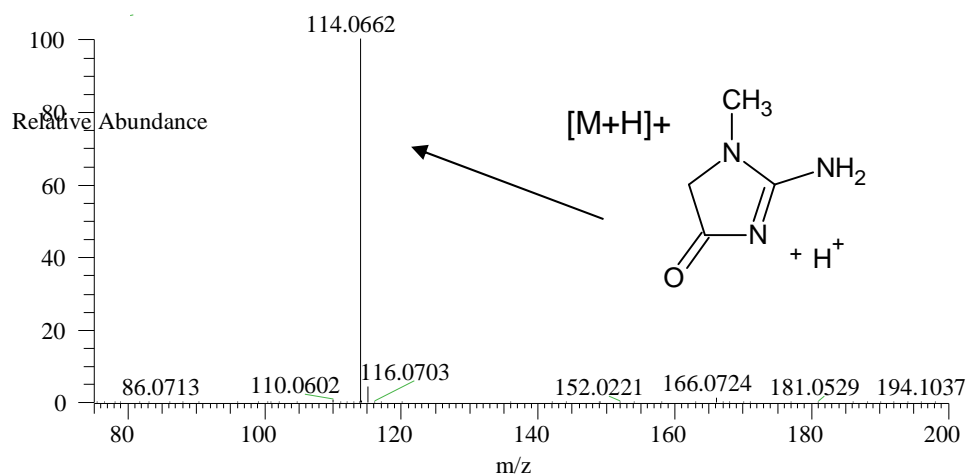
4 Výsledky

Pro tuto bakalářskou práci bylo ve třech sériích nasbíráno celkem 150 vzorků od padesáti anonymizovaných dobrovolníků (25 žen a 25 mužů), kteří pocházeli z táboreského a českobudějovického okresu a splňovali věková kritéria 15, 25, 35 45, 55 \pm 5 let. Odběry ranní moči ze středního proudu byly realizovány 1. 4., 10. 4. a 15. 4. 2015. LC-MS analýza byla provedena v Českých Budějovicích v laboratoři analytické biochemie a metabolomiky Entomologického ústavu, Biologického centra Akademie věd České republiky. Vzorky byly podrobeny jak necílenému, tak cílenému screeningu. Měření bylo prováděno v pozitivním módu v plném skenu v rozsahu 75-1000 Da s využitím datově závislého MS/MS. Z takto naměřených dat byl následně proveden cílený screening, s využitím rekonstruovaných chromatogramů vycházejících z plného skenu pro semikvantifikaci vybraných látek a MS/MS skeny pro jejich identifikaci. Pro semikvantifikaci byly vybrány následující látky: acetylkarnitin, karnitin, kreatinin a alanin, které jsou touto metodou viditelné a byla sledována korelace množství těchto analytů s věkem dárců.

Každá věková kategorie byla zpracována samostatně, a také i zvlášť pro muže a ženy v rámci jedné věkové kategorie. Výsledné hodnoty byly zprůměrovány a do tabulek byl uveden zástupce s hodnotou nejvíce se blížíící tomuto průměru spolu se směrodatnou odchylkou. Hodnoty ploch píků byly přepočítány na plochu píku kreatininu z důvodu normalizace dat. Dále jsou k tabulkám přiloženy chromatogramy a hmotnostní spektra pro daný analyt a grafy demonstrující změny hodnot ploch píku vlivem věku.

4.1 Hmotnostní spektra

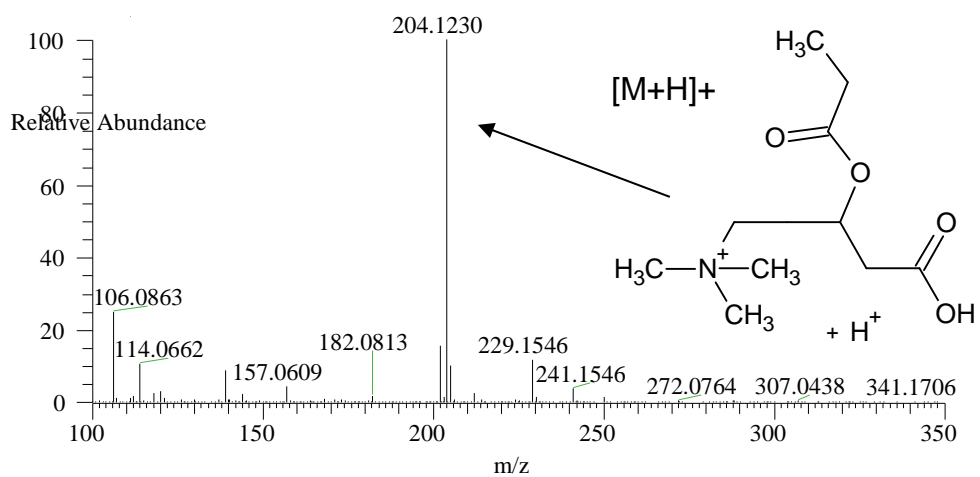
Obrázek č. 3: Hmotnostní spektrum pro kreatinin



Vrozec překreslen v ACD/ChemSketch, zdroj

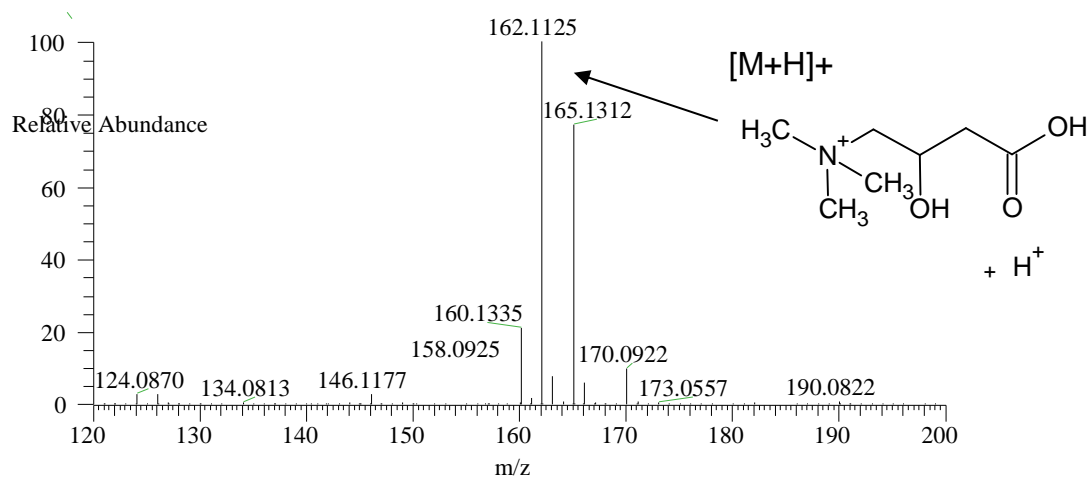
<<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00562>>

Obrázek č. 4: Hmotnostní spektrum pro acetylkarnitin



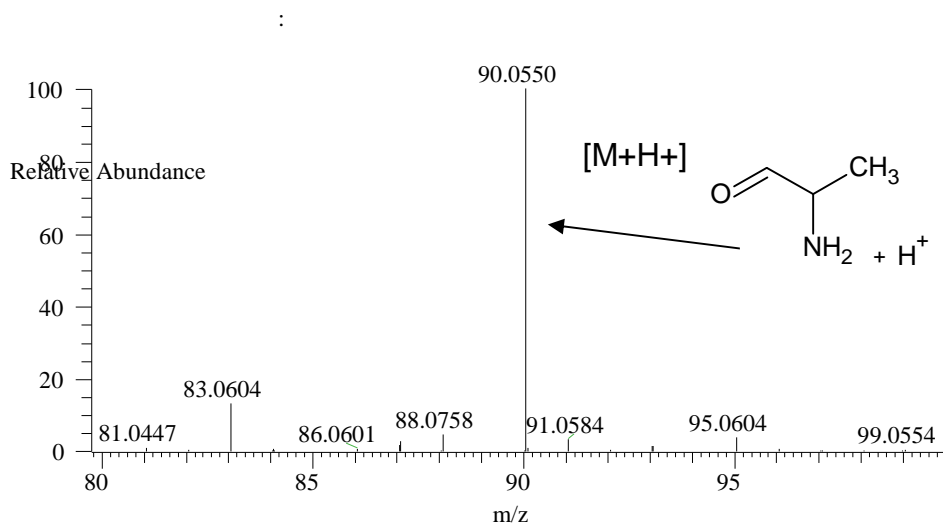
Vrozec překreslen v ACD/ChemSketch, zdroj <
<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00201>>

Obrázek č. 5: Hmotnostní spektrum pro karnitin



Vrozec překreslen v ACD/ChemSketch, zdroj <
<http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00062>>

Obrázek č. 6: Hmotnostní spektrum pro alanin



Vzorec překleslen v ACD/ChemSketch, zdroj:

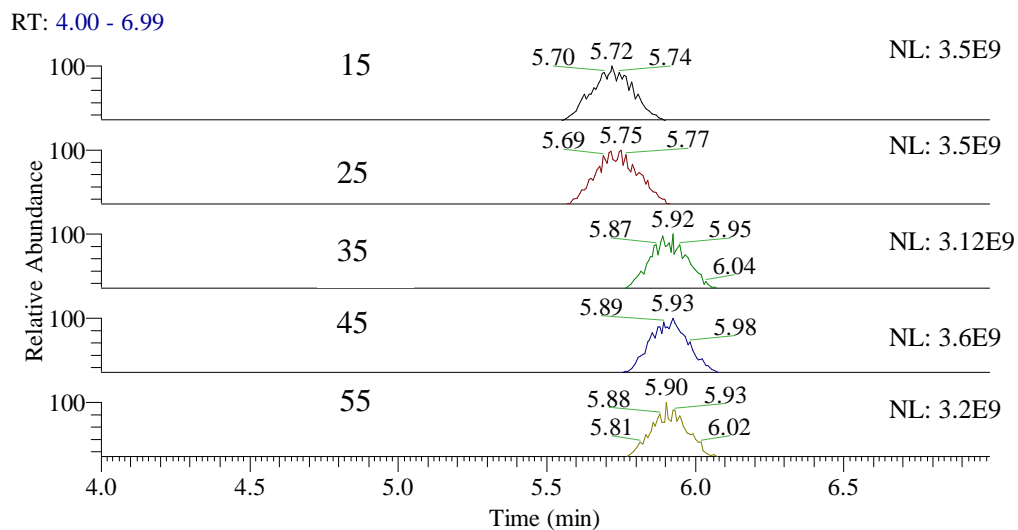
< <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB00161> >

4.2 Chromatogramy

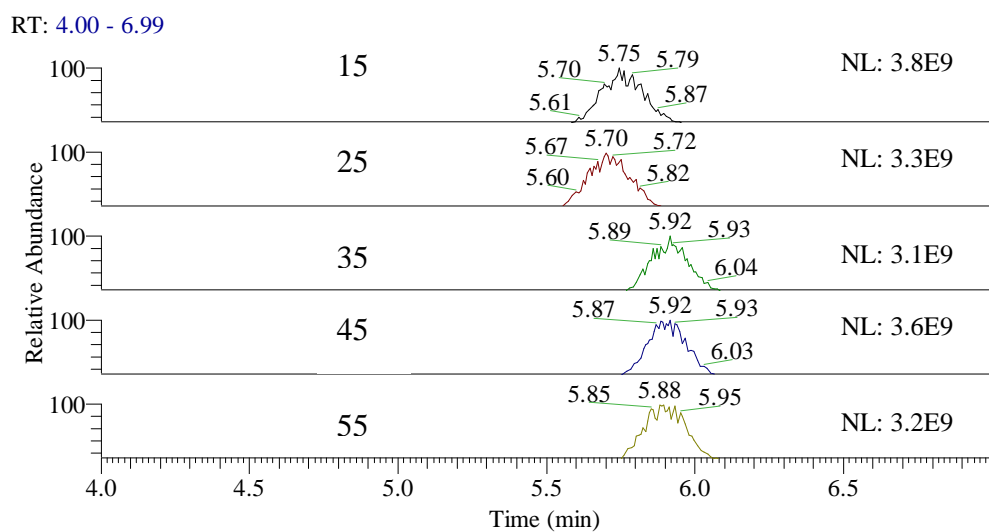
Chromatogramy byly zpracovány programem Thermo Xcalibur Qual BrowserTM. Pro porovnání jsou píky uvedeny sestupně podle věkových kategorií od patnáctiletých po padesátipětileté. Hodnoty ploch píků přepočítaných na plochu píku kreatininu jsou uvedeny v tabulkách. Uvedena je první série měření, druhá a třetí je umístěna v příloze.

4.2.1 První série měření

Obrázek č. 7: Chromatogramy pro kreatinin - ženy



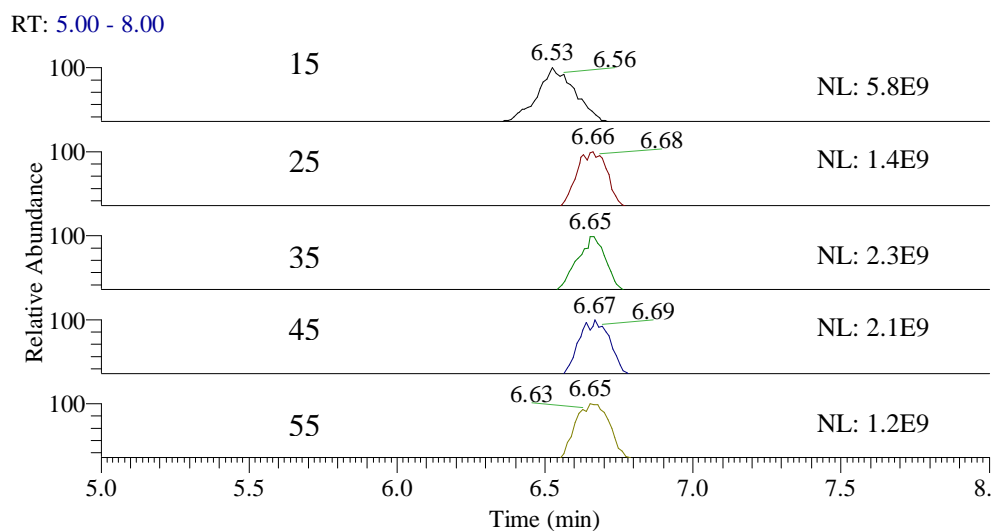
Obrázek č. 8: Chromatogramy pro kreatinin - muži



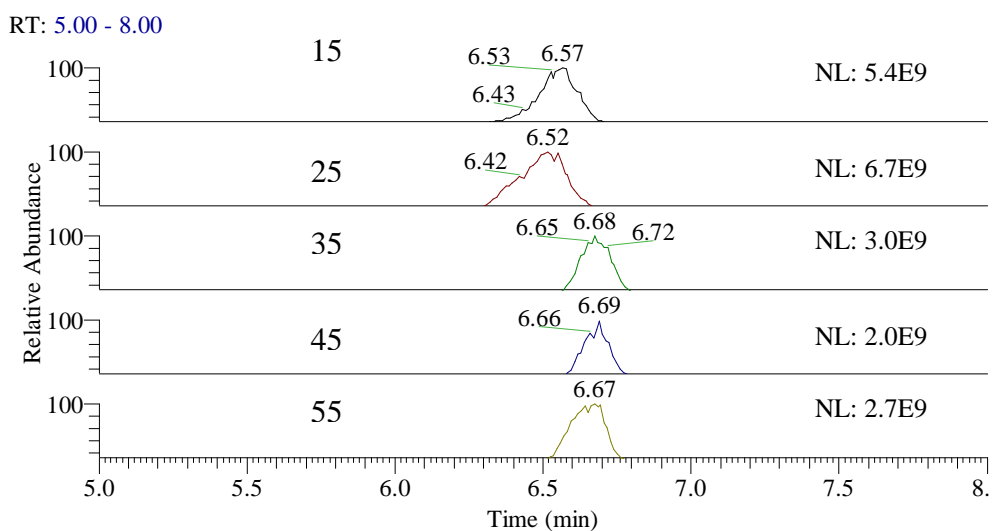
Tabulka č. 5: Hodnoty ploch píku pro kreatinin

Kreatinin - 1 série měření			
Ženy		Muži	
Kód	plocha píku * 10 ⁻⁹	Kód	plocha píku * 10 ⁻⁹
J. G. 15	40.22 ± 3.03	J. P. 15	42.85 ± 4.77
K. S. 25	39.94 ± 4.31	D. K. 25	36.23 ± 7.02
O.F. 35	33.11 ± 1.93	L.F. 35	34.01 ± 4.63
D.G. 45	38.48 ± 3.44	R. M. 45	38.1 ± 2.95
J. N. 55	33.34 ± 5.27	J. H. 55	36.32 ± 2.47

Obrázek č. 9: Chromatogramy pro acetylkarnitin - ženy



Obrázek č. 10: Chromatogramy pro acetylkarnitin - muži

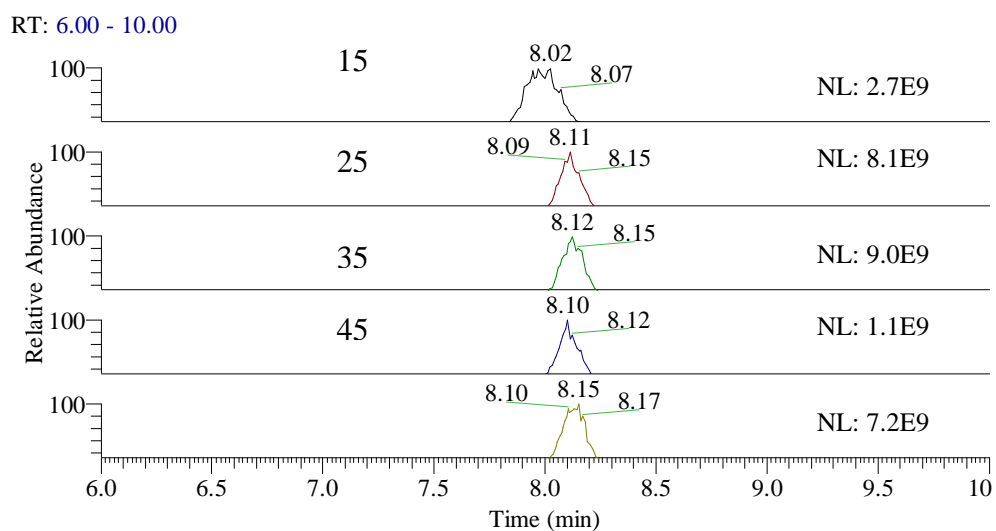


Tabulka č. 6: Hodnoty ploch píku pro acetylkarnitin

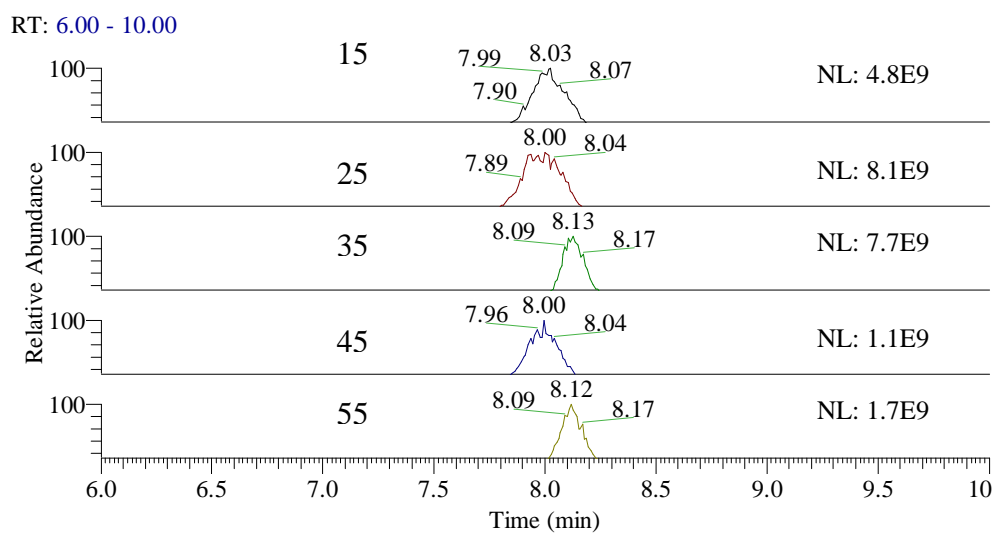
Acetylkarnitin - 1. série měření

Ženy		Muži	
Kód	plocha píku/kreatinin* 10 ³	Kód	plocha píku/kreatinin* 10 ³
T. V. 15	16.75 ± 21.09	L. M. 15	13.38 ± 23.60
E. H. 25	26.55 ± 19.66	L. S. 25	18.69 ± 24.49
R. D. 35	58.17 ± 37.91	A. T. 35	72.25 ± 53.76
M. M. 45	41.66 ± 21.47	J. P. 45	34.80 ± 15.52
D. H. 55	36.80 ± 61.39	J. B. 55	61.80 ± 33.08

Obrázek č. 11: Chromatogramy pro karnitin - ženy



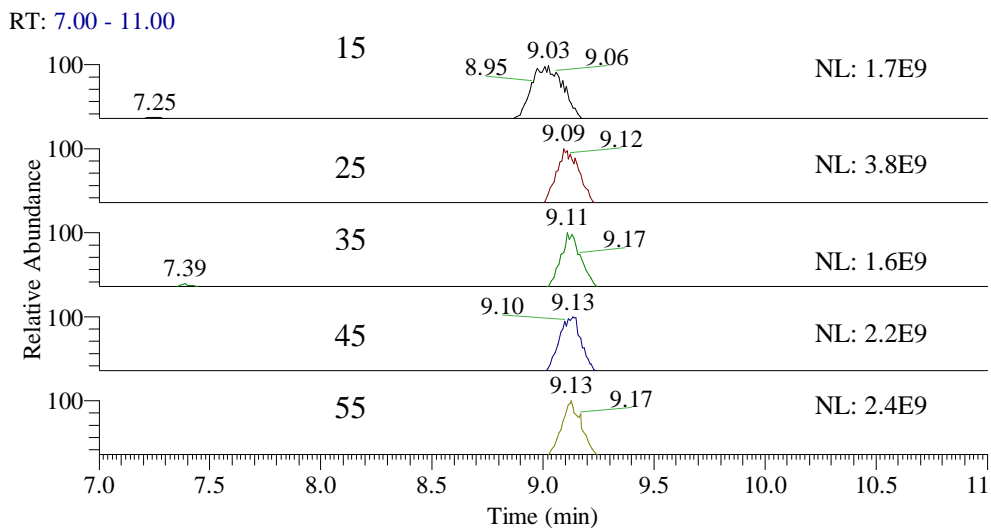
Obrázek č. 12: Chromatogramy pro karnitin - muži



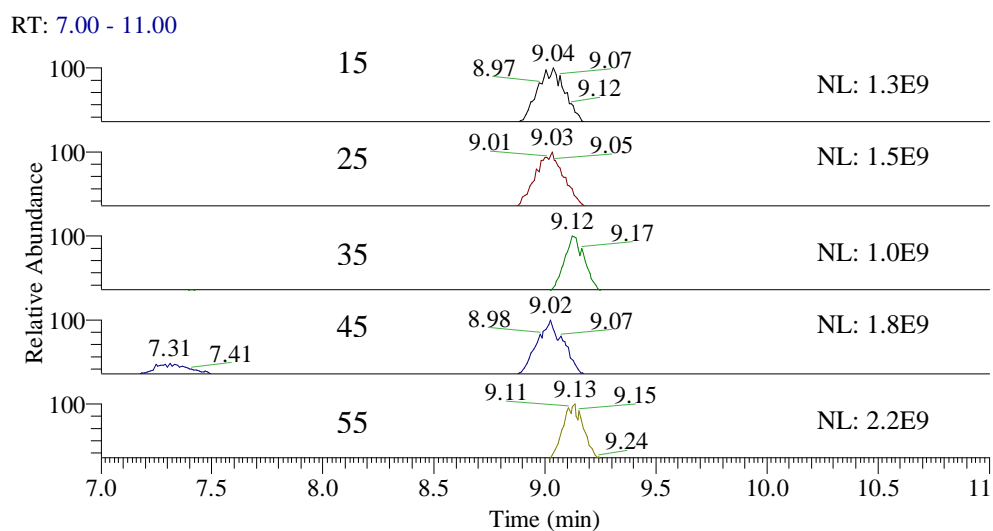
Tabulka č. 7: Hodnoty ploch píků pro karnitin

Karnitin - 1. série měření			
Ženy		Muži	
Kód	plocha píku/kreatinin* 10 ³	Kód	plocha píku/kreatinin* 10 ³
T. V. 15	82.15 ± 140.41	L. M. 15	125.00 ± 157.14
E. H. 25	284.49 ± 167.48	D. K. 25	125.88 ± 106.01
R. D. 35	213.45 ± 102.92	J. F. 35	169.42 ± 69.54
D. G. 45	185.51 ± 106.69	R. M. 45	211.02 ± 145.26
D. H. 55	185.46 ± 72.87	J. B. 55	304.59 ± 204.14

Obrázek č. 13: Chromatogramy pro alanin - ženy



Obrázek č. 14: Chromatogramy pro alanin - muži



Tabulka č. 7: Hodnoty ploch píků pro alanin

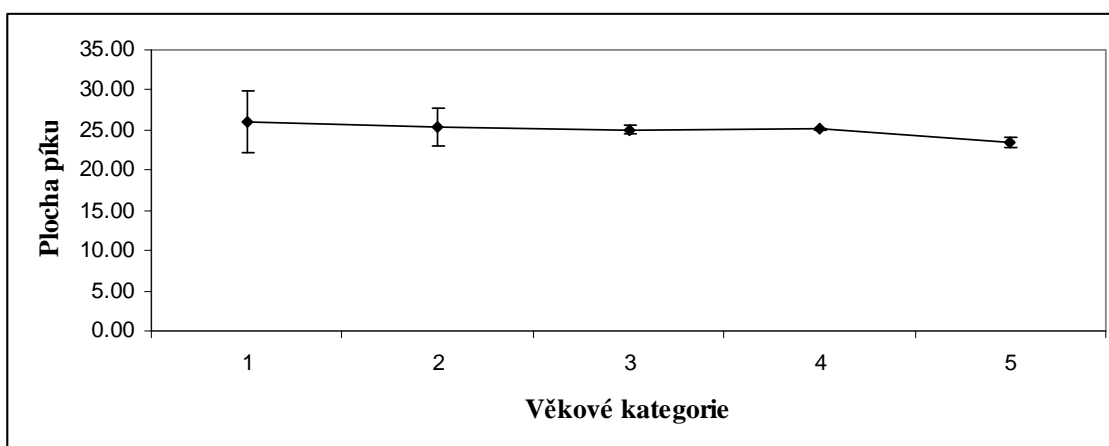
Alanin - 1. série měření

Ženy		Muži	
Kód	plocha píku/kreatinin* 10 ³	Kód	plocha píku/kreatinin* 10 ³
K. F. 15	4.99 ± 1.99	M. Be. 15	3.91 ± 1.53
E. H. 25	10.41 ± 5.02	T. K. 25	3.81 ± 2.11
L. K. 35	3.00 ± 3.25	J. F. 35	1.93 ± 1.42
M. M. 45	3.92 ± 5.64	M. B. 45	4.08 ± 1.33
I. Š. 55	3.48 ± 3.05	L. J. 55	4.97 ± 1.38

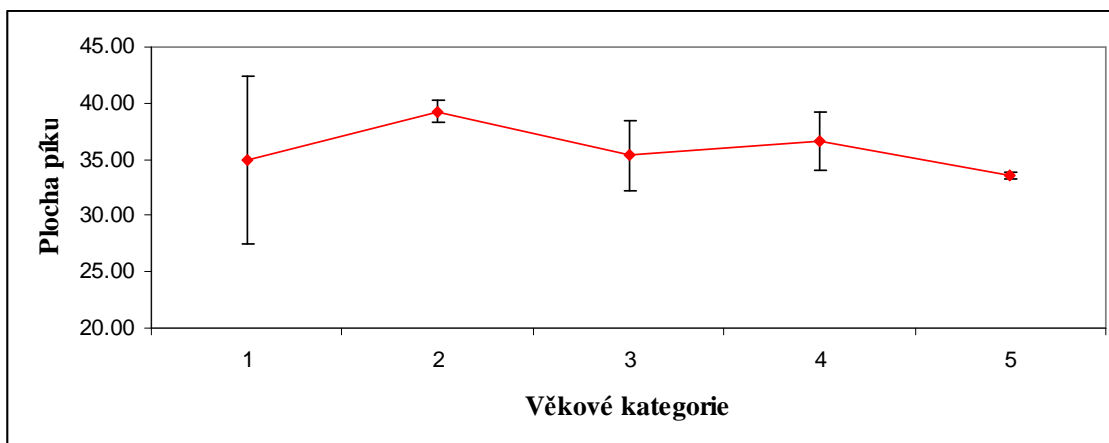
4.3 Celkové semikvatitativní zhodnocení naměřených dat

Na obrázcích č. 15 - 26 jsou zobrazeny hodnoty normalizovaných ploch píků vybraných analytů (kreatinin, acetylkarnitin, karnitin, alanin) na plochu píku kreatininu se znázorněnými směrodatnými odchylkami v závislosti na věku. Tyto závislosti jsou vypracovány pro obě pohlaví společně a i pro každé pohlaví zvlášť.

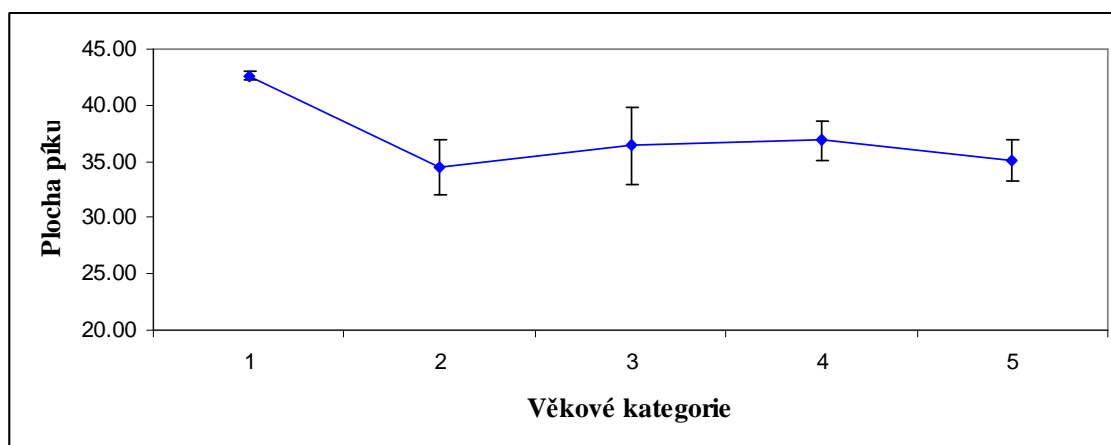
Obrázek č. 15: Graf zobrazení hodnot kreatininu pro věkové kategorie



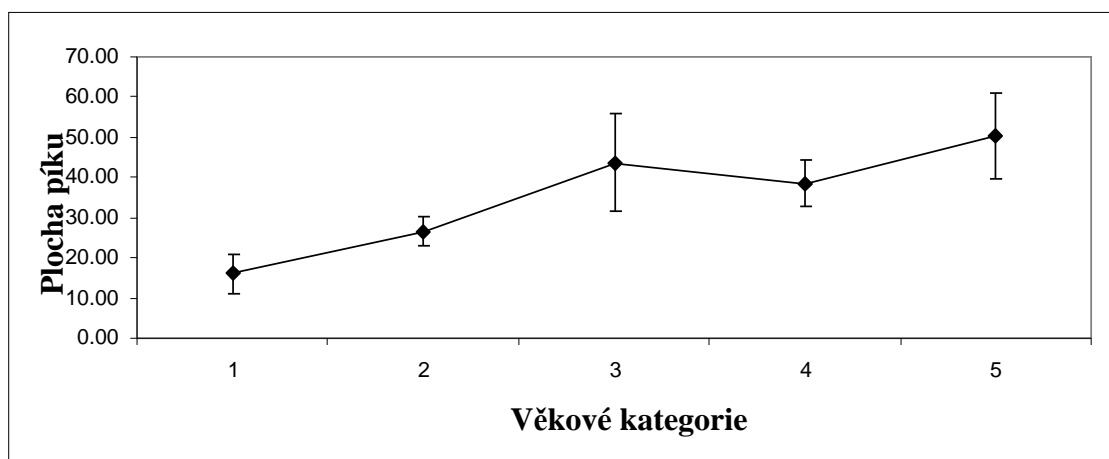
Obrázek č. 16: Graf zobrazení hodnot kreatininu pro ženy



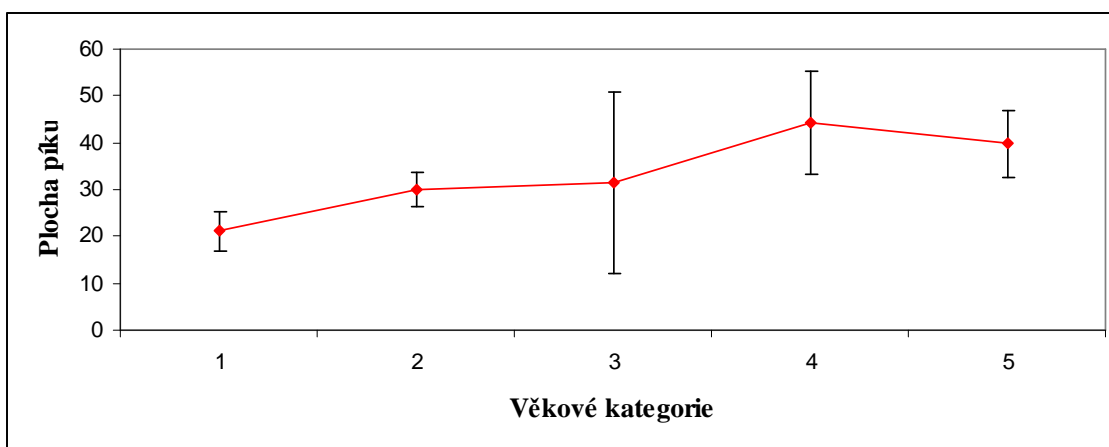
Obrázek č. 17: Graf zobrazení hodnot kreatininu pro muže



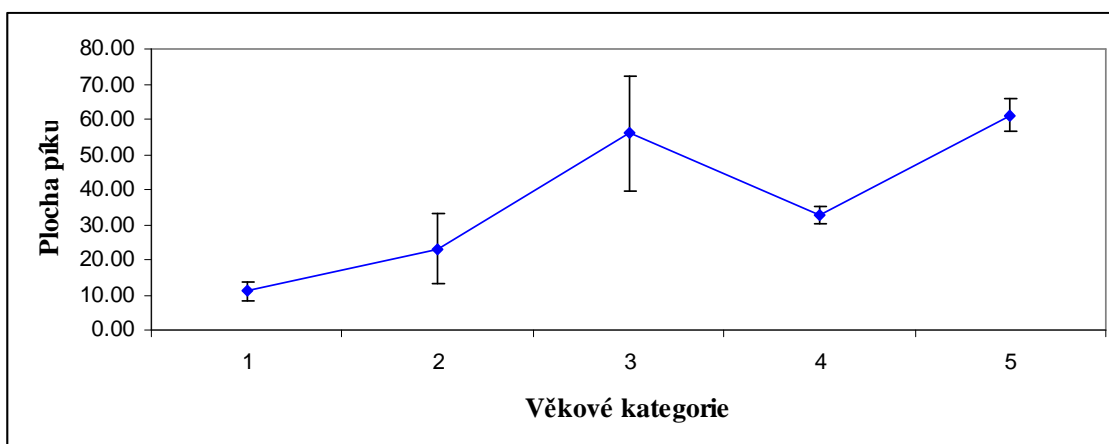
Obrázek č. 18: Graf zobrazení hodnot acetylkarnitinu pro věkové kategorie



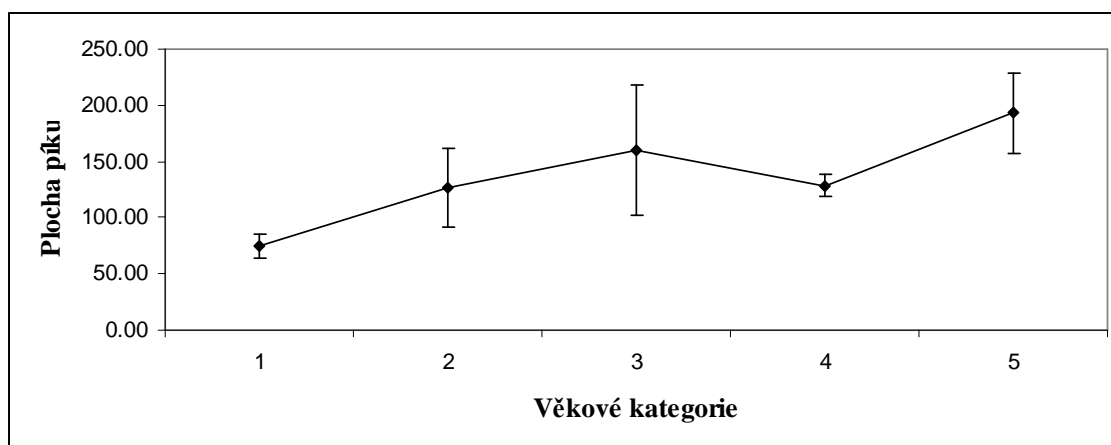
Obrázek č. 19: Graf zobrazení hodnot acetylkarnitinu pro ženy



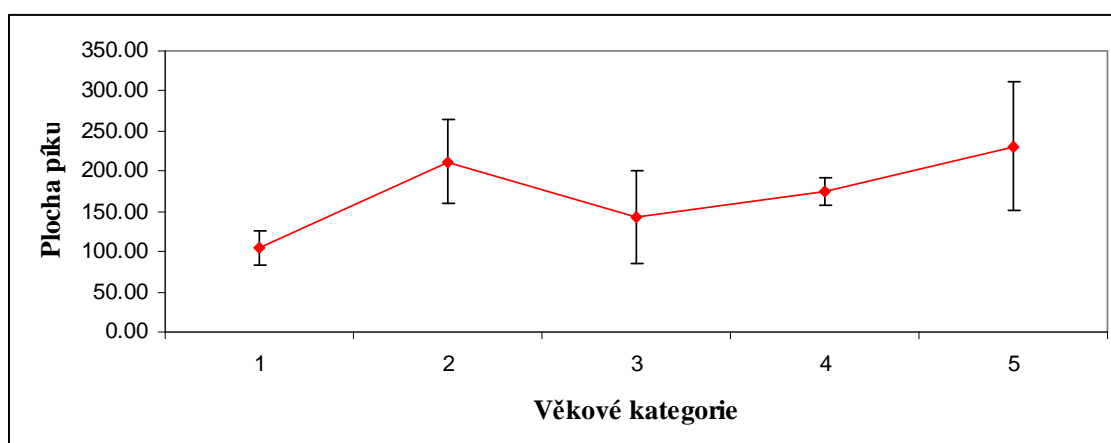
Obrázek č. 20: Graf zobrazení hodnot acetylkarnitinu pro muže



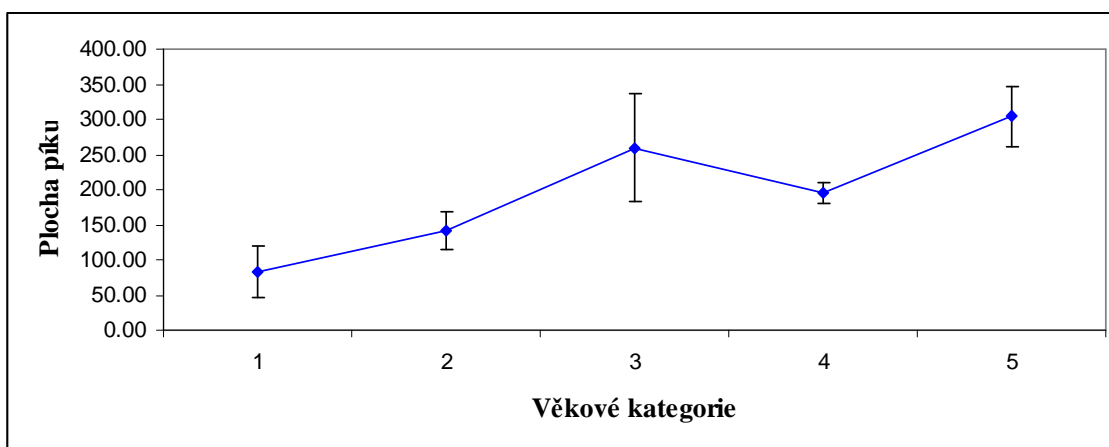
Obrázek č. 21: Graf zobrazení hodnot karnitinu pro věkové kategorie



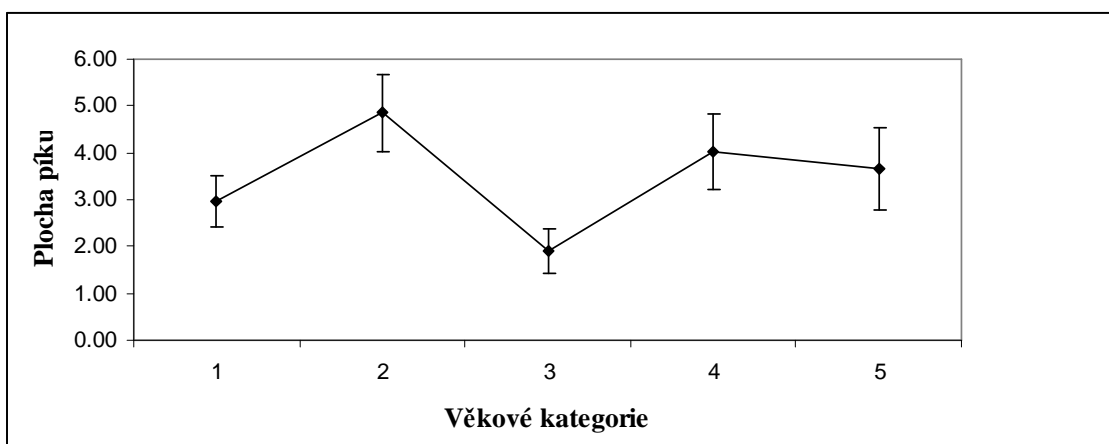
Obrázek č. 22: Graf zobrazení hodnot karnitinu pro ženy



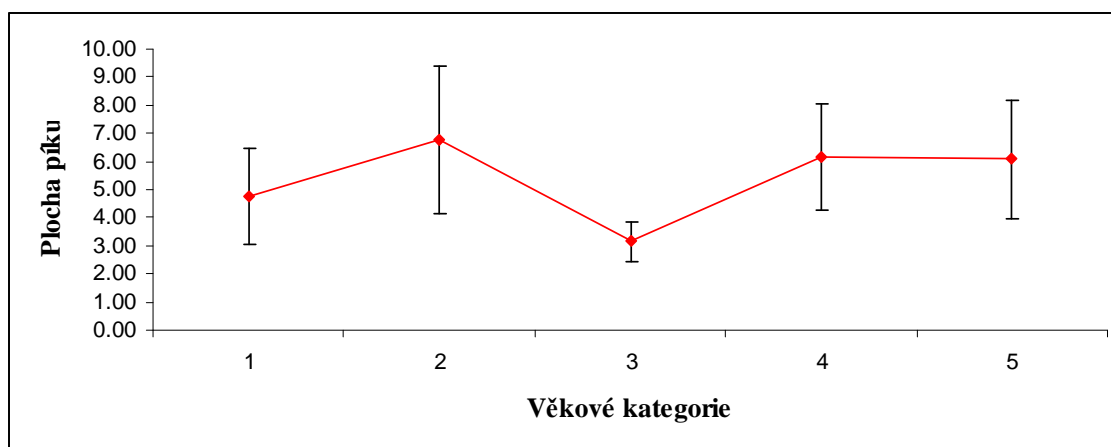
Obrázek č. 23: Graf zobrazení hodnot karnitinu pro muže



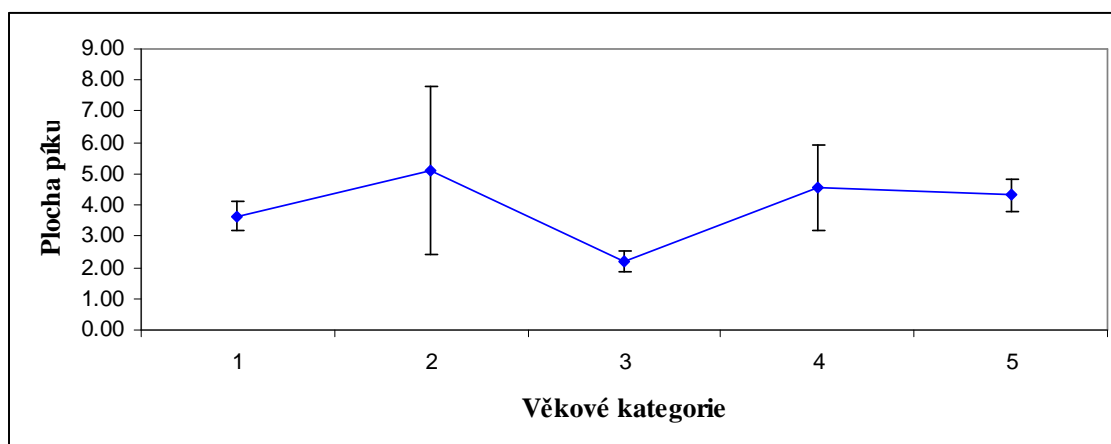
Obrázek č. 24: Graf zobrazení hodnot alaninu pro věkové kategorie



Obrázek č. 25: Graf zobrazení hodnot alaninu pro ženy



Obrázek č. 26: Graf zobrazení hodnot alaninu pro muže



5 Diskuze

Cílem mé bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši na téma složení lidské moči. Dále jsem se zaměřil na faktory ovlivňující složení moči, především korelace s věkem. Vzhledem k možné šíři a obsáhlosti tohoto výzkumu jsem si stanovil čtyři látky, u nichž jsem se snažil závislost na věku nalézt. Jednalo se o kreatinin, acetylkarnitin, karnitin a alanin. U těchto analytů jsem veškeré naměřené hodnoty pro dané kategorie průměroval a takto získaná data doplnil údaji o nejistotě dat vyjádřených směrodatnou odchylkou. Tyto výpočty byly zpracovány jak pro celou věkovou kategorii bez rozdílu pohlaví, tak i pro ženy a muže zvlášť. Má naměřená data jsem porovnal s výsledky, které jsem zjistil při literární rešerši. Z práce Psihogiose¹² vyplývá, že po čtyřicátém roce života klesá koncentrace všech čtyř analyzovaných látek. S tímto závěrem korelují pouze výsledky získané pro kreatinin. Příčin může být hned několik, např. úbytek svalové hmoty vlivem stárnutí nebo vyčerpáním organismu. Co se týče karnitinu a acetylkarnitinu, mé výsledky se s výsledky Psihogiose¹² rozcházejí. Z mých výsledků vyplývá, že jejich koncentrace v moči se zvyšujícím se věkem vzrůstá. Korelace s věkem pro aminokyselinu alanin se neprokázala, je patrné, že v průběhu života je koncentrace v moči poměrně variabilní. Důvodem pro to mohou být jiné stravovací návyky analyzované skupiny. Psihogios¹² a jeho tvrzení se s výsledky mého výzkumu shodují pouze u látky kreatinin, u které byla v obou případech prokázána vlivem věku snižující se koncentrace v moči. U ostatních látek jsem se s tvrzením Psihogiose¹² neshodl. Myslím si, že tento rozdíl je způsoben malým souborem testovaných vzorků v korelaci s velkým rozptylem hodnot. Z důvodu malého počtu testovaných vzorků nelze mé výsledky považovat za statisticky významné a korelovat mé výsledky na celou populaci.

6 Závěr

Teoretická část této bakalářské práce popisuje strukturálně a funkčně ledviny, zkoumá, které látky moč obsahuje. Je zde poukázáno na faktory, které mají vliv na složení moči, hlavně jaký je vliv indexu tělesné hmotnosti, barvy pleti a nejvíce pak ovlivnění věkem. Jsou zde uvedeny informace o metodě kapalinové chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií použité k analýze vybraných látek (kreatininu, acetylkarnitinu, karnitinu, alaninu). Tato metoda je více než dostačující pro potřeby mnou prováděné analýzy moči. Metoda byla provedena na s vysokorozlišovacím hmotnostním spektrometru (Orbitrap Q Exactive Plus), k separaci byla využita kolona typu ZIC-p-HILIC, která má výborné vlastnosti pro námi zvolený typ analytů a matrice.

Výsledná data byla zpracována v programu XcaliburTM. Zpracovávaly a porovnávaly se plochy píků pro vybrané analyty od anonymizovaných dárců, spadajících do zvolených věkových kategorií.

Z výsledků vyplývá, že koncentrace kreatininu v moči vlivem věku postupně klesá, mnou zjištěná korelace se ztotožňuje s tvrzením Psihogiose¹². Naopak koncentrace karnitinu a acetylkarnitinu se v moči zvyšuje, tento trend nesouhlasí s hodnotami od Psihogiose.¹² U alaninu nebyla nalezena významnější souvislost s věkem. Vzhledem k velmi vysokému rozptylu dat tyto hodnoty nejsou statisticky významné, protože byla provedena analýza močí u příliš malého souboru jedinců. Podrobnější studie tohoto druhu nebyla cílem a ani v časových možnostech bakalářské práce. Tato problematika by si do budoucna zasloužila mnohem více pozornosti pro další rozsáhlejší výzkum.

7 Seznam použité literatury

1. Künzel D. *Lidský organismus ve zdraví a nemoci*. Vyd. 1. Překlad Saša Hrabal. Praha: Avicenum, 1990, 375 s. ISBN 80-201-0000-8.
2. Trojan S. *Lékařská fyziologie*. Vyd. 2., přeprac. a rozš. Praha: Grada, 1996, 489 s. ISBN 80-716-9311-1.
3. Musil J. *Molekulové základy klinické biochemie*. Praha: Grada Avicenum, 1994, 377 s. ISBN 8071690562.
4. Wikipedia The Free Encyclopedia. *Vitamin D* [online]. 2011 [cit. 2015-04-26]. Dostupné z: <http://en.wikipedia.org/wiki/Vitamin_D>
5. Marshall W. J. a Bangert S. *Clinical chemistry*. 6th ed. Edinburgh: Mosby, 2008, 416, ISBN 9780723434603.
6. Houdek F. *Kapitoly z kardiologie pro praktické lékaře: Příběh inzulinu*. [online], 76-78, 2012.
7. Putnam D. F. Chemical composition of urine NASA Contractor Report No. NASA CR-1802, July 1971.
8. Kawaciuk I. *Urologie obecná a speciální*. 1. vyd. Jinočany: H & H, 1992. ISBN 8085467941.
9. 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.
10. Longo N, Amat di San Filippo C, Pasquali M. Disorders of carnitine transport and the carnitine cycle. 77-85, 2006.
11. William D., Asplin J., Jackson E., Jackson CH., Reddy P., Sheldon C. a Minevich E. Results of a prospective trial to compare normal urine supersaturation in children and adults. *The Journal of Urology* [online], 1708-1710, 2005.

12. Psihogios N. G., Gazi I. F., Elisaf M. S., Seferiadis K. I. & Bairaktari E. T. Gender-related and age-related urinalysis of healthy subjects by NMR-based metabonomics. *NMR in Biomedicine*, 195–207, 2008.
13. Rodríguez R. E. A Díaz C. R. Iron, Copper and Zinc Levels in Urine. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 200-209, 1995.
14. Taylor E. N. a Curhan G. C. Body Size and 24-Hour Urine Composition. *American Journal of Kidney Diseases*, 905-915, 2006.
15. Wang Ch., Feng R., Sun D., LI Y., BI X. a Sun Ch. Metabolic profiling of urine in young obese men using ultra performance liquid chromatography and Q-TOF mass spectrometry (UPLC/Q-TOF MS): Relationship to Various Individual Factors. *Journal of Chromatography B*, 2871-2876, 2011.
16. Wang, Ch., FENG R., SUN D., LI Y., BI X. a SUN Ch. Metabolic profiling of urine in young obese men using ultra performance liquid chromatography and Q-TOF mass spectrometry (UPLC/Q-TOF MS). *Journal of Chromatography B*, 905-915, 2011.
17. Taylor E. N., Curhan G. C., SUN D., LI Y., BI X. a SUN Ch. Differences in 24-Hour Urine Composition between Black and White Women. *Journal of the American Society of Nephrology*, 2007-01-17, 654-659.
18. Krejčí M. *Mikrokolonová a kapilární kapalinová chromatografie*. 1.vyd. Praha: SNTL, 1990, 152 s. ISBN 80-030-0492-6.
19. Nováková L., Douša M a kol., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha: Lucie Nováková, 157-159, 2013.
20. Strege M. A. Hydrophilic Interaction Chromatography–Electrospray Mass Spectrometry Analysis of Polar Compounds for Natural Product Drug Discovery. *Analytical Chemistry* [online]. 2439-2445, 1998.
21. Brown, S. D., White, C.A., Bartlett, M.G. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1871–1876, 2002.
22. Jandera P., HILIC Chromatografie: perspektivní technika separace polárních látek na polárních stacionárních fázích ve vodně-organických mobilních fázích, *Chemagazín* [online], 2, 2011.

23. Klouda P. *Moderní analytické metody*. 2., upr. a dopl. vyd. Ostrava: Pavel Klouda, 132, 2003, ISBN 80-863-6907-2.
24. Gross J. H. *Mass spectrometry: A Textbook*. Springer, Berlin, Heidelberg, 518 2004.
25. Holčapek M., Jandera P., Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie, *Chemické Listy*, 92, 1998.

8 Přílohy

Příloha č. 1: Dotazník pro dárce moči

Dobrý den,

jmenuji se Roman Menhart a jsem studentem oboru zdravotní laborant na zdravotně sociální fakultě JU. Tento dotazník využiji ke zpracování mé bakalářské práce na téma: Moč, její složení a vliv věku na její metabolický obraz. Moč bude analyzována pod kódem, anonymně. Pro práci použiji jen informace získané z dotazníku.

Odběr moči proveďte prosím ráno. Odeberte střední proud moči a po odběru uchovejte v chladu.

Pohlaví:

- Muž
- Žena

Věk: let

Výška: cm

Váha: kg

V potravě převládá:

- Zelenina/ovoce
- Maso
- Moje strava je vyvážená

Jste kuřák?

- Ne
- Ano

Trpíte onemocněním ledvin, vylučovacího ústrojí?

- Ne
- Ano (jakým).....

Trpíte kardiovaskulárním nebo oběhovým onemocněním?

- Ne
- Ano (jakým).....

Užíváte nějaké léky?

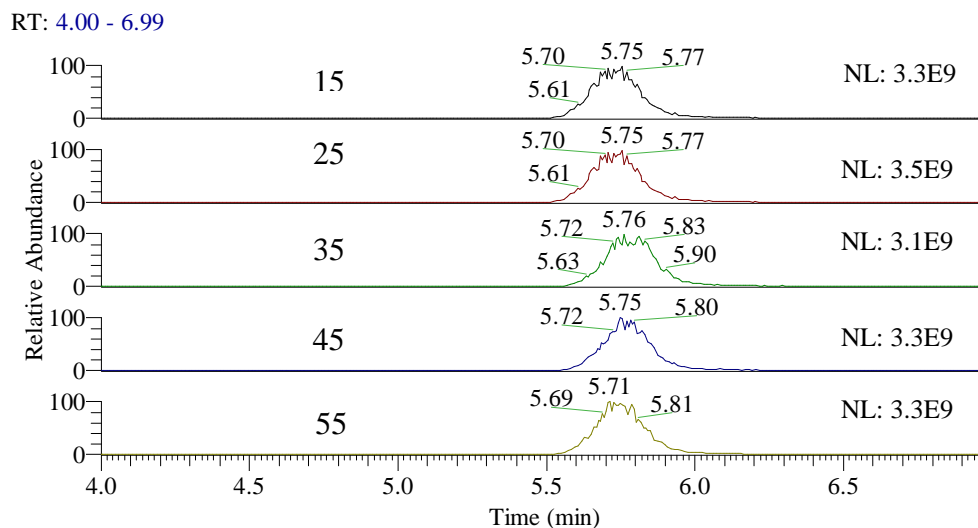
- Ne
- Ano (jaké).....

Užíváte Antikoncepci? (odpoví pouze ženy)

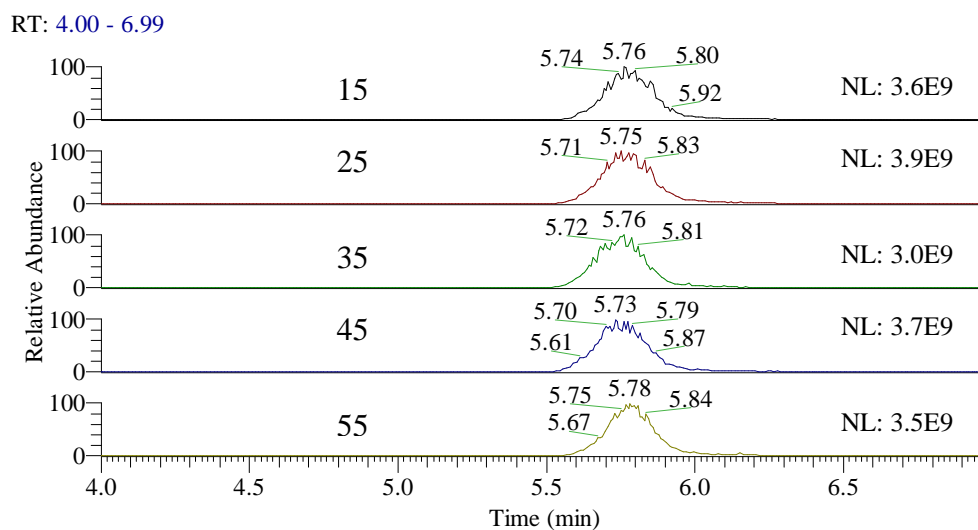
- Ne
- Ano

Příloha č. 2: Výsledky z druhé série měření

Obrázek č. 27: Chromatogramy pro kreatinin - ženy



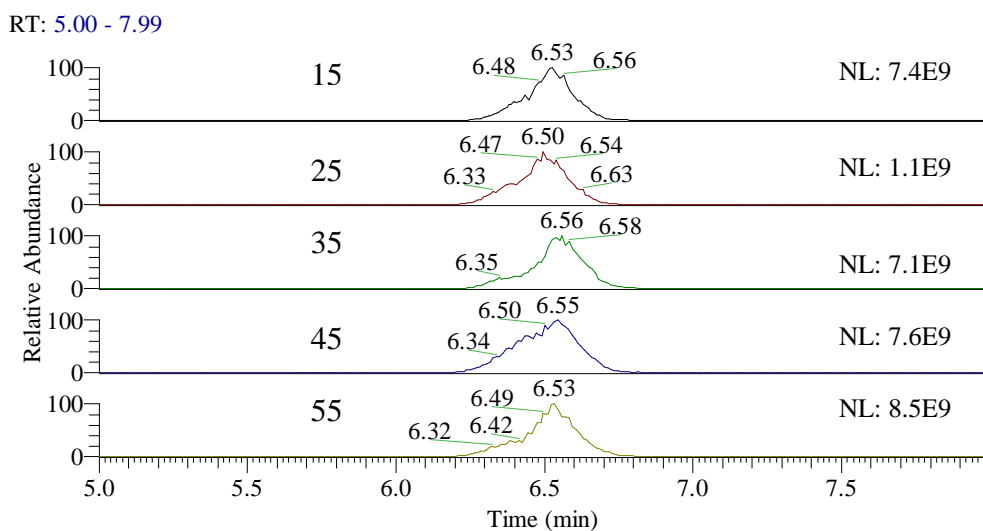
Obrázek č. 28: Chromatogramy pro kreatinin - muži



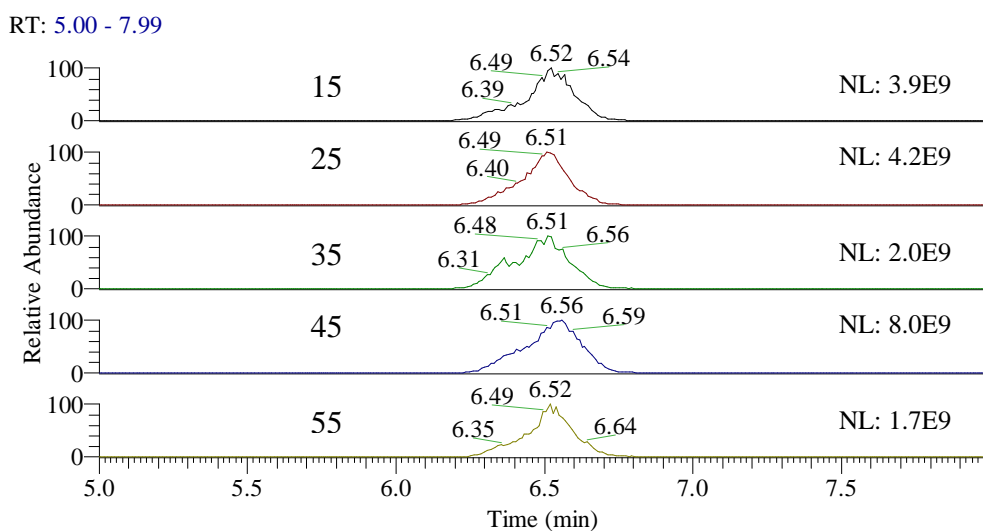
Tabulka č. 8: Hodnoty ploch píků pro kreatinin

Kreatinin - 2. série měření			
Ženy		Muži	
Kód	plocha píku * 10 ⁻⁹	Kód	plocha píku * 10 ⁻⁹
I. F. 15	38.28 ± 16.89	J. P. 15	40.73 ± 6.03
E. H. 25	38.51 ± 4.62	L. S. 25	43.62 ± 5.33
O.F. 35	36.57 ± 4.41	L.F. 35	40.08 ± 4.08
J. S. 45	34.53 ± 4.85	M. B. 45	42.63 ± 7.75
D. H. 55	36.06 ± 1.63	J. H. 55	36.15 ± 6.62

Obrázek č. 29: Chromatogramy pro acetylkarnitin - ženy



Obrázek č. 30: Chromatogramy pro acetylkarnitin - muži

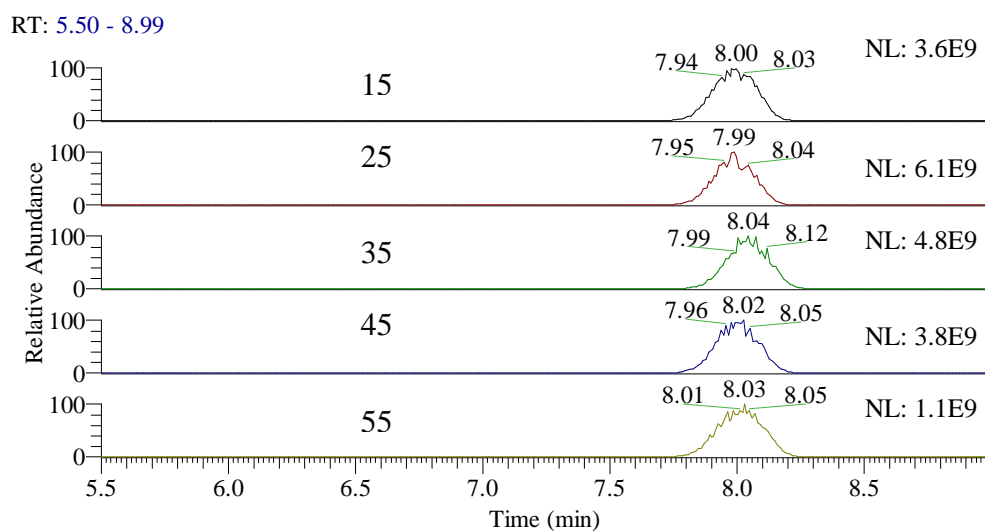


Tabulka č. 9: Hodnoty ploch píků pro acetylkarnitin

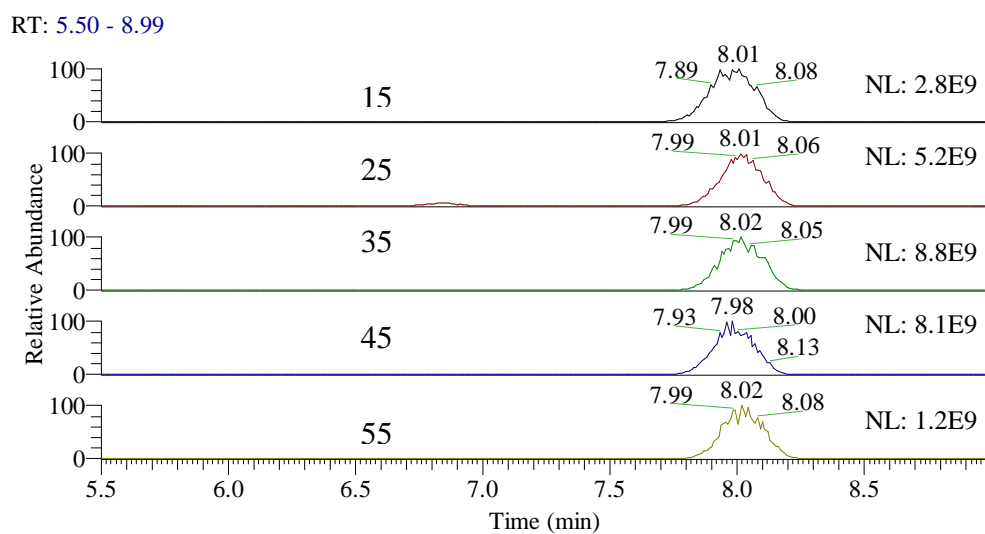
Acetylkarnitin - 2. série měření

Ženy		Muži	
Kód	Plocha píku/kreatinin* 10 ³	Kód	Plocha píku/kreatinin* 10 ³
A. G. 15	19.88 ± 29.18	M. B. 15	12.54 ± 13.58
K. S. 25	35.20 ± 20.13	R. M. 25	13.76 ± 23.83
O. F. 35	23.17 ± 29.79	M. M. 35	61.85 ± 57.80
J. S. 45	32.29 ± 23.53	J. P. 45	29.6 ± 12.41
L. F. 55	33.00 ± 19.73	J. H. 55	55.08 ± 12.08

Obrázek č. 31: Chromatogramy pro karnitin - ženy



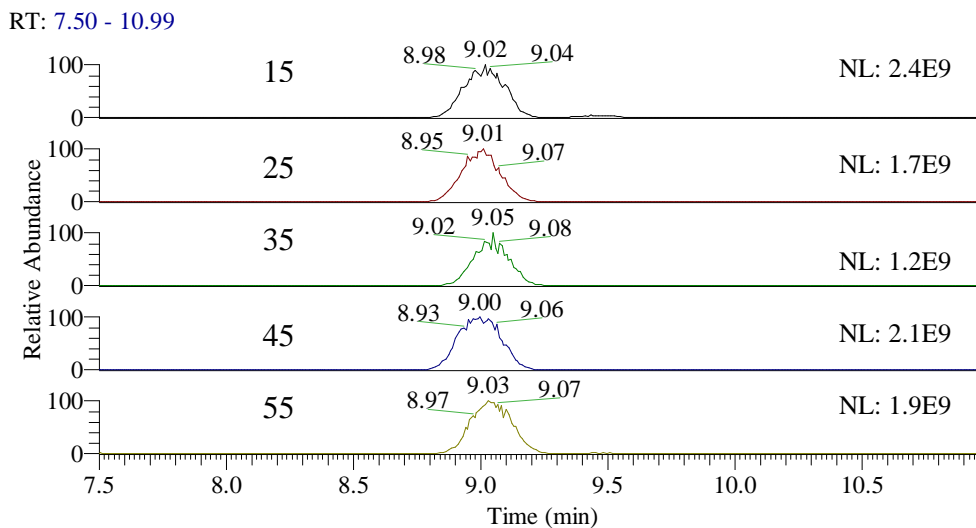
Obrázek č. 31: Chromatogramy pro karnitin - muži



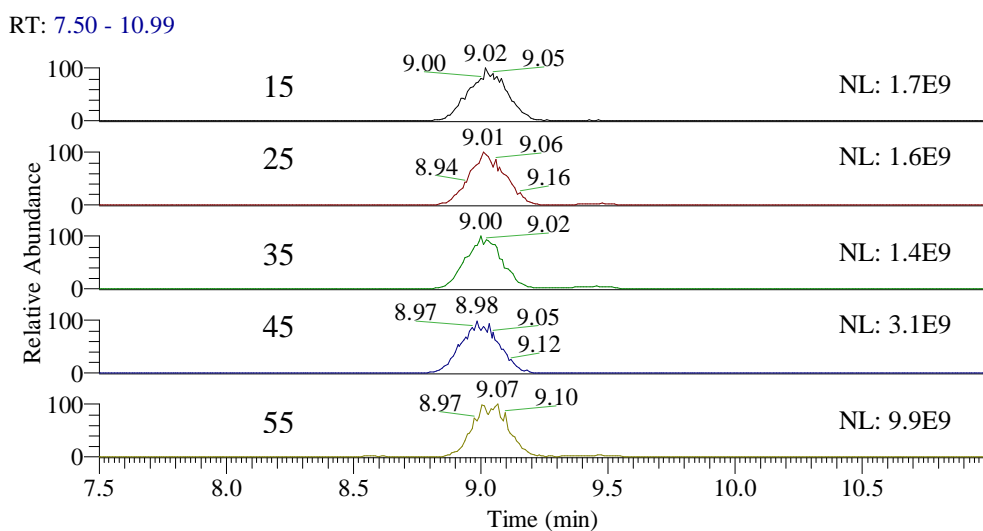
Tabulka č. 10: Hodnoty ploch píků pro karnitin

Karnitin - 2. série měření			
Ženy		Muži	
Kód	plocha píku/kreatinin* 10 ³	Kód	plocha píku/kreatinin* 10 ³
A. G. 15	98.24 ± 128.55	M. B. 15	87.75 ± 64.61
K. S. 25	165.97 ± 201.14	D. K. 25	120.04 ± 141.99
O. F. 35	145.03 ± 94.67	J. F. 35	251.48 ± 141.24
V. D. 45	151.55 ± 84.21	M. B. 45	197.00 ± 50.54
D. H. 55	344.68 ± 284.58	J. H. 55	356.90 ± 108.20

Obrázek č. 32: Chromatogramy pro alanin - ženy



Obrázek č. 33: Chromatogramy pro alanin - muži



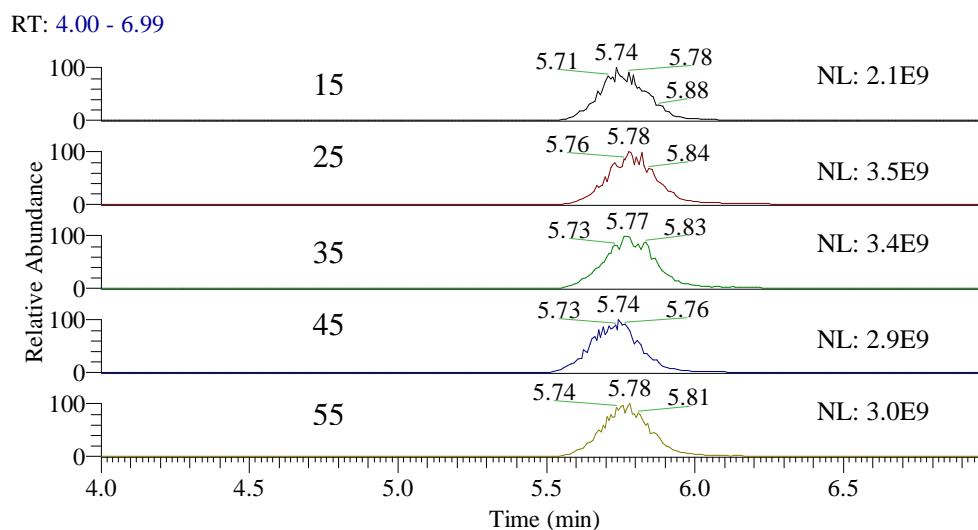
Tabulka č. 11: Hodnoty ploch píků pro alanin

Alanin - 2. série měření

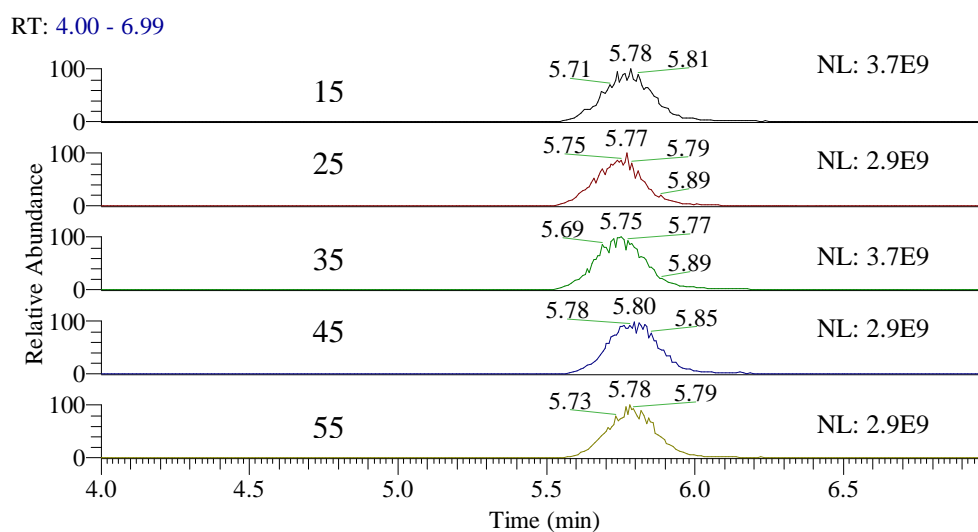
Ženy		Muži	
Kód	plocha píku/kreatinin* 10 ³	Kód	plocha píku/kreatinin* 10 ³
T. V. 15	6.14 ± 2.79	T. J. 15	3.63 ± 1.32
L. L. 25	4.00 ± 4.15	D. K. 25	3.29 ± 2.26
O. F. 35	2.91 ± 0.79	M. M. 35	2.98 ± 1.94
D. G. 45	5.87 ± 5.42	A. B. 45	6.42 ± 3.56
J. N. 55	5.25 ± 6.84	J. H. 55	2.66 ± 1.18

Příloha č.3: Výsledky ze třetí série měření

Obrázek č. 34: Chromatogramy pro kreatinin - ženy



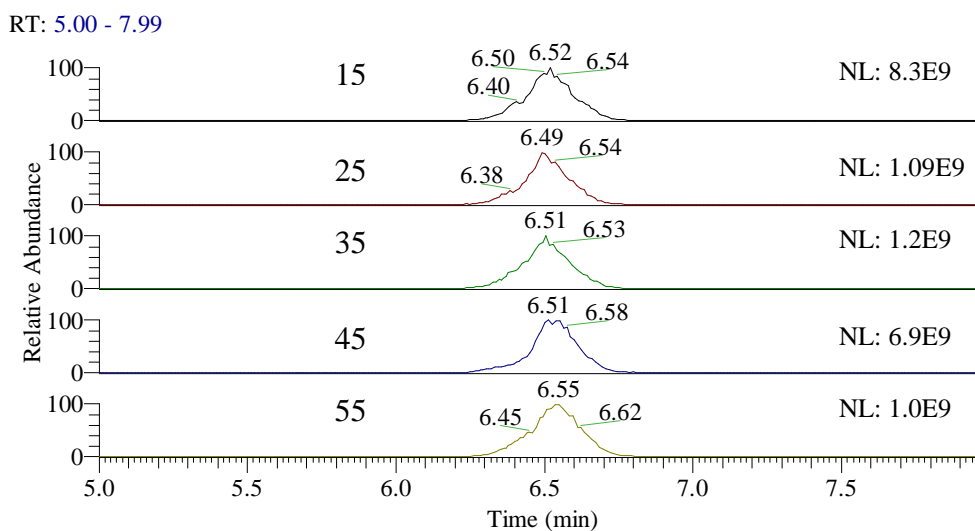
Obrázek č. 35: Chromatogramy pro kreatinin - muži



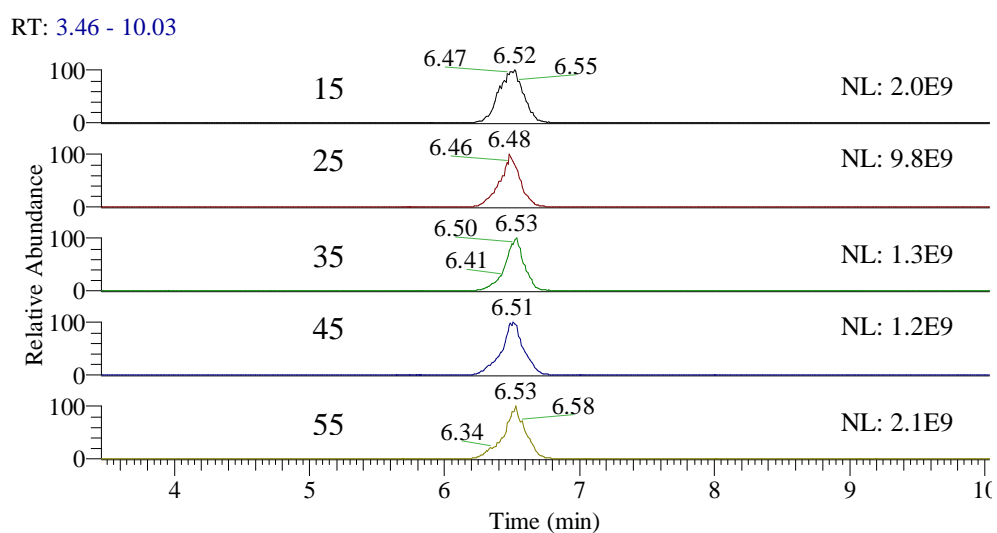
Tabulka č. 12: Hodnoty ploch píků pro kreatinin

Kreatinin - 3. série měření			
Ženy		Muži	
Kód	plocha píku * 10 ⁻⁹	Kód	plocha píku * 10 ⁻⁹
I. F. 15	24.38 ± 11.48	M. B.15	42.13 ± 5.27
E. H. 25	37.88 ± 3.12	T. K. 25	31.02 ± 8.54
L. K. 35	39.83 ± 6.37	M. M. 35	41.22 ± 5.86
R. N. 45	32.91 ± 8.66	M. B. 45	34.34 ± 8.99
L. F. 55	34.00 ± 5.88	J. H. 55	32.46 ± 5.37

Obrázek č. 36: Chromatogramy pro acetylkarnitin - ženy



Obrázek č. 37: Chromatogramy pro acetylkarnitin - muži

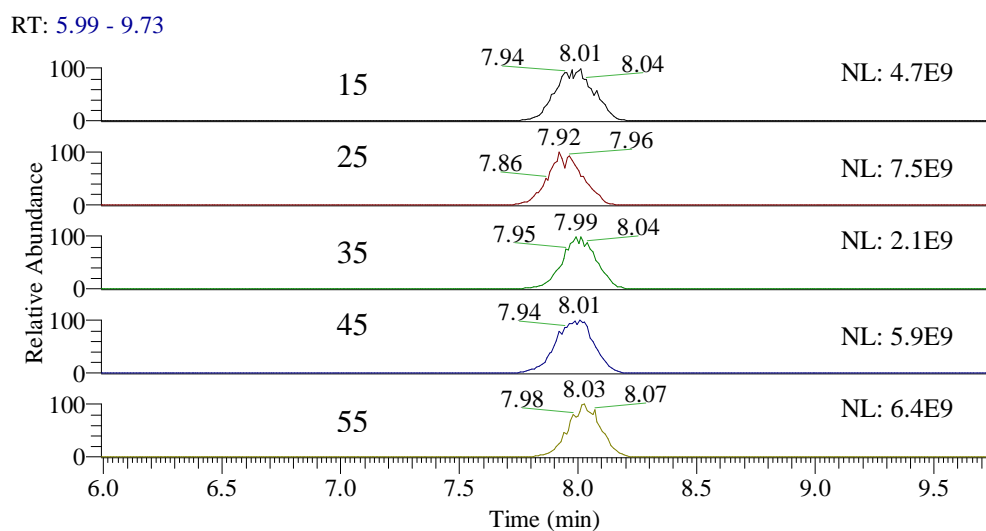


Tabulka č. 13: Hodnoty ploch píků pro acetylkarnitin

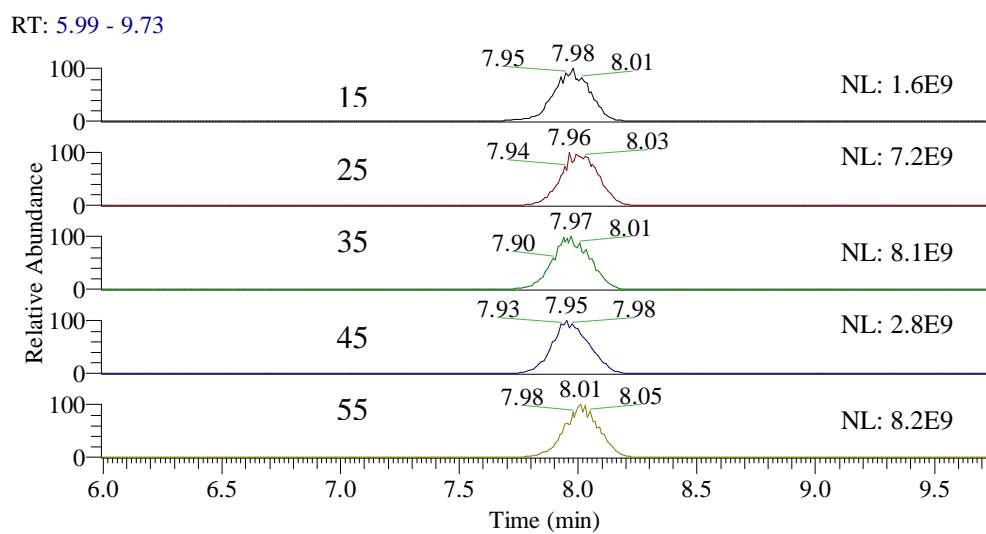
Acetylkarnitin - 3. série měření

Ženy		Muži	
Kód	plocha píku/kreatinin* 10 ³	Kód	plocha píku/kreatinin* 10 ³
A. G. 15	26.74 ± 14.59	J. P. 15	7.36 ± 7.91
L. M. 25	28.53 ± 21.17	R. M. 25	36.92 ± 25.83
E. H. 35	13.15 ± 10.88	J. H. 35	33.77 ± 24.68
M. M. 45	58.70 ± 19.89	R. M. 45	33.68 ± 23.02
D. H. 55	49.39 ± 42.84	L. M. 55	66.41 ± 17.00

Obrázek č. 38: Chromatogramy pro karnitin - ženy



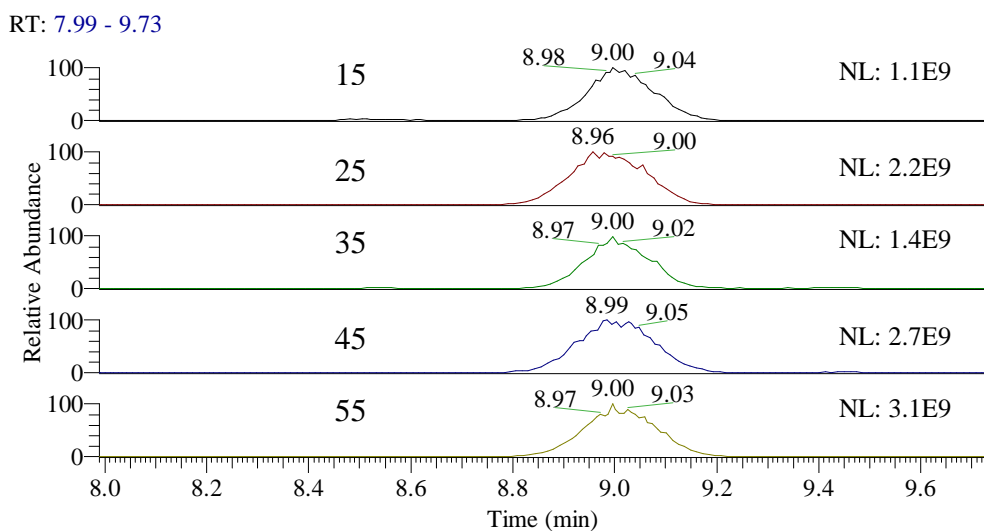
Obrázek č. 39: Chromatogramy s hmotnostním spektrem pro karnitin - muži



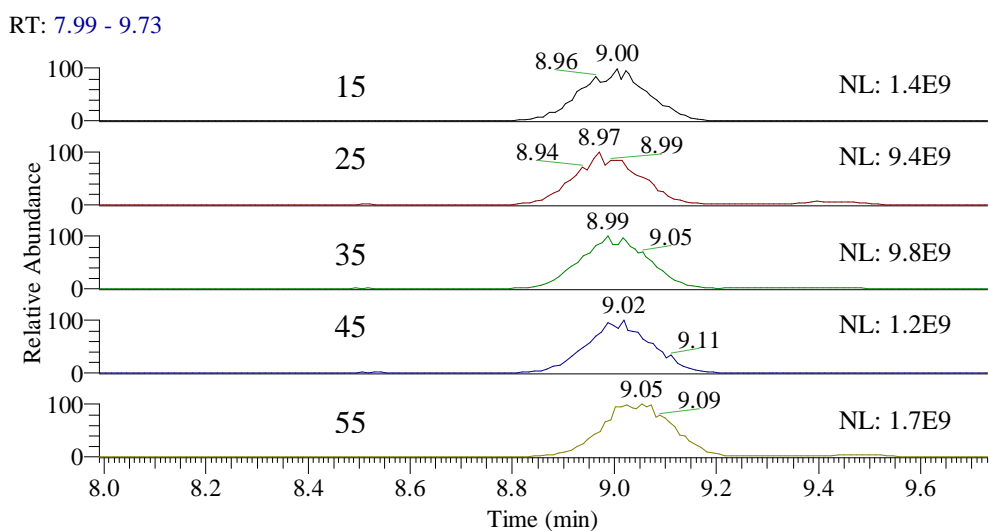
Tabulka č. 14: Hodnoty ploch píků pro karnitin

Karnitin - 3. série měření			
Ženy		Muži	
Kód	Plocha píku/kreatinin* 10 ³	Kód	Plocha píku/kreatinin* 10 ³
A. G. 15	133.47 ± 106.02	M. Be. 15	37.35 ± 45.30
L. M. 25	185.12 ± 136.94	L. S. 25	179.81 ± 75.52
R. D. 35	72.92 ± 46.74	L. F. 35	257.07 ± 184.47
D. G. 45	190.38 ± 100.87	A. S. 45	177.81 ± 139.99
I. Š. 55	163.89 ± 153.70	J. H. 55	251.56 ± 85.06

Obrázek č. 40: Chromatogramy pro alanin - ženy



Obrázek č. 41: Chromatogramy pro alanin - muži



Tabulka č. 15: Hodnoty ploch píků pro alanin

Alanin - 3. série měření

Ženy		Muži	
Kód	plocha píku/kreatinin* 10 ³	Kód	plocha píku/kreatinin* 10 ³
A. G. 15	2.59 ± 0.64	M. Be. 15	3.00 ± 0.83
L. Š. 25	5.47 ± 5.34	T. K. 25	2.67 ± 0.88
R. D. 35	4.06 ± 6.31	L. F. 35	2.68 ± 4.11
R. N. 45	8.58 ± 9.32	A. B. 45	3.13 ± 1.39
L. F. 55	8.64 ± 4.90	L. S. 55	4.33 ± 1.25