

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Vliv pH na aktivitu ureasy pro GC/MS
metabolomiku lidské moči**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Eliška Ivanovová
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Jaroslava Jáčová
Termín odevzdání práce:	2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Eliška Ivanovová
Název práce	Vliv pH na aktivitu ureasy pro GC/MS metabolomiku lidské moči
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	RNDr. Jaroslava Jáčová
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	<p>Močovina, nejhojnější složka močové matrice, interferuje GC/MS analýze moči, a proto je nezbytné ji před analýzou odstranit. Tradičně se za tímto účelem používá kyselá extrakce do organického rozpouštědla. Alternativní přístup využívá enzymu ureasy. Cílem práce je porovnání obou přístupů přípravy vzorku a stanovení vlivu přítomnosti aditiv (CO₂ a HCl) na aktivitu ureasy. Zatímco extrakční protokol významně mění metabolom moči, ureasa pouze odstraní močovinu. Odstranění močoviny však není úplné a reprodukovatelné. Aplikace CO₂ v průběhu ureasové reakce umožní úplné odstranění močoviny ze všech vzorků. Má však negativní dopad na analytickou variabilitu ostatních metabolitů. Okyselení vzorků pomocí HCl (6 M) umožnilo depleci močoviny bez změny metabolomu, ale pouze v jediném případě. Při pokusu o zopakování experimentu došlo k denaturaci enzymu. Aplikace méně koncentrované HCl (1 M) nabízí slibné řešení tohoto problému.</p>
Klíčová slova	metabolomika, moč, močovina, ureasa, plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
Počet stran	45
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Eliška Ivanovová
Title of thesis	The impact of pH on urease activity for GC/MS based human urine metabolomics
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	RNDr. Jaroslava Jáčová
The year of presentation	2018
Abstract	<p>Urea, the most abundant component of a urinary matrix, interferes the GC/MS analysis of the urine sample. Therefore, it is removed by liquid-liquid extraction or treatment by urease prior the analysis. The aim of the work is to compare both above mentioned sample preparation approaches and to evaluate the impact of the presence of additives (CO₂, HCl) on the urease activity. While extraction protocol significantly alters the urinary metabolome, urease specifically removes just the urea. Presence of CO₂ in the urease reaction enables total depletion of urea in all samples, but it increases the analytical variability of metabolites. Usage of HCl (6 M) allowed complete urea removal with no impact on the metabolome, however in another experiment it caused the denaturation of the enzyme. Application of 1M HCl offers solution of this problem.</p>
Keywords	metabolomics, urine, urea, urease, gas chromatograph/mass spectrometry
Number of pages	45
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Jaroslavy Jáčové za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucí své bakalářské práce RNDr. Jaroslavě Jáčové za odborné rady a pomoc při práci v laboratoři, trpělivost a vstřícné jednání. Děkuji rovněž za ochotu a čas, který mi v průběhu zpracování práce věnovala.

Mé poděkování patří též prof. RNDr. Tomáši Adamovi, Ph.D. za odborné rady a doc. RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D., Ing. Vojtěchu Bekárkovi a Mgr. Kateřině Mičové, Ph.D. za ochotnou pomoc v laboratoři a pomoc při vyhodnocování výsledků.

V neposlední řadě děkuji za podporu při studiu své rodině a přátelům.

Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod a cíle práce	9
2 Teoretická část	11
2.1 Metabolom lidské moči	11
2.1.1 Tvorba moči	11
2.1.2 Vznik a funkce močoviny	11
2.1.3 Diagnostika moči	12
2.2 Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS).....	13
2.2.1 Charakteristika metody	14
2.3 Příprava vzorku k analýze	15
2.3.1 Odstranění močoviny	15
2.3.2 Derivatizace	16
2.4 Ureasa	17
2.5 Pufrační systémy.....	19
3 Experimentální část	20
3.1 Přístrojové vybavení	20
3.1.1 Experimentální podmínky metody GC/MS	21
3.2 Chemikálie.....	21
3.3 Příprava vzorků metodou využívající ureasu	22
3.3.1 Příprava vzorku moči (pro sledování změny pH během ureasové reakce).....	22
3.3.2 Příprava ředící řady standardu močoviny	22
3.3.3 Příprava vzorku standardu močoviny bez ureasy	22
3.3.4 Příprava vzorku standardu močoviny s ureasou	23
3.3.5 Příprava vzorku standardu močoviny s ureasou a CO ₂	23
3.3.6 Příprava vzorku SKML s ureasou a CO ₂	23
3.3.7 Příprava vzorku standardu močoviny (sledování změny pH během ureasové reakce s 6M HCl)	23

3.3.8	Příprava vzorku standardu močoviny s ureasou a HCl (6 M).....	24
3.3.9	Příprava vzorku SKML s ureasou a HCl (6 M)	24
3.3.10	Příprava vzorku standardu močoviny pro stanovení vlivu přítomnosti HCl (6 M, 1 M, 0,1 M) na aktivitu ureasy	24
3.3.11	Jednokroková derivatizace u vzorků standardu močoviny.....	25
3.3.12	Dvoukroková derivatizace u vzorků SKML.....	25
3.4	Příprava vzorku metodou kyselé extrakce do organického rozpouštědla.....	25
4	Výsledky a diskuze	26
4.1	Extrakce kyselin do organického rozpouštědla (LLE)	26
4.2	Stanovení reprodukovatelnosti odstranění močoviny ve vzorcích moči	26
4.3	Stanovení vlivu přítomnosti pufrujících systémů/kyselin na aktivitu ureasy.....	30
4.3.1	Změny pH vzorku moči během ureasové reakce	31
4.3.2	Změny pH standardu močoviny během ureasové reakce	31
4.3.3	Změny pH standardu močoviny během ureasové reakce s CO ₂	32
4.3.4	Stanovení vlivu přítomnosti CO ₂ na aktivitu ureasy ve vzorcích standardu močoviny.....	33
4.3.5	Stanovení vlivu přítomnosti CO ₂ na aktivitu ureasy ve vzorcích SKML.....	34
4.3.6	Vliv přítomnosti HCl (6 M) na aktivitu ureasy.....	35
4.3.7	Stanovení vlivu přítomnosti HCl (6 M) na aktivitu ureasy ve vzorcích standardu močoviny	37
4.3.8	Vliv přítomnosti HCl (6 M, 1 M, 0,1 M) na aktivitu ureasy.....	38
4.4	Srovnání ureasového protokolu s metodou kyselé extrakce do organického rozpouštědla.....	39
5	Závěr	41
6	Literatura	42

Seznam zkratek

BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
IS	interní standard
LC/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LLE	extrakce kapalina-kapalina
MS	hmotnostní spektrometr
NT	vzorek bez ureasy
SKML	standardní kontrolní materiál na bázi lidské moči
SPE	extrakce na tuhou fázi
TMCS	trimethylchlorsilan
TMS	trimethylsilylová skupina
UAT	vzorek ošetřený ureasou a HCl
UOT	vzorek ošetřený ureasou a CO ₂
UT	vzorek ošetřený ureasou

1 Úvod a cíle práce

Metabolomika je věda zabývající se studiem metabolomu, jakožto souboru všech metabolitů, na všech hladinách biologického systému – na úrovni organismu, tkáně i jediné buňky (Musilová and Glatz, 2011). Díky svému snadnému odběru a specifickému složení je pro studium metabolomu často užívána lidská moč. Významnou složku moči tvoří odpadní látky z krevního řečiště. Ty mohou být potencionálními markery onemocnění, a proto je v medicíně analýza močového metabolomu zcela nepostradatelná (Bouatra *et al.*, 2013).

Metabolom je odrazem molekulárního fenotypu, jelikož svým složením odráží okamžitý stav organismu (Bujak *et al.*, 2015). Hladina metabolitů není pouze odpověď genové exprese, ale i environmentálního a vývojového stimulu nebo důsledek genetické mutace. Metabolity jsou látky s molekulovou hmotností menší než 1000 Da mající různou chemickou strukturu. Ta udává jejich fyzikálně-chemické vlastnosti vyplývající z přítomnosti funkčních skupin (Musilová and Glatz, 2011). Dvě látky o stejné molekulové hmotnosti se mohou lišit prostorovým uspořádáním atomů a vytvářet tak izomery s různou biologickou aktivitou (Plíhalová *et al.*, 2017). Kromě prostorového uspořádání atomů se látky mohou lišit stavbou uhlíkatého řetězce, polohou násobných vazeb nebo polohou substituentů. V případě keto-enol tautomerie látka střídá dvě formy konstituce přesunem vodíkového atomu a dvojných vazeb dle vlastností prostředí (Dostál *et al.*, 2005). Diagnosticky významným biomarkerem je pouze jedna z forem. Typickým příkladem je keto-enol tautomerie 2-oxoglutarátu a 2-hydroxyglutarátu. Oba metabolity jsou přirozeně přítomny v lidské moči. Zatímco zvýšená hladina 2-oxoglutarátu není diagnosticky významná, zvýšená koncentrace 2-hydroxyglutarátu bývá známkou např. 2-hydroxyglutarové acidurie (Kranendijk *et al.*, 2010). Nesprávné rozlišení forem může způsobit chybnou diagnostiku onemocnění.

Metabolity se v moči mohou vyskytovat v širokém rozmezí koncentrací (až 11 řádů) (Bouatra *et al.*, 2013). Nelze však říci, že čím vyšší je koncentrace daného metabolitu v biologickém materiálu, tím je diagnosticky významnější. Naopak, někdy i stopy neobvyklého metabolitu mohou značit významný patofyziologický proces. Příkladem je exkrece 3-hydroxyglutarátu, významného metabotoxinu a acidogenu, který bývá přítomen (často ve stopovém množství, např. 3 $\mu\text{mol/l}$) výhradně v moči jedinců trpících glutarovou acidurií (Pöge *et al.*, 1997). Oproti tomu močovina, konečný produkt metabolismu bílkovin, je fyziologicky přítomna v moči všech jedinců v koncentraci v rozmezí 167 – 390 mmol/l (Brodská, 2005). Většinou není diagnosticky významná a je hlavní složkou matrice.

Tato charakteristika metabolitů představuje jejich komplexnost, z čehož vyplývá náročnost jejich analýzy. Zásadní je individuální přístup při přípravě vzorku a výběru analytické metody dle toho, co je cílem stanovení. Pro identifikaci a kvantifikaci analytů se uplatňují metody s vysokou citlivostí detekce a separační účinností. Jednou z metod s vysokou rozlišovací schopností, která se využívá při analýze metabolomu lidské moči, je plynová chromatografie spojená s hmotnostní spektrometrií (GC/MS) (Musilová and Glatz, 2011).

Před analýzou se metabolity upravují pomocí derivatizace, aby byly těkavé a zároveň termostabilní (Musilová and Glatz, 2011). Močovina ale výrazně zvyšuje spotřebu derivatizačního činidla, a proto nejsou ostatní metabolity dostatečně nebo vůbec derivatizovány. Před analýzou moči je proto nezbytné močovinu odstranit (Webb-Robertson *et al.*, 2014). K odstranění močoviny jsou v současné době využívány dva hlavní přístupy. První z nich využívá ureasu, zatímco druhý využívá extrakci do organického rozpouštědla (ethylacetát, ether), do kterého se močovina jako polární látka téměř neextrahuje (Tanaka *et al.*, 1980; Webb-Robertson *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016).

V této práci byla při přípravě vzorků pro GC/MS analýzu využita ureasa, která rozkládá močovinu, přičemž konečnými produkty rozkladu je amoniak a oxid uhličitý (Danial, Hamza and Mahmoud, 2015). Uvolňující se amoniak však výrazně alkalizuje vzorek, čímž ovlivňuje aktivitu ureasy (Krajewska, 2009b). Optimální pH ureasy se pohybuje kolem hodnoty 7,0 – 7,5, při pH 9 se ureasa stává neaktivní a nestabilní, není už schopna odstranit více močoviny ze vzorku (Krajewska, 2009a; Danial, Hamza and Mahmoud, 2015). Proto je močovina z některých vzorků odstraněna jen částečně. Udržení optimálního pH ve vzorcích ošetřených ureasou by mohlo výrazně zlepšit GC/MS analýzu vzorků moči, a tím i diagnostiku některých onemocnění.

Součástí práce je literární rešerše na téma využití ureasy k přípravě vzorků moči pro GC/MS analýzu metabolomu, vlivu pH na aktivitu ureasy a tím i množství močoviny zůstávající ve vzorku po ošetření ureasou. Cílem práce je stanovení vlivu přítomnosti kyselin, případně pufrujících systémů, na aktivitu ureasy a srovnání ureasového protokolu s dříve užívanou metodou kyselé extrakce do organického rozpouštědla.

2 Teoretická část

2.1 Metabolom lidské moči

Moč je odpadní produkt savců vylučovaný ledvinami (Bouatra *et al.*, 2013). Při diagnostice onemocnění je právě moč často užívaným materiálem díky své snadné dostupnosti, neinvazivnímu odběru a unikátnímu chemickému složení v porovnání s ostatními tělními tekutinami (Webb-Robertson *et al.*, 2014). Moč umožňuje jednoduchou kontrolu stavu pacienta zahrnující sledování odpovědi na léčbu pomocí analýz založených na různých technikách (Zhang *et al.*, 2012).

Moč je typicky jantarově zbarvena, což je dáno přítomností urobilinu, produktem rozpadu červeného krevního barviva hemoglobinu. Ten tvoří společně s dalšími odpadními látkami metabolom moči specifického složení. Obsahuje odpadní látky z krevního řečiště, močovinu, anorganické soli, kreatinin, amoniak, organické kyseliny, toxiny a produkty metabolické dráhy hemoglobinu, a to v širokém rozmezí koncentrací (Bouatra *et al.*, 2013). Avšak komplexnost chemického složení metabolomu ztěžuje přípravu vzorku pro analýzu a komplikuje tak diagnostiku onemocnění (Musilová and Glatz, 2011).

2.1.1 Tvorba moči

Moč je u savců vytvářena ledvinami, párovým orgánem, který spolu s dalšími orgány lidského těla zajišťuje homeostázu, stabilitu vnitřního prostředí, která je nezbytná pro správnou funkci celého organismu (Bernášková and Rokyta, 2016). Příjem a výdej látek není vždy stabilní, a proto je nutné, aby ledviny regulovaly vylučování vody s obsaženými ionty a látkami, a tak udržovaly stálé vnitřní prostředí. V závislosti na aktuálním stavu organismu se z primární moči resorbují různá množství látek a vody, a proto je definitivní moč pokaždé jinak koncentrovaná (Kittnar and Pokorný, 2009). Avšak ne všechny látky primární moči podstupují zpětnou resorpci, z čehož vyplývá, že některé látky jsou v definitivní moči obsaženy stabilně. Typický je kreatinin, konečný produkt metabolismu kreatinfosfátu nacházejícího se ve svalech, jehož odbourávání a vylučování probíhá konstantní rychlostí, což je žádoucí parametr pro úpravu koncentrace moči (Bader, Messerer and Will, 2013).

2.1.2 Vznik a funkce močovin

Lidskou stravu tvoří tři základní chemické látky – sacharidy, proteiny a tuky. Tyto živiny jsou pro lidské tělo významným zdrojem energie a důležitých stavebních látek. V trávicím traktu dochází k rozkladu těchto složitých biomolekul na základní stavební jednotky,

jejichž malá velikost je vyhovující pro jejich nezbytné vstřebávání do extracelulárních tekutin (Pokorný, 2009).

Proteiny jsou rozloženy v trávicím traktu pomocí proteolytických enzymů na peptidy nestejných velikostí, které jsou následně rozštěpeny pomocí aminopeptidas na proteinogenní aminokyseliny. Vzniklé aminokyseliny se z trávicího traktu přesouvají do enterocytů střev, odkud se vstřebávají do krve a následně podstupují dekarboxylaci, deaminaci či transaminaci. Vzniklé produkty vstupují do Krebsova a močovinového cyklu. Při dekarboxylaci ztrácí aminokyselina oxid uhličitý ze své karboxylové skupiny a mění se tak na amin. Při deaminaci se z aminu uvolňuje amoniak za vzniku oxosloučeniny. Tělu škodlivý amoniak je spolu s oxidem uhličitým přeměněn prostřednictvím močovinového cyklu na močovinu, která už oproti toxickému amoniaku není tělu škodlivá (Pelouch, 2005). Močovina, jakožto malá nenabitá polární molekula, prochází skrze biologické membrány (Koolman and Röhm, 2005) a je vylučována močí jako odpadní produkt (Racek *et al.*, 2006).

Dle koncentrace močoviny, konečného metabolitu bílkovin v moči, lze zjistit množství bílkovin a vody přijatých organismem. Optimální koncentrace močoviny v moči se pohybuje v rozmezí 167 – 390 mmol/l (Brodská, 2005). Při diagnostice močového metabolomu metodou GC/MS je vysoká koncentrace močoviny nežádoucí (Webb-Robertson *et al.*, 2014). Přítomnost vysoké koncentrace močoviny výrazně ovlivňuje analýzu moči, zejména u technik založených na plynové chromatografii. Močovina, přítomná v moči ve vysoké koncentraci, přetěžuje kolonu a tím zhoršuje separaci (Dettmer, Aronov and Hammock, 2007). Metabolity elující v retenčním okně močoviny jsou často píkem močoviny zcela překryty nebo mají jiný retenční čas. Při přípravě vzorku močovina nadměrně spotřebovává derivatizační činidlo, a proto jsou ostatní metabolity derivatizovány jen z části nebo vůbec (Webb-Robertson *et al.*, 2014). Analyty pak tvoří více derivatizačních produktů, čímž se výrazně zvyšuje limit detekce. Neúplně derivatizované látky snižují životnost kolony. Pro zabránění těchto jevů se před analýzou vzorek moči upravuje extrakcí do organického rozpouštědla nebo ureasou, která při optimálním pH způsobuje hydrolytický rozklad močoviny (Krajewska, 2009a; Webb-Robertson *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2016).

2.1.3 Diagnostika moči

Počátek diagnostiky moči sahá až do starověku. Diagnostika se v tehdejší době určovala pomocí urinoskopie zkoumající vzhled a vlastnosti moče - barvu, zákal, zápach a dokonce její chuť (Bouatra *et al.*, 2013).

V současné době se provádí jak kvalitativní, tak kvantitativní analýza moči využívající fyzikálně-chemické a mikroskopické metody (Kubač, 2005; Bouatra *et al.*, 2013). Základní analýzou se zjišťuje přítomnost a koncentrace glukosy, bílkovin, ketolátek, bilirubinu, urobilinogenu, dusičnanů, leukocytárních esterů a krve v moči (Bouatra *et al.*, 2013).

Speciální vyšetření založená zejména na chromatografických technikách zjišťují aktuální stav pacienta prostřednictvím analýzy celé řady metabolitů, a to jak endogenního, tak exogenního původu. Metabolity moči lze na základě podobných vlastností rozdělit do několika skupin. Jedná se o skupiny látek polárních, těkavých, organických a žlučových kyselin (Bouatra *et al.*, 2013).

Při diagnostice moči se využívá především metoda GC/MS a metoda kapalinové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (LC/MS). Pomocí metody GC/MS lze identifikovat až 179 metabolitů, z čehož 85 z nich lze kvantifikovat (Bouatra *et al.*, 2013). Tato metoda se hojně využívá pro analýzu organických kyselin.

Avšak některé metabolity v moči se nachází v příliš nízkých koncentracích, nebo jsou i přes derivatizaci termolabilní či je nelze převést na plyn. Pro jejich analýzu se proto využívá metoda LC/MS vyznačující se vysokou citlivostí. Analýza metabolitů touto metodou je jednodušší, neboť vzorky nemusí být derivatizovány (Bujak *et al.*, 2015).

Výsledkem chromatografické analýzy vzorku moči je chromatogram, v němž jsou vyneseny eluční křivky (píky představující jednotlivé metabolity) v závislosti na čase analýzy (tzv. retenční čas) (Klouda, 2003). Metabolity jsou identifikovány dle hmotnostního spektra a retenčního času (kvalitativní analýza). Plocha píku představuje intenzitu signálu, která je přímo úměrná množství metabolitu obsaženého ve vzorku (kvantitativní analýza) (Klouda, 2003; Sánchez-Guijo, Hartmann and Wudy, 2013). Koncentrace metabolitu ve vzorku se nejčastěji stanovuje porovnáním plochy jeho píku s plochou píku interního standardu (IS) o známé koncentraci (Sánchez-Guijo, Hartmann and Wudy, 2013).

Nalezené koncentrace metabolitů jsou porovnány s referenčními hodnotami, přičemž odchylka od fyziologické hodnoty značí patologický stav. Hodnoty referenčních mezí bývají vztaženy ke konkrétní koncentraci kreatininu v moči (1 mmol/l), čímž se koncentrace metabolitů ve vzorcích jednoduše vyhodnocuje a porovnává (Rinaldo, 2008).

2.2 Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS)

Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií je analytická metoda vyznačující se vysokou rozlišovací schopností specifických nízkomolekulárních strukturně podobných

látek a zároveň vysokou detekční schopností hmotnostní spektrometrie (Sánchez-Guijo, Hartmann and Wudy, 2013).

Tato metoda umožňuje kvalitativní a kvantitativní analýzu termostabilních látek s molekulovou hmotností do 1000 Da s vhodným tlakem syté páry nutným pro přeměnu v plyn (Klouda, 2003) nebo látek, které lze chemickou reakcí (tzv. derivatizací) na takové látky přeměnit (Dettmer, Aronov and Hammock, 2007). Zároveň dokáže rozlišit látky stejné molekulové hmotnosti lišící se pouze svou konstitucí, zvané izomery (Dostál *et al.*, 2005; Webb-Robertson *et al.*, 2014).

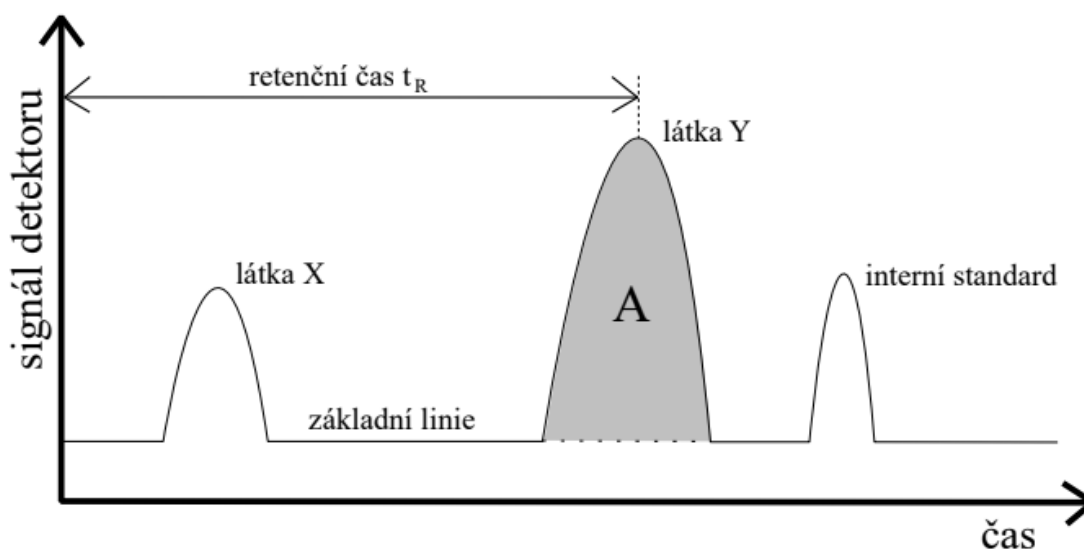
2.2.1 Charakteristika metody

Plynová chromatografie je separační metoda, při které se složky obsažené ve vzorku rozdělují mezi dvě nemísitelné fáze – stacionární a mobilní (Klouda, 2003). Stacionární fáze je nepohyblivá a je tvořena látkou, která je v tenké vrstvě nanесena na vnitřní stěnu křemenné kapiláry (chromatografická kolona), zatímco mobilní fáze je pohyblivá a utváří ji nosný plyn (Klouda, 2003; Ševčík *et al.*, 2004).

Vzorek je vnesen (nastříknut) do vyhřívané nástřikové komory (inletu), kde jsou analyty převedeny na plynné skupenství a nosným plynem unášeny do kolony (Sánchez-Guijo, Hartmann and Wudy, 2013). Jednotlivé analyty různým způsobem interagují se stacionární fází, zachycují se na koloně a po určitém čase ji opouští (Klouda, 2003). Míra interakce je dána fyzikálně-chemickými vlastnostmi analytu (afinitou ke stacionární fázi) a teplotou (Sánchez-Guijo, Hartmann and Wudy, 2013). Každý analyt setrvává v koloně různě dlouhou dobu (retenční čas) (Skoog, Holler and Nieman, 1998). Látky postupně opouštějí kolonu a vstupují do detektoru, který zaznamenává signály v podobě elučních křivek. Vzniklý chromatogram (Obr. 1) poskytuje informaci o retenčním čase a intenzitě odezvy daného analytu vyhodnocovacímu zařízení. Retenční čas představuje údaj o druhu analytu a plocha křivky udává intenzitu signálu znázorňující jeho kvantitu (Klouda, 2003).

V plynové chromatografii funkci detektoru často plní hmotnostní spektrometr (MS), který umožňuje jak určení koncentrace, tak i struktury látky vystupující z kolony chromatografu. Analyty jsou v iontovém zdroji hmotnostního spektrometru převedeny na ionty a hmotnostním analyzátozem separovány podle poměru hmotnosti a náboje (m/z) (Sánchez-Guijo, Hartmann and Wudy, 2013). Druh (m/z) a intenzita iontů je zaznamenána detektorem (Klouda, 2003). Správný chod MS zajišťuje vakuum, které zabraňuje srážkám

iontů s molekulami vzduchu, a vysoká teplota, díky níž nedochází ke kondenzaci analytů (Sánchez-Guijo, Hartmann and Wudy, 2013).



Obr. 1: Schéma chromatogramu s třemi elučními křivkami látky X, látky Y a interního standardu, kde A je plocha křivky.

2.3 Příprava vzorku k analýze

2.3.1 Odstranění močoviny

Močovina je v moči obsažena ve vysoké koncentraci, což značně komplikuje GC/MS analýzu (kapitola 2.1.2) (Dettmer, Aronov and Hammock, 2007). Proto je nezbytné ji před analýzou ze vzorku odstranit (Webb-Robertson *et al.*, 2014). Eliminaci lze provést třemi různými způsoby (Chalmers and Lawson, 1982; Webb-Robertson *et al.*, 2014).

Tradičně se využívá metoda extrakce z kapaliny do kapaliny (LLE, liquid-liquid extraction), tedy extrakce organických kyselin do organického rozpouštědla, do kterého se močovina jako polární látka téměř neextrahuje (Tanaka *et al.*, 1980). Nejčastěji využívaná rozpouštědla jsou diethylether a ethylacetát. Výběr rozpouštědla ovlivňuje, které kyseliny budou ze vzorku extrahovány. Diethylether poskytuje extrakci spíše hydrofobních kyselin, zatímco ethylacetát extrahuje převážně hydrofilní kyseliny. Toto způsobuje zvýhodnění extrakce jedné skupiny organických kyselin nad druhou skupinou s rozdílnou polaritou (Chalmers and Lawson, 1982). Účinnost extrakce kyselin s vyšší polaritou je nižší (Liu *et al.*, 2004). Navíc nedostatečná čistota rozpouštědla a pH vzorku negativně ovlivňuje extrakci, neboť se do rozpouštědla mohou extrahovat kromě organických kyselin bazické a neutrální látky (Chalmers and Lawson, 1982). Nedostatečně eliminovaná močovina následně ovlivňuje analýzu, neboť její eluční křivka může maskovat eluční křivku organické

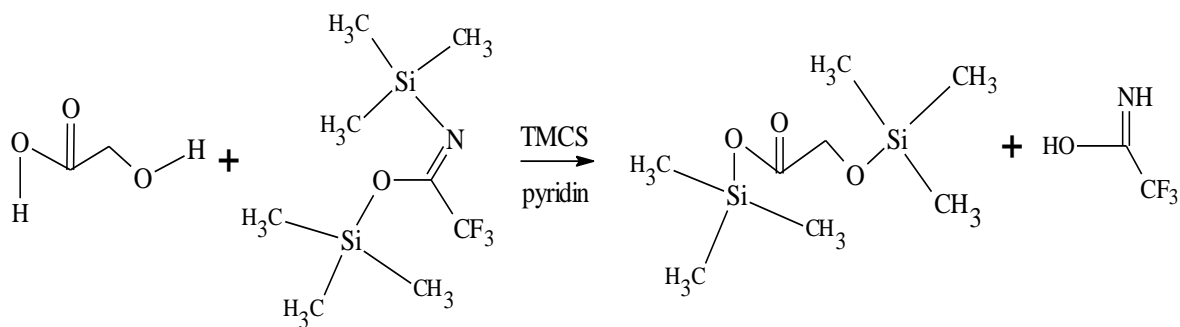
kyseliny nebo může způsobovat posun retenčních časů kyselin (Kumari *et al.*, 2016) a metabolom výrazně zkresluje variabilní extrakční účinnost.

Další metodou je extrakce z kapaliny na tuhou fázi (SPE, solid-phase extraction). Stacionární fáze SPE kolony k sobě poutá analyty ze vzorku, které jsou uvolněny vhodným elučním rozpouštědlem. Pro eluci organických kyselin se do kolony aplikuje 5% kyselina mravenčí v methanolu (Liu *et al.*, 2004). Tuto metodu charakterizuje vyšší extrakční účinnost oproti metodě LLE (Liu *et al.*, 2004; Kumari *et al.*, 2016). Metodou SPE se do rozpouštědla extrahuje méně močoviny, a proto není interference analýzy natolik vysoká. Tento přístup poskytuje rychlou, citlivou a efektivní separaci organických kyselin ze vzorku za spotřeby malého množství rozpouštědla (Kumari *et al.*, 2016).

Alternativní přístup představuje ošetření vzorku ureasou, hydrolytickým enzymem, který katalyzuje rozklad močoviny (Webb-Robertson *et al.*, 2014). Vznikající amoniak výrazně alkalizuje roztok moči, přičemž ureasa přestává být aktivní a proto je močovina odstraněna jen částečně (Krajewska, 2009b; Danial, Hamza and Mahmoud, 2015). Vhodný výběr pufrčního systému by ale mohl přispět k udržení pH optima, při kterém je ureasa aktivní (Howell and Sumner, 1934).

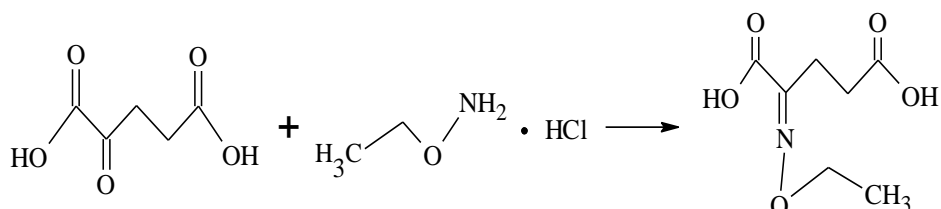
2.3.2 Derivatizace

Většina biologických vzorků (s výjimkou dechu) nemá plynné skupenství, proto je před GC/MS analýzou nezbytné je na plyn převést (Musilová and Glatz, 2011). Tento proces, při němž se zároveň zlepšuje i teplotní stabilita analyzovaných látek, se nazývá derivatizace. Používá se k němu různých derivatizačních činidel (Dettmer, Aronov and Hammock, 2007). Velmi častá je aplikace trojice činidel N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamidu (BSTFA), trimethylchlorsilanu (TMCS) a pyridinu, pomocí kterých dochází k trimethylsilylaci. Při této reakci je aktivní vodík karboxylové, hydroxylové, thiolové, aminové a iminové skupiny nahrazen trimethylsilylovou (TMS) skupinou (Obr. 2) (Dettmer, Aronov and Hammock, 2007; Orata, 2012). Za průběh reakce odpovídá BSTFA jakožto vysoce reaktivní silylační činidlo, přičemž TMCS zvyšuje jeho reaktivitu. Pyridin je nepolární rozpouštědlo, které je nezbytné pro průběh reakce a zároveň působí jako akceptor HCl, která při reakci vzniká jako vedlejší produkt (Orata, 2012). Výsledkem je vznik těkavějších a termostabilnějších trimethylsilylových derivátů analytů, které přispívají k lepší detekci signálů vizualizovaných na hmotnostním spektru (Dettmer, Aronov and Hammock, 2007).



Obr. 2: Trimethylsilylace kyseliny glykolové pomocí činidla BSTFA za vzniku 2-TMS derivátu kyseliny glykolové.

U analýz zaměřených na stanovení organických kyselin, trimethylsilylaci často předchází oximace, protože zejména 2-oxokyseliny nejsou dostatečně stabilní (Dettmer, Aronov and Hammock, 2007; Nguyen, Lee and Paik, 2013). Podléhají keto-enol tautomerii za vzniku hydroxykyselin (Dostál *et al.*, 2005). Oximací dochází k zafixování karbonylových skupin 2-oxokyselin, čímž se zabraňuje jejich tautomerii (Obr. 3) (Dettmer, Aronov and Hammock, 2007; Webb-Robertson *et al.*, 2014). Při vyhodnocování analýzy je díky stabilizaci 2-oxokyselin jasně prokazatelné, který z izomerů je přítomen ve vzorku (Nguyen, Lee and Paik, 2013). Příkladem je odlišení 2-oxoglutarátu od 2-hydroxyglutarátu.



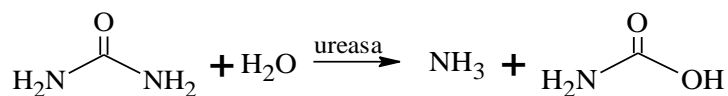
Obr. 3: Ethoximace 2-oxoglutarátu pomocí ethoxyamin hydrochloridu za vzniku ethoxyderivátu oxoglutarátu.

2.4 Ureasa

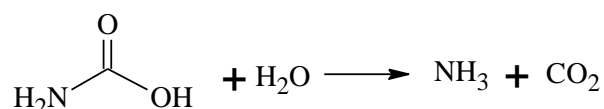
Ureasa (EC 3.5.1.5) je metaloenzym využívaný k hydrolýze amidů močoviny. Existuje řada typů ureasy, a to jak rostlinného, bakteriálního nebo mykotického původu. Nejhojněji se využívá ureasa rostlinného původu, která se získává ze semen *Canavalia ensiformis* a vyrábí se v krystalické formě (Danial, Hamza and Mahmoud, 2015).

Funkcí ureasy je hydrolytický rozklad močoviny ve vodném prostředí za vzniku amoniaku a karbamátu amonného (Obr. 4), jehož katalýzou vzniká amoniak s oxidem uhličitým (Obr. 5). Výslednými produkty rozkladu jedné molekuly močoviny jsou dvě

molekuly amoniaku a jedna molekula oxidu uhličitého (Danial, Hamza and Mahmoud, 2015).



Obr. 4: Hydrolýza močoviny pomocí ureasy za vzniku amoniaku a karbamátu amonného



Obr. 5: Hydrolýza karbamátu amonného za vzniku amoniaku a oxidu uhličitého

Aktivita ureasy je udávána v enzymových jednotkách (U), přičemž 1 U vyjadřuje vznik 1 μmol amoniaku z močoviny za 1 min při pH 7 při 25 °C (Fidaleo and Lavecchia, 2003). Vznikající amoniak zvyšuje pH reakční směsi, způsobuje tak pokles aktivity ureasy, a tím i další tvorbu amoniaku (Cesareo and Langton, 1992).

Ureasa, řadící se do enzymatické třídy hydrolas, je jediný metaloenzym obsahující nikl (Dixon *et al.*, 1980). Mezi hydrolasami vyniká svou neobvykle vysokou katalytickou aktivitou a substrátovou specifitou, nicméně stejně tak není považována za enzym s absolutní specifitou (Gazolla, Blakeley and Zerner, 1973; Dixon *et al.*, 1980). Kromě močoviny a jejich derivátů hydroxymočoviny, dihydroxymočoviny, methylmočoviny, ethylmočoviny, thiomčoviny, semikarbazidu, formamidu, acetamidu, thioacetamidu, methylkarbamátu a ethylkarbamátu jsou známy jen další čtyři její substráty, a to amidát kyseliny fosforečné, diamid kyseliny fosforečné, fenylester kyseliny diaminfosforečné a triamid kyseliny fosforečné (Krajewska, 2009a; Dixon *et al.*, 1980). Všechny substráty vyjma močoviny mají exogenní původ, jsou lidskému tělu nevlastní.

Aktivita ureasy závisí na pH roztoku, přičemž pH optimum je v rozmezí 7,0 – 7,5 (Krajewska, 2009a). Při tomto pH ureasa rozkládá močovinu ve vzorku maximální rychlostí. Dojde-li ke snížení nebo zvýšení pH, její aktivita výrazně klesá (Cesareo and Langton, 1992). Při pH vyšším než 9 se ureasa stává neaktivní, není schopna pokračovat v hydrolýze močoviny (Krajewska, 2009b; Danial, Hamza and Mahmoud, 2015). Proto je močovina ze vzorku odstraněna jen částečně. Pro efektivnější rozklad močoviny ze vzorku je nezbytné udržení stálého pH, v optimu ureasy.

2.5 Pufrační systémy

Aktivita ureasy je ovlivněna jak substrátem (močovina), tak produktem reakce (amonné ionty) (Fidaleo and Lavecchia, 2003). Podle Howell and Sumner (1934), aktivita ureasy nezávisí pouze na typu použitého pufru, jeho koncentraci a pH, nýbrž také na koncentraci močoviny.

Princip udržení aktivní ureasy spočívá ve výběru správného pufru a jeho následné aplikaci tak, aby bylo udrženo optimální pH. Jelikož aktivita ureasy klesá se zvyšujícím se pH roztoku (Cesareo and Langton, 1992), úlohou pufru musí být okyselení prostředí. Proto musí být použita chemická látka kyselé povahy. Platí, že čím vyšší je koncentrace močoviny ve vzorku, tím více amoniaku jejím rozkladem může vzniknout, a proto je nutné použít pufr s dostatečnou pufrační kapacitou (Howell and Sumner, 1934).

Aktivita ureasy již byla zkoumána v přítomnosti fosfátu, citrátu a acetátu. Bylo zjištěno, že ureasa je aktivní v přítomnosti fosfátu pH 5 – 9, citrátu pH 4 – 8,5 a acetátu pH 3 – 7,5. Tyto pufrы zvyšovaly aktivitu ureasy, dokud nebylo dosaženo optimální koncentrace močoviny, při které došlo k poklesu aktivity. V přítomnosti citrátového a acetátového pufru bylo dosaženo optimální aktivity ureasy při optimálním pH již při poloviční koncentraci močoviny ve srovnání s koncentrací močoviny v přítomnosti fosfátového pufru (Howell and Sumner, 1934). Obecně lze říci, že v přítomnosti kyselejšího pufru se hodnota optimální koncentrace močoviny zvyšuje, zatímco menší množství močoviny lze zcela rozložit i při vyšším pH.

3 Experimentální část

3.1 Přístrojové vybavení

Instrumentace použitá při přípravě vzorku:

- analytické váhy AND HR 120 (BioTech)
- analyzátor Cobas 8000 (Roche)
- automatické a skleněné pipety
- centrifuga Eppendorf 5702 (Labicom)
- centrifuga Eppendorf Mini Spin (Labicom)
- diagnostické pH proužky (Undekaphan)
- digestoř (Flores Valles)
- dusík (Messer)
- generátor dusíku Mistral (Applied Biosystems)
- koncentrátor vzorků NDKV200-2 (Labicom)
- koncentrátor vzorků Termovap (ECOM)
- lyofilizátor (Labconco)
- magnetická míchačka s ohřevem K-IKA RCT basic (IKA)
- orbitální třepačka MS 1 (IKA)
- oxid uhličitý (Messer)
- pH metr Orion Star A111 (Thermo Fisher Scientific)
- skleněné a plastové chemické nádobí, plastové špičky, laboratorní stojany, parafilm, víčka, krimpovací kleště
- třepačka HS 250 basic (IKA).

Instrumentace použitá při GC/MS analýze vzorku:

- automatický dávkovač TriPlus RSH (Thermo Fisher Scientific)
- elektronická knihovna hmotnostních spekter NIST 17 Mass Spectral Library (NIST/EPA/NIH)
- hmotnostní spektrometr typu jednoduchého kvadrupólu DSQ II (Thermo Fisher Scientific)
- křemenná kapilární nepolární kolona ZB-5MS o rozměrech 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m (Phenomenex, Zebron)
- Microsoft Office Excel 2013
- nosný plyn helium (Messer)
- plynový chromatograf GC Trace Ultra (Thermo Fisher Scientific)

- TraceFinder Software 3.3 (Thermo Fisher Scientific)
- Xcalibur 2.1 (Thermo Fisher Scientific).

3.1.1 Experimentální podmínky metody GC/MS

Analýzy byly provedeny na plynovém chromatografu GC Trace Ultra a hmotnostním spektrometru DSQ II (Thermo Fisher Scientific). Vzorek byl odebírán pomocí automatického dávkovače TriPlus RSH (Thermo Fisher Scientific) v objemu 1 μ l. Nástřik na kolonu byl proveden S/SL (split/splitless) injektorem v režimu split (s děličem toku) v poměru 1:50 při teplotě 250 °C. Nepolární stacionární fáze kapilární kolony ZB-5MS byla tvořena z 5 % fenyl-arylenem a z 95 % dimethylpolysiloxanem. Nosným plynem bylo helium s konstantním průtokem 1 ml/min.

Separace analytů probíhala na základě bodu varu, a proto se využívalo teplotního gradientu pece. Počáteční teplota byla nastavena na 80 °C po dobu 5 minut, poté teplota postupně vzrůstala o 5 °C/min na 160 °C a následně o 40 °C/min na 300 °C, přičemž konečná teplota byla 300 °C po dobu 5 minut. Analýza jednoho vzorku probíhala 30 minut.

Součástí hmotnostního spektrometru byl jednoduchý kvadrupólový analyzátor, do kterého byly převáděny ionizované analyty při teplotě 250 °C. Při vyhodnocování a zpracovávání dat byly použity programy Xcalibur 2.1, elektronická knihovna hmotnostních spekter NIST 17, TraceFinder Software 3.3 a Microsoft Office Excel 2013.

3.2 Chemikálie

- 0,908mM kyselina methylmalonová denaturovaná (MMAD) v methanolu
- 14,98mM 4-fenylbutyrát v methanolu
- 500mM vodný roztok močoviny
- 574,11mM ethoxyamin hydrochlorid v pyridinu
- aceton (Mikrochem)
- hexan (Honeywall Riedel-de-Haën)
- kyselina chlorovodíková (6 M, 1 M, 0,1 M)
- LC/MS voda (Honeywall Riedel-de-Haën)
- methanol (Honeywall Riedel-de-Haën)
- N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoracetamid (BSTFA) 99 % (Sigma-Aldrich)
- pH pufrů – 1,68; 4,01; 7,00; 10,01 (Hamilton Bonaduz AG)
- pyridin (Sigma-Aldrich)

- standardní kontrolní materiál (SKML) organických kyselin (MCA Laboratory of the Queen Beatrix Hospital, Netherlands), Lot: 2017.007
- trimethylchlorsilan (TMCS) 1 % (Sigma-Aldrich)
- ureasa Jack Bean (E.C. 3. 5. 1. 5.) (Sigma-Aldrich)
- vlastní moč (pH 5,40)

Chemikálie, u kterých výrobce není uveden, byly připraveny pracovníky laboratoře metabolomiky, UMTM, Lékařské fakulty UPOL.

3.3 Příprava vzorků metodou využívající ureasu

Aktivita ureasy a vliv pH na aktivitu ureasy byl zkoumán na:

- vzorku standardu močoviny
 - bez ureasy
 - s ureasou
 - s ureasou a CO₂/HCl
- standardním kontrolním materiálu organických kyselin (SKML)
 - s ureasou a CO₂
 - s ureasou a HCl
- vlastní moči

3.3.1 Příprava vzorku moči (pro sledování změny pH během ureasové reakce)

K 5 ml moči bylo přidáno 200 µl ureasy (1 mg/ml). Průběh změny pH byl měřen na pH metru, reakční směs byla udržována při teplotě 33 °C. Po ustálení pH bylo k 4,5 ml tohoto vzorku přidáno 0,5 ml 500mM močoviny a následovalo měření pH.

3.3.2 Příprava ředící řady standardu močoviny

Ze zásobního roztoku standardu močoviny o koncentraci 500 mM byla vytvořena koncentrační řada s dvojnásobným ředěním (0,06 – 500 mM). Celkem bylo připraveno 14 vzorků, každý vzorek ve třech opakováních.

3.3.3 Příprava vzorku standardu močoviny bez ureasy

K 0,5 ml vzorku močoviny bylo přidáno 5 µl 4-fenylbutyrátu a 20 µl LC/MS vody. Vzorek byl inkubován 40 min při 37 °C, během čehož byl promícháván na třepačce. Po uplynulé době bylo ke vzorku přidáno 0,5 ml ledového methanolu (-80 °C). Vzorek byl stočen

(10 min, 12 100 g) a supernatant byl převeden do vialky. Ta byla překryta parafilmem a uložena na 30 min do -80 °C. Vzorek byl lyofilizován do druhého dne, kdy byl derivatizován a takto byl následně připraven pro GC/MS analýzu.

3.3.4 Příprava vzorku standardu močoviny s ureasou

K 0,5 ml vzorku močoviny bylo přidáno 20 µl ureasy (1 mg/ml) místo 20 µl LC/MS vody. Postup byl shodný jako při přípravě vzorku močoviny bez ureasy (kapitola 3.3.3). Vzorky byly použity k GC/MS analýze a ke sledování změny pH během ureasové reakce (ke vzorku však nebyl přidán 4-fenylbutyrát, pH bylo měřeno ihned po 40 min inkubaci vzorku).

3.3.5 Příprava vzorku standardu močoviny s ureasou a CO₂

K 0,5 ml vzorku močoviny bylo přidáno 5 µl 4-fenylbutyrátu a 20 µl ureasy (1 mg/ml). Vzorek byl inkubován 40 min při 37 °C. Během inkubace byl vzorek pufrován proudem oxidu uhličitého (a takto byl použit ke sledování změny pH během ureasové reakce s CO₂). Pro GC/MS analýzu byl vzorek po pufrování CO₂ zakoncentrován proudem dusíku při 37 °C. Vzorek byl rozpuštěn v 0,5 ml ledového methanolu (-80 °C). Poté byl stočen (10 min, 1364 g) a supernatant byl převeden do vialky. Ta byla překryta parafilmem a uložena na 30 min do -80 °C. Vzorek byl lyofilizován do druhého dne, kdy byl derivatizován a takto byl následně připraven pro GC/MS analýzu.

3.3.6 Příprava vzorku SKML s ureasou a CO₂

K 0,5 ml SKML (kreatinin 1 mmol/l, močovina cca 32 mmol/l) bylo přidáno 5 µl 4-fenylbutyrátu, 10 µl kyseliny methylmalonové denaturované a 20 µl ureasy (1 mg/ml). Vzorek byl inkubován 40 min při 37 °C. Během inkubace byl vzorek pufrován proudem oxidu uhličitého a poté byl vzorek zakoncentrován proudem dusíku při 37 °C. Metabolity byly extrahovány do methanolu (2 × 400 µl) a do acetonu (1 × 300 µl). Po každé extrakci bylo rozpouštědlo s metabolity převedeno do vialky. Vzorek byl odfoukán pod proudem dusíku do sucha při 30 °C. Vzorek byl ihned derivatizován a takto připraven pro GC/MS analýzu.

3.3.7 Příprava vzorku standardu močoviny (sledování změny pH během ureasové reakce s 6M HCl)

K 5 ml močoviny o koncentraci 500 mM (pH 5,40) bylo přidáno 200 µl ureasy (1 mg/ml). Průběh změny pH byl měřen na pH metru, reakční směs byla udržována při teplotě 33 °C.

Po ustálení pH bylo ke vzorku přidáno 20 μl HCl (6 M) a následovalo měření pH. Takto se postupovalo opakovaně.

3.3.8 Příprava vzorku standardu močoviny s ureasou a HCl (6 M)

K 0,5 ml vzorku močoviny (250 mM) bylo přidáno 5 μl 4-fenylbutyrátu a 20 μl ureasy (1 mg/ml). Vzorek byl inkubován 40 min při 37 °C. Během inkubace byl vzorek pufrován HCl (6 M). K reakční směsi bylo přidáno 15, 30 nebo 45 μl HCl (po 15 μl) po 10, 20 a 30 min inkubace a vzorek byl promíchán na třepačce. Poté bylo ke vzorku přidáno 0,5 ml ledového methanolu (-80 °C). Vzorek byl stočen (10 min, 12 100 g) a supernatant byl převeden do vialky. Ta byla překryta parafilmem a uložena na 30 min do -80 °C. Vzorek byl lyofilizován do druhého dne, kdy byl derivatizován a takto byl následně připraven pro GC/MS analýzu.

3.3.9 Příprava vzorku SKML s ureasou a HCl (6 M)

K 0,5 ml SKML (kreatinin 1 mmol/l, močovina cca 32 mmol/l) bylo přidáno 5 μl 4-fenylbutyrátu, 10 μl kyseliny methylmalonové denaturované a 20 μl ureasy (1 mg/ml). Vzorek byl inkubován 40 min při 37 °C. Během inkubace byl vzorek pufrován HCl (6 M). K reakční směsi bylo přidáno 15, 30 nebo 45 μl HCl (po 15 μl) po 10, 20 a 30 min inkubace a vzorek byl promíchán na třepačce. Poté bylo ke vzorku přidáno 0,5 ml ledového methanolu (-80 °C). Vzorek byl stočen (10 min, 12 100 g) a supernatant byl převeden do vialky. Ta byla překryta parafilmem a uložena na 30 min do -80 °C. Vzorek byl lyofilizován do druhého dne, kdy byl derivatizován a takto byl následně připraven pro GC/MS analýzu.

3.3.10 Příprava vzorku standardu močoviny pro stanovení vlivu přítomnosti HCl (6 M, 1 M, 0,1 M) na aktivitu ureasy

K 0,5 ml vzorku standardu močoviny (0,06 – 500 mM) bylo přidáno 20 μl ureasy (1 mg/ml). Dohromady byly vytvořeny 3 řady standardů. Promíchané reakční směsi byly inkubovány 40 min při 37 °C. Během inkubace byla do první řady standardů močoviny přidána 6M HCl, do druhé řady byla přidána 1M HCl a do třetí řady 0,1M HCl. Kyselina byla ke vzorku přidávána po 10, 20 a 30 min inkubace v objemu 15 μl (celkem 45 μl HCl ve vzorku). Po reakci bylo změřeno pH standardů.

3.3.11 Jednokroková derivatizace u vzorků standardu močoviny

Lyofilizované vzorky standardu močoviny byly derivatizovány pomocí derivatizační směsi připravené smícháním 1,5 ml BSTFA, 1,5 ml pyridinu a 60 μ l TMCS. Do každé vialky bylo přidáno 300 μ l této směsi a vialka byla následně zavíčkována pod dusíkem. Vzorek byl inkubován 20 min při teplotě 70 °C, během čehož byl promícháván na třepačce.

3.3.12 Dvoukroková derivatizace u vzorků SKML

Vzorky SKML podstoupily při přípravě dvoukrokovou derivatizaci zahrnující ethoximaci a následně trimethylsilylaci. V prvním kroku byla vytvořena směs 1,4 ml pyridinu a 100 μ l ethoxyamin hydrochloridu. Do každé vialky bylo přidáno 150 μ l této směsi a vialka byla zavíčkována. Vzorek byl inkubován 60 min při teplotě 50 °C, přičemž byl promícháván na třepačce. V druhém kroku byla připravena derivatizační směs smícháním 1,5 ml BSTFA a 70 μ l TMCS. Do každé vialky bylo přidáno 150 μ l této směsi a vialka byla zavíčkována pod proudem dusíku. Vzorek byl inkubován 20 min při teplotě 70 °C a promícháván na třepačce.

3.4 Příprava vzorku metodou kyselé extrakce do organického rozpouštědla

Ke vzorku SKML/moči (495 μ l) bylo přidáno 20 μ l 4-fenylbutyrátu (2,11 mM v methanolu) a vzorek byl poté doplněn LC/MS vodou na 2 ml. Následně bylo ke vzorku přidáno 0,03 g ethoxyamin hydrochloridu a reakční směs byla promíchána na třepačce. Vzorek byl inkubován 30 min při pokojové teplotě, poté bylo ke vzorku přidáno 100 μ l HCl (6 M) a 1 g NaCl. Metabolity byly extrahovány do ethylacetátu (3 \times 4 ml) vždy po dobu 10 min za využití třepačky. Metabolity byly po každé extrakci převedeny do vialky. Ke vzorku byl přidán 1 g Na₂SO₄. Vzorek byl po důkladném protřepání ponechán ke stání 10 min. Kapalná fáze vzorku byla odebrána do nové vialky. Vzorek byl odfoukán do sucha pod proudem dusíku při 30 °C a metabolity byly extrahovány do methanolu (2 \times 400 μ l) a acetonu (1 \times 300 μ l) za použití třepačky. Extrahované metabolity byly přeneseny do vialky. Vzorek byl odfoukán do sucha pod proudem dusíku při 30 °C a metabolity byly rozpuštěny v derivatizační směsi připravené smícháním 1,5 ml BSTFA, 1,5 ml pyridinu a 60 μ l TMCS. Do každé vialky bylo následně přidáno 300 μ l této směsi. Vialka byla zavíčkována pod dusíkem, vzorek byl inkubován 20 min při teplotě 70 °C a změřen na GC/MS.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Extrakce kyselin do organického rozpouštědla (LLE)

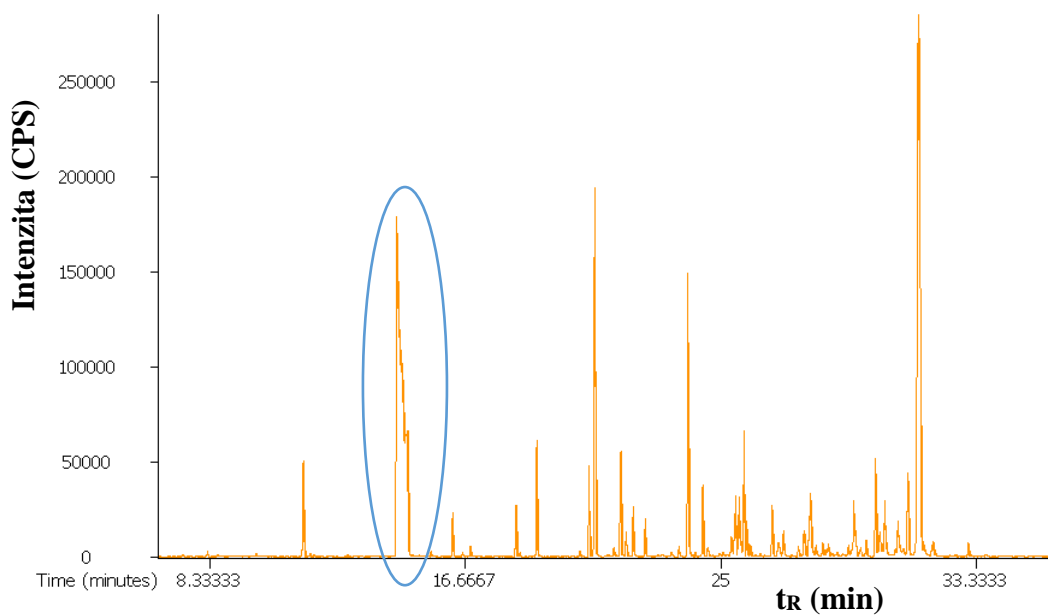
Kyselá extrakce do organického rozpouštědla je tradičně užívaná metoda pro stanovení organických kyselin v moči v klinické praxi. Principem této metody je extrakce organických kyselin do organického rozpouštědla (ethylacetát, ether), do kterého se močovina jako polární látka téměř neextrahuje (Tanaka *et al.*, 1980). Obnáší ale nevýhody, přičemž jednou z nich je náročná příprava vzorku (cca 6 h soustavné práce), druhou snížená extrakce polárnějších látek.

Extrakční účinnost se liší pro různé metabolity, a proto lze očekávat ztrátu některých z analytů. Je důležité zmínit, že extrakce závisí na pH vzorku, protože čím vyšší je pH, tím více se extrahují také bazické či neutrální látky do organického rozpouštědla, což negativně ovlivňuje analýzu (posun retenčních časů kyselin, maskování elučních křivek kyselin jiným analytem).

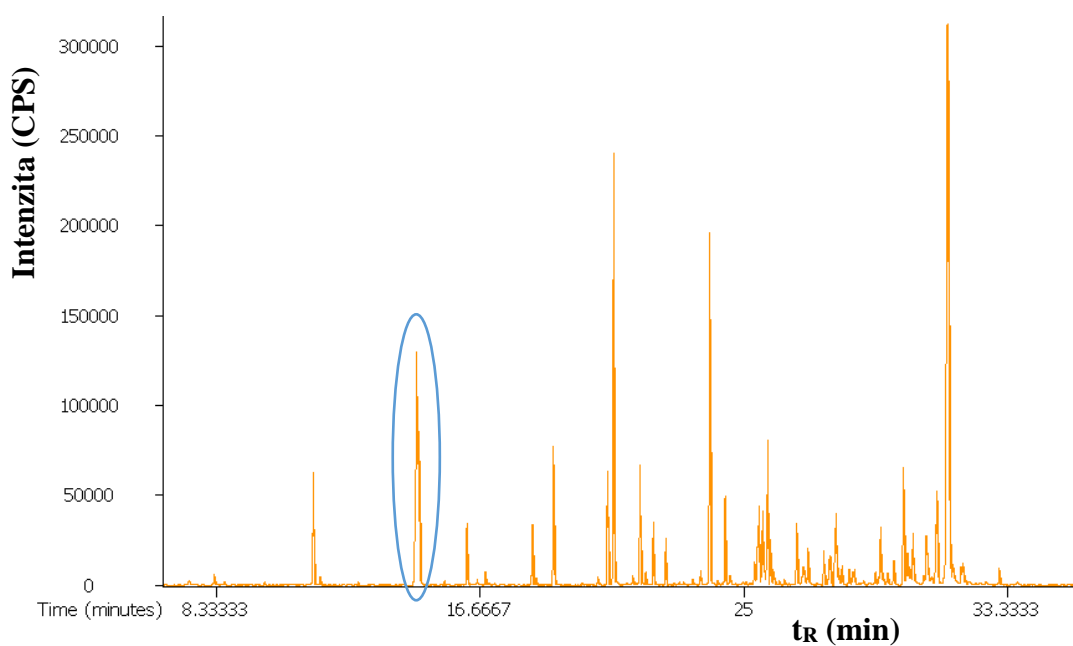
Právě kvůli výše uvedeným negativům metody LLE byla hledána příznivější metoda, která by významně neměnila metabolom moči. Alternativou je metoda využívající ureasu (Webb-Robertson *et al.*, 2014), která nemění metabolom, ale pouze odstraňuje močovinu. Bylo ale zjištěno (kapitola 4.2), že ureasa neposkytuje reprodukovatelné odstranění močoviny, a proto bylo cílem stanovit vliv přítomnosti vybraných aditiv na aktivitu ureasy.

4.2 Stanovení reprodukovatelnosti odstranění močoviny ve vzorcích moči

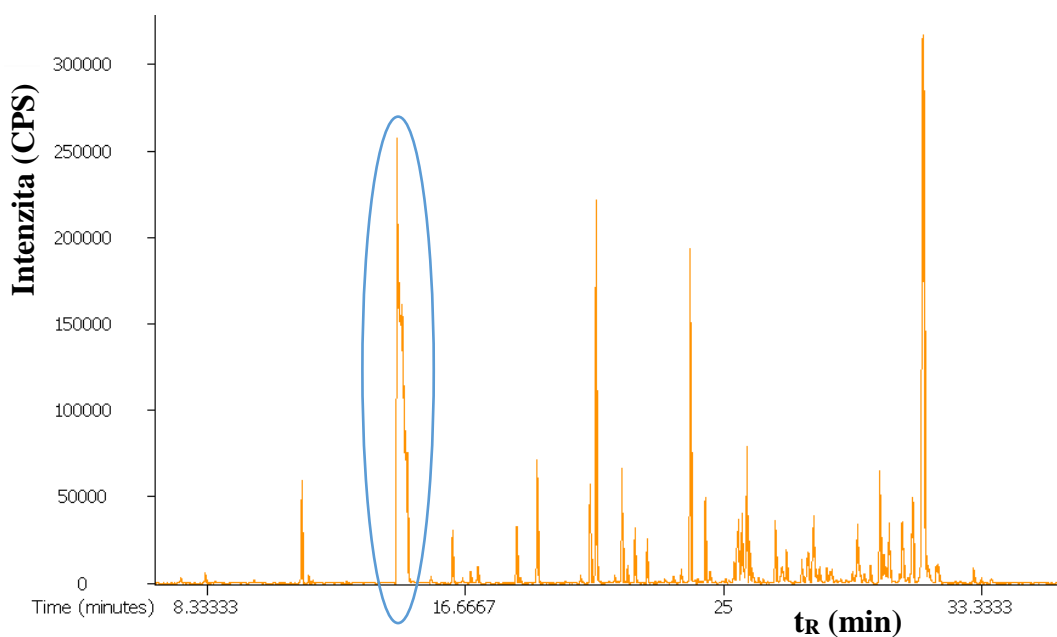
K 8 vzorkům moči (replikáty) upravených na kreatinin 1 mmol/l byla přidána ureasa (1 mg/ml) a byla stanovena reprodukovatelnost odstranění močoviny. Pomocí GC/MS analýzy bylo zjištěno, že ureasa neposkytuje reprodukovatelné odstranění močoviny (Obr. 6 – 13). To je způsobeno různým pH moči, které negativně ovlivňuje aktivitu ureasy. Aplikací pufrujících systémů/kyselin k reakční směsi by však mohla být ureasa pozitivně ovlivněna, a proto byly provedeny následující experimenty ke stanovení vlivu jejich přítomnosti na aktivitu ureasy.



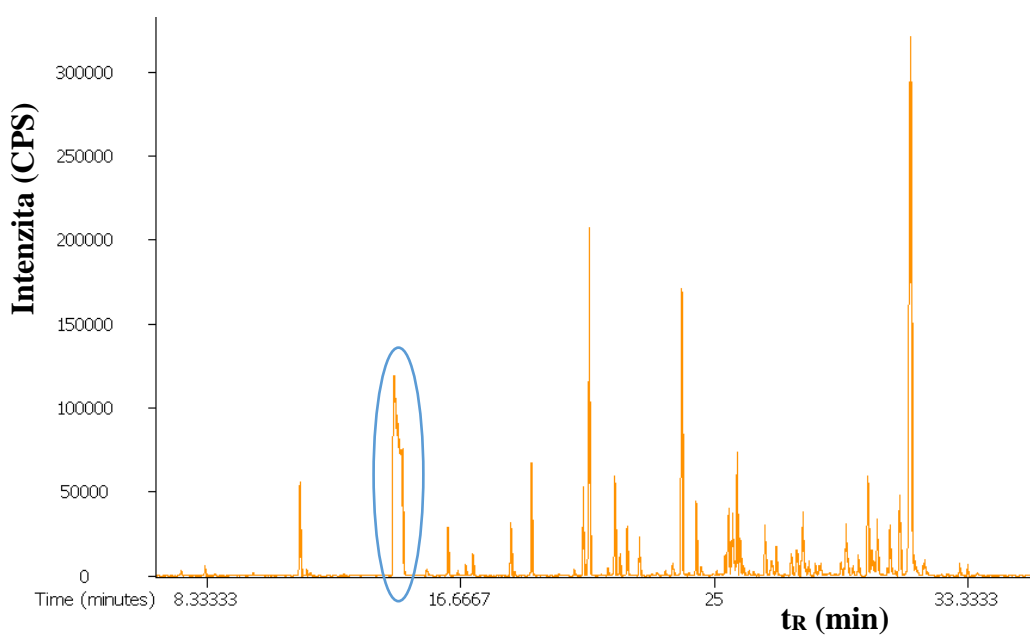
Obr. 6: Chromatogram (zobrazeno jen m/z 189 specifické pro močovinu) v prvním biologickém replikátu ošetřeného ureasou. Eluce močoviny při retenčním čase o dané intenzitě je modře vyznačena.



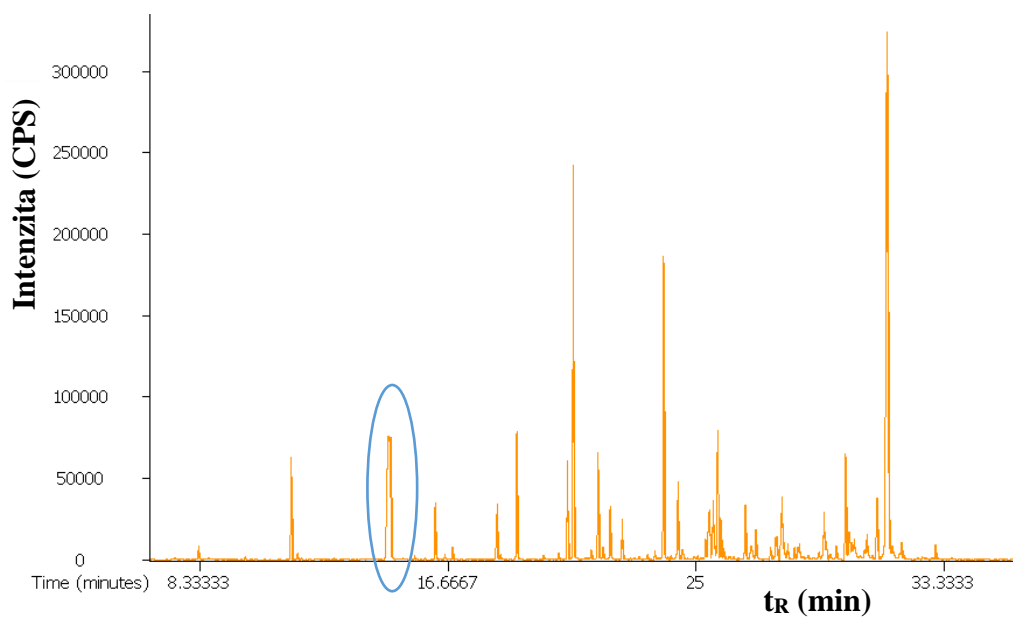
Obr. 7: Chromatogram (zobrazeno jen m/z 189 specifické pro močovinu) v druhém biologickém replikátu ošetřeného ureasou. Eluce močoviny při retenčním čase o dané intenzitě je modře vyznačena.



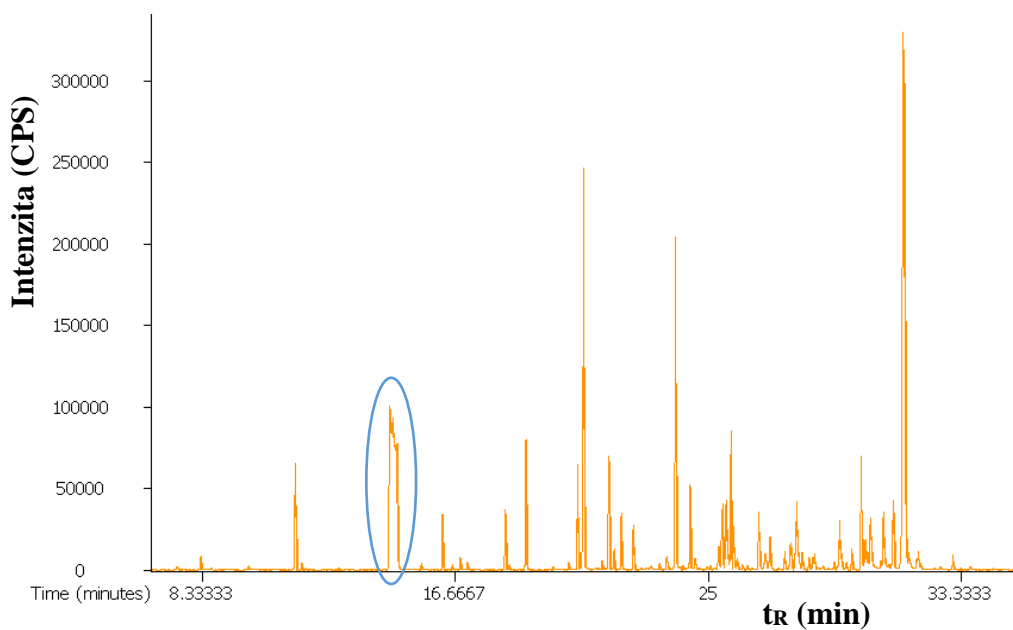
Obr. 8: Chromatogram (zobrazeno jen m/z 189 specifické pro močovinu) v třetím biologickém replikátu ošetřeného ureasou. Eluce močoviny při retenčním čase o dané intenzitě je modře vyznačena.



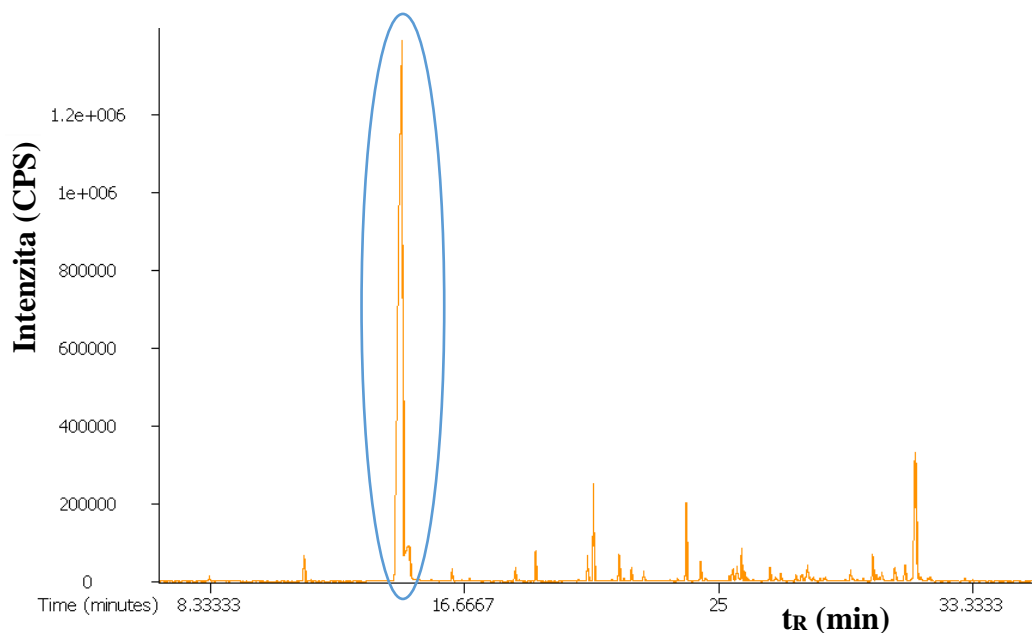
Obr. 9: Chromatogram (zobrazeno jen m/z 189 specifické pro močovinu) ve čtvrtém biologickém replikátu ošetřeného ureasou. Eluce močoviny při retenčním čase o dané intenzitě je modře vyznačena.



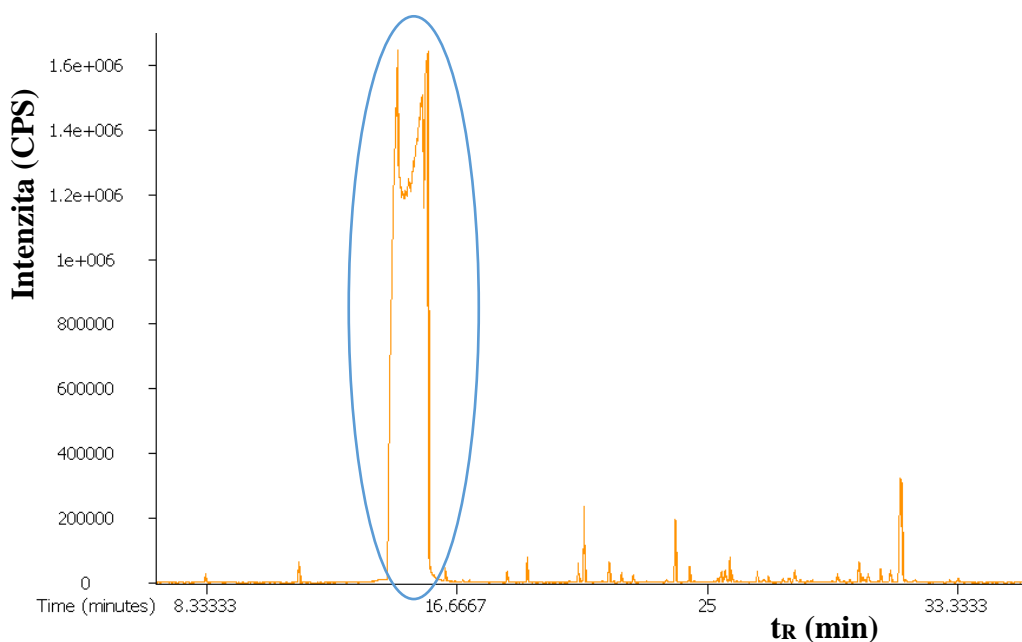
Obr. 10: Chromatogram (zobrazeno jen m/z 189 specifické pro močovinu) v pátém biologickém replikátu ošetřeného ureasou. Eluce močoviny při retenčním čase o dané intenzitě je modře vyznačena.



Obr. 11: Chromatogram (zobrazeno jen m/z 189 specifické pro močovinu) v šestém biologickém replikátu ošetřeného ureasou. Eluce močoviny při retenčním čase o dané intenzitě je modře vyznačena.



Obr. 12: Chromatogram (zobrazeno jen m/z 189 specifické pro močovinu) v sedmém biologickém replikátu ošetřeného ureasou. Eluce močoviny při retenčním čase o dané intenzitě je modře vyznačena.



Obr. 13: Chromatogram (zobrazeno jen m/z 189 specifické pro močovinu) v osmém biologickém replikátu ošetřeného ureasou. Eluce močoviny při retenčním čase o dané intenzitě je modře vyznačena.

4.3 Stanovení vlivu přítomnosti pufrujících systémů/kyselin na aktivitu ureasy

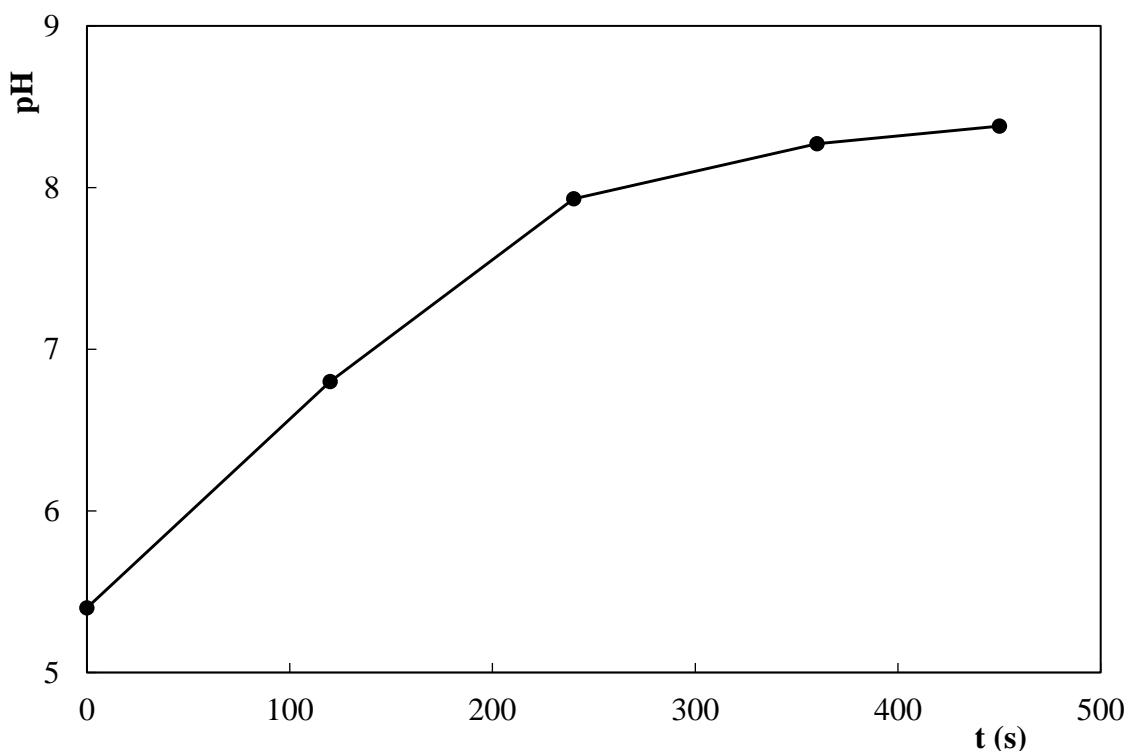
Byl zkoumán vliv pH (průběh změny) reakčních směsí (standard močoviny, moč) na aktivitu ureasy bez přítomnosti a v přítomnosti pufrujícího systému/kyseliny. Vzorby byly připraveny podle ureasového protokolu doplněného o zjištěné poznatky. Cílem stanovení

bylo zajistit reprodukovatelnost odstranění močoviny a reprodukovatelnost abundance metabolitů ve vzorku SKML/moči.

4.3.1 Změny pH vzorku moči během ureasové reakce

K 5 ml moči (pH 5,40) bylo přidáno 200 μ l ureasy (1 mg/ml) a následně byla kontinuálně měřena změna pH reakční směsi v čase (Obr. 14). Bylo zjištěno, že pH reakční směsi se lineárně zvyšovalo, zastavilo se na hodnotě 8,38 (Obr. 14). Pro objasnění, zda byla reakce zastavena z důvodu úplné deplece substrátu či inhibice ureasy, bylo k tomuto vzorku (4,5 ml) přidáno 0,5 ml 500mM roztoku standardu močoviny. Hodnota pH roztoku se opět začala zvyšovat až na hodnotu 8,78, při které se ustálila.

Tímto bylo zjištěno, že močovina ve vzorku moči (~ 445,9 mmol/l) se odbourala všechna v důsledku změny pH cca o 3 řády, a že ureasa byla aktivní i při pH vyšším než 8 (Obr. 14).



Obr. 14: Změna pH moči v čase během ureasové reakce

4.3.2 Změny pH standardu močoviny během ureasové reakce

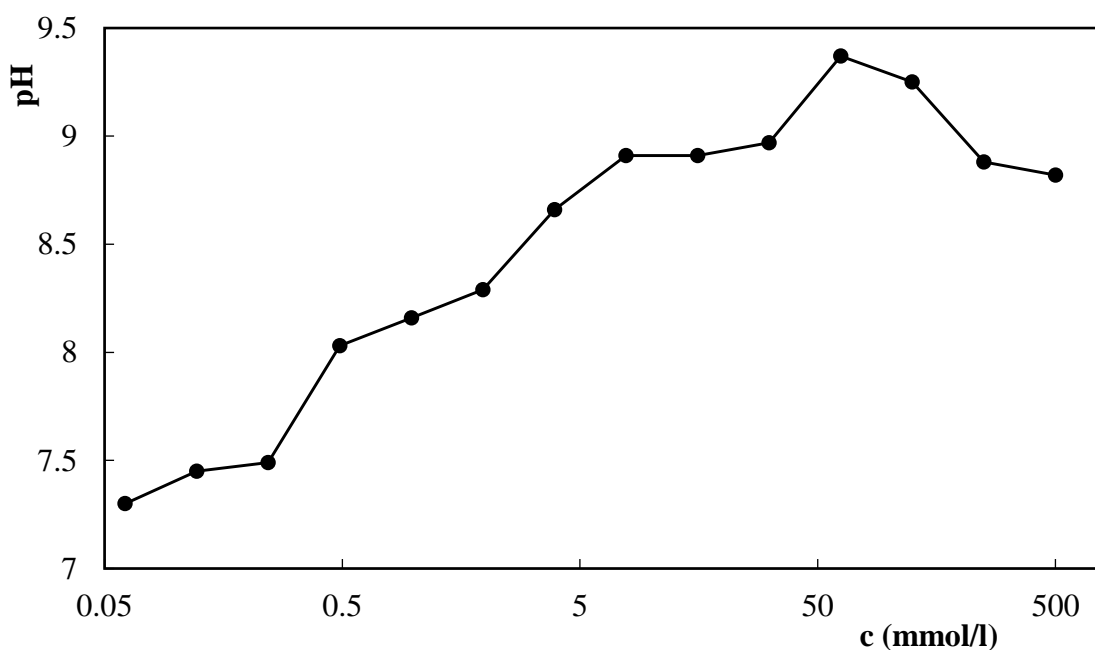
Analýzy byly provedeny na vzorcích standardu močoviny v rozmezí koncentrací 0,06 – 500 mmol/l tak, aby toto rozmezí zahrnovalo optimální rozmezí koncentrace

močoviny v moči a zároveň bylo dostatečně nad i pod optimálním limitem. Optimální koncentrace močoviny v moči se pohybuje v rozmezí 167 – 390 mmol/l (Brodská, 2005).

Michaelisova konstanta K_M ureasy je 1,3 mM (Sigma-Aldrich, 11. 5. 2018). Ureasa dosáhne limitní rychlosti při koncentraci standardu 2,6 mM. Experimentálně bylo zjištěno, že se rychlost ureasy se zvyšující se koncentrací močoviny zvyšovala až ke koncentraci 62,5 mM (Obr. 15), při které dosáhla maximální limitní rychlosti a její aktivita se s vyšší koncentrací močoviny již neměnila.

Ke standardům močoviny (0,5 ml) o různých koncentracích v rozmezí 0,06 – 500 mM bylo přidáno 20 μ l ureasy (1 mg/ml). Reakční směs byla promíchána a po 40 min při 37 °C byla změřena hodnota pH (Obr. 15). Bylo zjištěno, že se reakce nezastavila při stejné hodnotě pH. Maximální naměřené pH bylo 9,37 při koncentraci 62,5 mM a dále se již nezvyšovalo, i přes vyšší nabídku substrátu.

Bylo potvrzeno, že se zvyšující se koncentrací močoviny, a tím spojeným vznikem vysoké koncentrace amonných iontů, klesá aktivita ureasy. Eliminace vysoké koncentrace močoviny bez podpory aktivity ureasy pufrujícími systémy/kyselinami je nemožná.

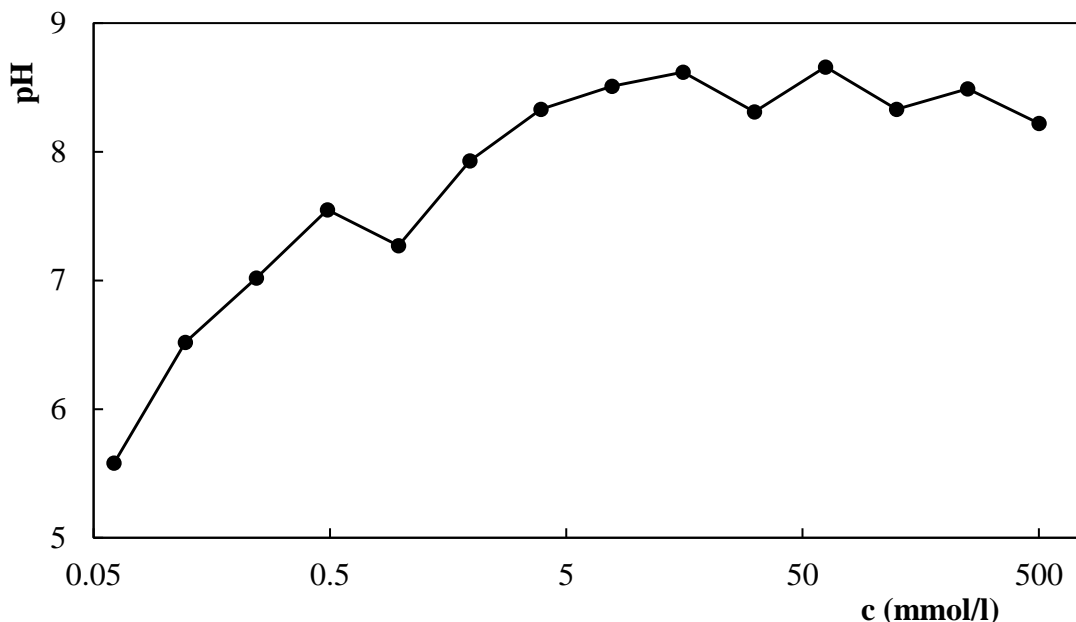


Obr. 15: Změny pH standardu močoviny o různé koncentraci (0,06 – 500 mM) během ureasové reakce

4.3.3 Změny pH standardu močoviny během ureasové reakce s CO_2

Předchozí experiment (kapitola 4.3.2) byl zopakován v přítomnosti CO_2 (Obr. 16). Reakce se jako v předešlém experimentu nezastavila při stejném pH. Ve vzorcích s nižší koncentrací močoviny se reakce zastavila dříve (z důvodu úplné deplece substrátu). Maximální naměřené

pH bylo 8,66 při koncentraci 62,5 mM a dále se již nezvyšovalo, i přes vyšší nabídku substrátu. Pufrováním CO_2 standardu močoviny ošetřeného ureasou bylo dosaženo toho, že pH reakce bylo nižší (Obr. 16). Následně byl stanoven vliv nižšího pH na aktivitu ureasy (kapitola 4.3.4).



Obr. 16: Změny pH standardu močoviny o různé koncentraci (0,06 – 500 mM) během ureasové reakce s CO_2

4.3.4 Stanovení vlivu přítomnosti CO_2 na aktivitu ureasy ve vzorcích standardu močoviny

Pomocí GC/MS analýzy byla zjištěna koncentrace močoviny ve vzorcích standardu v rozmezí koncentrací 0,06 – 500 mmol/l bez aplikace ureasy, s aplikací ureasy a s aplikací ureasy a CO_2 . Naměřené koncentrace močoviny jsou uvedeny v tabulce (Tab. 1).

Dle tabulky (Tab. 1), po aplikaci samotné ureasy došlo k 100% eliminaci močoviny u vzorků s koncentrací 0,06 – 31,25 mmol/l. Po aplikaci ureasy a CO_2 byla 100% odstraněna močovina u vzorků s koncentrací 0,06 – 62,5 mmol/l. U vzorků s vyšší koncentrací močoviny než 62,5 mmol/l sice nedošlo k 100% eliminaci močoviny, ale za použití ureasy s CO_2 bylo odstranění močoviny efektivnější než při aplikaci samotné ureasy (Tab. 1).

Tab. 1: Předpokládaná koncentrace a naměřená koncentrace močoviny ve vzorcích bez ureasy (NT), s ureasou (UT) a s ureasou a CO₂ (UOT). Průměrná koncentrace (hodnoty jednotlivých triplikátů).

Standard močoviny (mmol/l)	Naměřená koncentrace močoviny (NT) (mmol/l)	Naměřená koncentrace močoviny (UT) (mmol/l)	Naměřená koncentrace močoviny (UOT) (mmol/l)
0,06	0,02 (0,02; 0,02; 0,02)	0 (0; 0; 0)	0 (0; 0; 0)
0,12	0,06 (0,06; 0,07; 0,06)	0 (0; 0; 0)	0 (0; 0; 0)
0,24	0,22 (0,15; 0,21; 0,29)	0 (0; 0; 0)	0 (0; 0; 0)
0,49	0,50 (0,59; 0,45; 0,47)	0 (0; 0; 0)	0 (0; 0; 0)
0,98	1,29 (1,29; 1,35; 1,24)	0 (0; 0; 0)	0 (0; 0; 0)
1,95	2,01 (0,04; 3,35; 2,64)	0 (0; 0; 0)	0 (0; 0; 0)
3,91	7,86 (7,40; 7,35; 8,82)	0 (0; 0; 0)	0 (0; 0; 0)
7,81	11,88 (13,47; 12,12; 10,05)	0 (0; 0; 0)	0 (0; 0; 0)
15,63	16,80 (14,17; 16,64; 19,59)	0 (0; 0; 0)	0 (0; 0; 0)
31,25	26,65 (26,62; 24,54; 28,79)	0 (0; 0; 0)	0 (0; 0; 0)
62,50	44,34 (46,70; 37,79; 48,54)	0,01 (0; 0,01; 0,01)	0 (0; 0; 0)
125	104,62 (94,75; 96,98; 122,13)	0,40 (1,06; 0,05; 0,09)	0,04 (0,04; 0,03; 0,04)
250	164,53 (220,20; 129,16; 144,23)	22,41 (17,86; 19,13; 30,24)	12,18 (0,51; 0,69; 35,33)
500	196,99 (227,23; 176,75; 186,99)	170,27 (223,47; 131,53; 155,80)	62,91 (68,37; 57,44; 62,91)

4.3.5 Stanovení vlivu přítomnosti CO₂ na aktivitu ureasy ve vzorcích SKML

Vzorek SKML byl naředěn na požadovanou koncentraci kreatininu 1 mmol/l. Koncentrace močoviny ve vzorku byla cca 32 mmol/l, což je běžná hodnota pro stejně připravené patientské vzorky moči. Vzorek byl ošetřen ureasou v přítomnosti CO₂, byla stanovena reprodukovatelnost abundance metabolitů a reprodukovatelnost odstranění močoviny. Experiment byl proveden v osmi replikátech.

V žádném ze vzorků nebyla nalezena močovina, proto lze usoudit, že ureasová reakce byla za těchto podmínek reprodukovatelná. Ve vzorku byla sledována abundance 21 metabolitů, převážně organických kyselin, v koncentračním rozmezí od 3 do 439 μmol/l. Analytická variabilita byla v rozmezí 8 – 55 % (Tab. 2). Nejvyšší variabilitu měly látky

2-oxoglutarát, methylcitrát (4-TMS), glutarát (2-TMS) a 3-methylglutarát (2-TMS), přičemž pro všechny z nich je charakteristická přítomnost dvou nebo více karboxylových skupin. Nejnižší variabilitu měly látky 5-oxoprolin (2-TMS), suberát (2-TMS), ethylmalonát (2-TMS) a 3-methylglutakonát. Tyto látky vyjma 5-oxoprolinu, 2-TMS (derivát aminokyseliny s jednou karboxylovou skupinou) obsahují ve své struktuře dvě karboxylové skupiny.

V klinické praxi je přípustné CV do 30 %, přičemž v tabulce (Tab. 2) jsou uvedeny analyty s chybou větší než 50 %. Webb-Robertson *et al.* (2014) uvádí analytickou variabilitu 250 metabolitů při použití ureasového protokolu 6,1 %. Aplikace CO₂ sice zajišťuje úplnou depleci močoviny, ale zároveň stírá výhody použití ureasového protokolu.

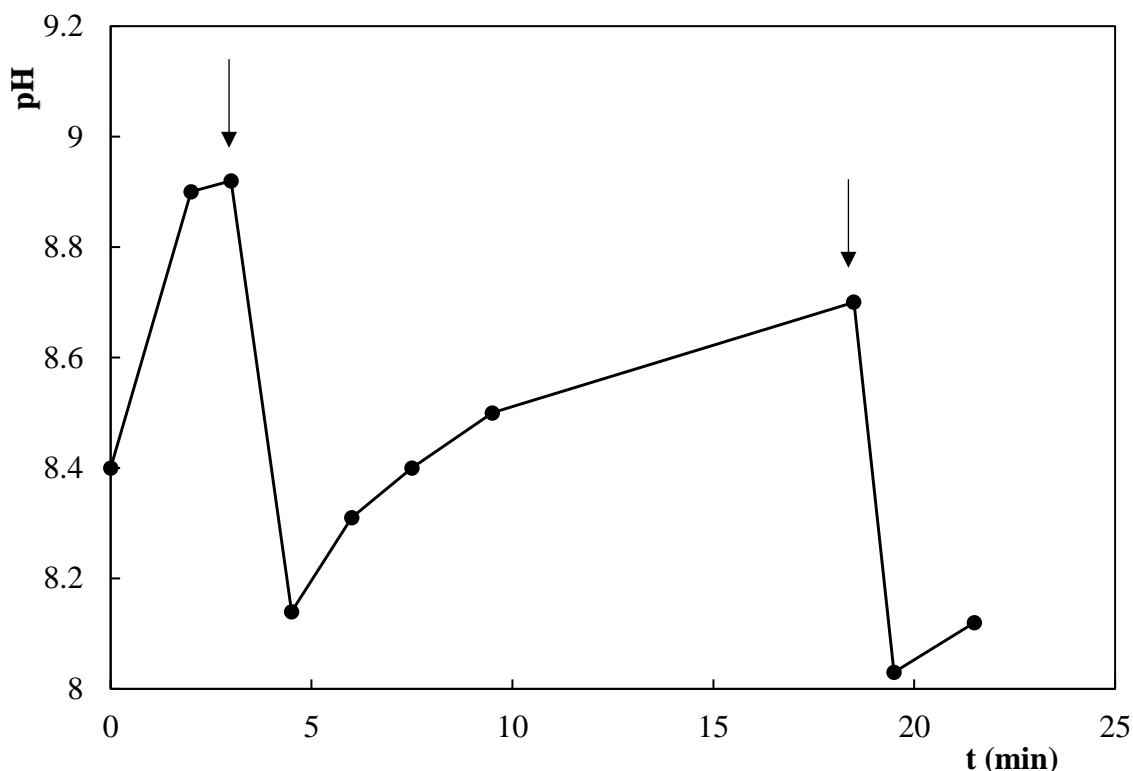
4.3.6 Vliv přítomnosti HCl (6 M) na aktivitu ureasy

Oxid uhličitý jakožto pufrční systém sice aktivně spolupracoval s ureasou, ale neposkytoval dostatečnou reprodukovatelnost abundance metabolitů. Proto byl hledán jiný způsob, který by podpořil ureasovou reakci a zároveň by neovlivňoval metabolom vzorku moči. Jelikož se jako limitující faktor jevil nárůst pH vzorku, postupně byl vzorek okyselován HCl, která neinterferuje GC/MS analýze a lze ji snadno odstranit lyofilizací.

Ke vzorku standardu močoviny (500 mM, pH 8,40) byla přidána ureasa (1 mg/ml) a následně byla kontinuálně měřena změna pH reakční směsi v čase (Obr. 17). Hydrolýza močoviny se zastavila při pH 8,92 a následně se pH již nezvyšovalo (Obr. 17). Po přidání HCl (20 µl, 6 M) ke vzorku pH kleslo více než o půl řádu, poté se však znovu začalo zvyšovat. Z toho vyplývá, že ureasa aktivně hydrolyzovala močovinu za vzniku amonných iontů, které měly za důsledek alkalizaci roztoku. Ke stejnému efektu došlo opakovaně také v 19. minutě (Obr. 17), kdy byla ke vzorku znovu přidána HCl (6 M). Takto bylo zjištěno, že HCl aktivně spolupracuje s ureasou při hydrolýze močoviny.

Tab. 2: Metabolity vyskytující se v SKML (celkem 21 metabolitů), analytická variabilita (%) metabolitů v SKML (8 replikátů).

Název metabolitu	CV (%)
Glykolát (2-TMS)	24
3-hydroxyisovalerát (2-TMS)	26
Methylmalonát (2-TMS)	23
4-hydroxybutyrát (2-TMS)	22
Ethylmalonát (2-TMS)	17
Glycerát (3-TMS)	27
Fumarát (2-TMS)	26
Mevalonolakton (1-TMS)	30
Glutarát (2-TMS)	36
3-methylglutarát (2-TMS)	33
3-methylglutakonát	17
Adipát (2-TMS)	18
5-oxoprolin (2-TMS)	8
2-hydroxyglutarát (3-TMS)	19
3-hydroxyglutarát (3-TMS)	19
3-hydroxy-3-methylglutarát (3-TMS)	20
2-oxoglutarát	55
Suberát (2-TMS)	14
Methylcitrát (4-TMS)	39
Kyselina sebaková (2-TMS)	20
Kyselina 3-(3-methoxy-4-hydroxyfenyl)mléčná (3-TMS)	19
Průměr CV (%)	24



Obr. 17: Změna pH standardu močoviny (500 mM) během ureasové reakce a po přidání HCl v čase (šipky zobrazují přidání HCl k reakční směsi).

4.3.7 Stanovení vlivu přítomnosti HCl (6 M) na aktivitu ureasy ve vzorcích standardu močoviny

K triplikátům standardu močoviny (250 mM) byla přidána ureasa (20 μ l, 1 mg/ml) a různý objem HCl (6 M, 15, 30 a 45 μ l). Bylo zjištěno, že přidavek HCl má na průběh ureasové reakce pozitivní vliv. Po přidání HCl v konečném objemu 45 μ l bylo dosaženo až 94% eliminace močoviny (Tab. 3).

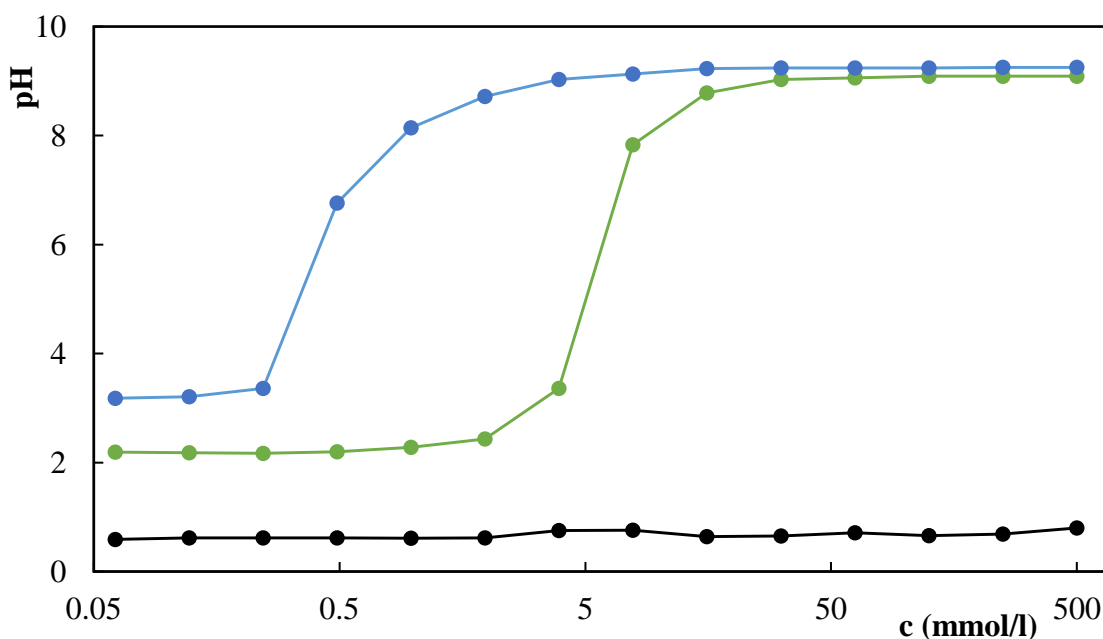
Příprava vzorků za použití HCl byla snadnější než za použití CO₂ a nedošlo k negativnímu ovlivnění vzorků již před samotnou analýzou. Kyselina chlorovodíková splnila žádoucí okyselení prostředí, proto byl tento postup aplikován na SKML. Ve vzorcích však byla zachována veškerá močovina. V dalším experimentu (kapitola 4.3.8) byl stanoven vliv kyseliny na průběh ureasové reakce při sledování pH.

Tab. 3: Naměřená zbytková koncentrace močoviny (průměr triplikátů) ve standardu močoviny (250 mM) ošetřeném ureasou a HCl (UAT) různou koncentrací HCl (15 μ l, 30 μ l a 45 μ l).

250mM vzorek standardu	Koncentrace standardu (UAT) (mmol/l)	Zbylá močovina ve vzorku (%)	Množství rozložené močoviny (%)
+ ureasa a 1 \times 15 μ l HCl	59,82	23,93	76,07
+ ureasa a 2 \times 15 μ l HCl	23,90	9,56	90,44
+ ureasa a 3 \times 15 μ l HCl	15,84	6,33	93,67

4.3.8 Vliv přítomnosti HCl (6 M, 1 M, 0,1 M) na aktivitu ureasy

Ke standardům močoviny (0,5 ml) o různých koncentracích v rozmezí 0,06 – 500 mM bylo přidáno 20 μ l ureasy (1 mg/ml). Takto byly připraveny 3 řady standardů. Reakční směsi byly promíchány a inkubovány po dobu 40 min při 37 °C. Během inkubace byla do první řady standardů přidána 6M HCl, do druhé řady byla přidána 1M HCl a do třetí řady byla přidána 0,1M HCl. K reakční směsi byla kyselina přidávána po 10, 20 a 30 min inkubace v objemu 15 μ l. Po inkubaci byla změřena hodnota pH (Obr. 18).



Obr. 18: Změna pH standardu močoviny o různé koncentraci (0,06 – 500 mM) během ureasové reakce s HCl, kde černě je zobrazena řada po aplikaci 6M HCl, zeleně je zobrazena řada po aplikaci 1M HCl a modře je zobrazena řada po aplikaci 0,1M HCl k reakční směsi.

Tímto experimentem bylo zjištěno, že 6M HCl je příliš silná, má tak negativní vliv na aktivitu ureasy. Její aplikací došlo ke konstantnímu snížení pH na hodnotu cca 0,5 (Obr. 18). Z toho lze usoudit, že okyselení bylo natolik silné, že došlo k denaturaci ureasy.

Po aplikaci 1M HCl ke standardům močoviny (0,06 – 500 mM) ošetřených ureasou se reakce nezastavila při stejné hodnotě pH (Obr. 18). Ve vzorcích s nižší koncentrací močoviny se reakce zastavila dříve (z důvodu úplné deplece substrátu). Maximální naměřené pH bylo 9,09 při koncentraci 125 mM, které se dále nezvyšovalo, ani přes vyšší nabídku substrátu.

Po přidání 0,1M HCl ke standardům močoviny (0,06 – 500 mM) ošetřených ureasou se reakce také nezastavila při stejné hodnotě pH (Obr. 18). Ve vzorcích s nižší koncentrací močoviny se reakce zastavila dříve (z důvodu úplné deplece substrátu). Maximální naměřené pH bylo 9,25 při koncentraci 250 mM a 500 mM.

Bylo zjištěno, že nejefektivnější cestou, jak dosáhnout, aby reakce probíhala až do úplné deplece močoviny, je aplikace 1M HCl ke standardům ošetřených ureasou.

4.4 Srovnání ureasového protokolu s metodou kyselé extrakce do organického rozpouštědla

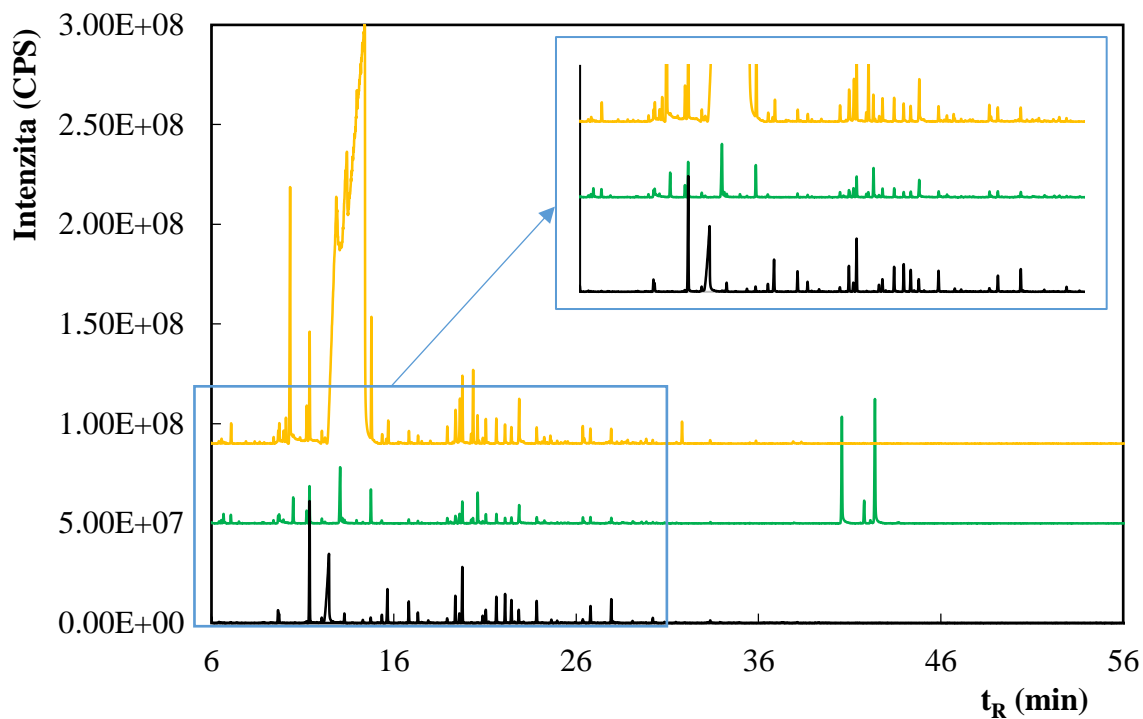
Tradičně užívaná metoda extrakce kyselin do organického rozpouštědla (LLE) představuje tři hlavní negativa. Prvním z nich je zvýhodňování extrakce jedné skupiny organických kyselin nad druhou skupinou kyselin s rozdílnou polaritou, přičemž extrakce kyselin s vyšší polaritou je nižší (Chalmers and Lawson, 1982; Liu *et al.*, 2004). Extrakční účinnost se liší pro různé metabolity, některé z nich se do rozpouštědla neextrahují vůbec, čímž dochází ke ztrátě některých analytů (Obr. 19).

Kvalita extrakce metodou LLE je závislá na pH vzorku moči, které odráží stravování a zdravotní stav pacienta. Čím vyšší je pH, tím více dochází k extrakci také bazických a neutrálních látek do organického rozpouštědla. Jednou z nežádoucích bazických látek je močovina, která ovlivňuje analýzu tím, že způsobuje posun retenčních časů kyselin nebo maskuje eluční křivky kyselin. Třetím negativem této metody je časová náročnost přípravy vzorku (extrakce trvá cca 6 hodin, představuje mnoho za sebou jdoucích kroků).

Metoda využívající ureasu (dle Webb-Robertson *et al.*, 2014) představuje oproti metodě LLE pouze dvě negativa. Ureasa vnáší do analýzy artefakty – eluční vrcholy látek, které nejsou přítomny v původním vzorku, zatímco v chromatogramu ano. Tyto artefakty lze pozorovat na konci analýzy (Obr. 19), nezpůsobují proto posun retenčních časů jednotlivých metabolitů. Ureasa je enzym, který sám o sobě neovlivňuje metabolity, a proto

nedochází ke zvýhodňování jedné skupiny metabolitů nad druhou jako při použití metody LLE.

Úkolem ureasy je odstranění močoviny ze vzorku, avšak její odstranění není úplné a reprodukovatelné. Jako řešení se nabízí aplikovat ke vzorkům vybrané aditivum, které povzbudí aktivitu ureasy v hydrolýze močoviny.



Obr. 19: Porovnání chromatografického vzoru vzorku SKML připraveného pomocí ureasy (zeleně), extrakce do ethylacetátu (černě) a lyofilizací (žlutě). Ve výřezu (modře) je zobrazeno retenční okno močoviny.

5 Závěr

Vzorky moči ošetřené ureasou neposkytují reprodukovatelné odstranění močoviny. Udržení stálého pH by mělo podpořit ureasovou reakci. Jedním z cílů práce bylo proto nalezení aditiva, které by upravilo pH reakce a zároveň by nezpůsobovalo interferenci analýzy. Druhým cílem práce bylo srovnání ureasového protokolu s dříve užívanou metodou kyselé extrakce do organického rozpouštědla.

Kontrolní vzorek na bázi lidské moči byl připraven pomocí kyselé extrakce do ethylacetátu a ureasového protokolu. Bylo zjištěno, že extrakce výrazně mění metabolom moči díky různé extrakční účinnosti přítomných metabolitů. Ureasový protokol vnáší do moči několik artefaktů, které jsou však mimo analytické okno. Ureasový protokol je také jednodušší na provedení. Reprodukovatelnost odstranění močoviny byla podpořena pomocí HCl a CO₂. Ve vzorcích ošetřených CO₂ bylo dosaženo úplného odstranění močoviny. Při aplikaci na kontrolní materiál na bázi lidské moči však nebyly získány reprodukovatelné hodnoty koncentrací přítomných metabolitů (CV od 8 do 55 %). Okyselení vzorků pomocí HCl (6 M) zajistilo odstranění močoviny ze vzorků bez změny metabolomu, avšak v dalším experimentu už k odstranění močoviny nedošlo, neboť HCl (6 M) pravděpodobně způsobila denaturaci ureasy. Méně koncentrovaná HCl (1 M) upravila pH reakce a denaturaci již nezpůsobila.

Ureasový protokol je výhodnější než kyselá extrakce do ethylacetátu, při aplikaci 1M HCl by mohl přinést lepší výsledky, které by přispěly ke zdokonalení diagnostiky některých metabolických onemocnění.

6 Literatura

Bader M., Messerer P., Will W. (2013) Urinary creatinine concentrations in an industrial workforce and comparison with reference values of the general population. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **86**, 673–680.

Bernášková K., Rokyta R. (2016) Fyziologie vylučování ledvinami. In *Fyziologie* (Richard Rokyta *et al.*, ed.), pp. 183, Galén, Praha, ČR.

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. (2013) The Human Urine Metabolome. *PLoS ONE* **8**, e73076.

Brodská H. (2005) Hospodaření s vodou a minerály, ledviny, moč. In *Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia* (Petr Štern *et al.*, ed.), pp. 114, Karolinum, Praha, ČR.

Bujak R., Struck-Lewicka W., Markuszewski M. J., Kaliszan R. (2015) Metabolomics for laboratory diagnostics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **113**, 108 – 120.

Cesareo S. D., Langton S. R. (1992) Kinetic properties of *Helicobacter pylori* urease compared with jack bean urease. *FEMS Microbiology Letters* **78**, 15–21.

Certifikát Jack Bean ureasy (E.C. 3.5.1.5): Sigma-Aldrich. <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Datasheet/2/u4002dat.pdf>, staženo 11. 5. 2018.

Chalmers R. A., Lawson A. M. (1982) Organic Acids in Man, pp. 13–22, Springer, Netherlands.

Danial E. N., Hamza A. H., Mahmoud R. H. (2015) Characteristics of Immobilized Urease on Grafted Alginate Bead Systems. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **58**, 147–153.

Dettmer K., Aronov P. A., Hammock B. D. (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews* **26**, 51–78.

Dixon N. E., Riddles P. W., Gazzola C., Blakeley R. L., Zerner B. (1980) Jack bean urease (EC 3.5.1.5). V. On the mechanism of action of urease on urea, formamide, acetamide, *N*-methylurea, and related compounds. *Canadian Journal of Biochemistry* **58**,

1335–1344.

Dostál J. *et al.* (2005) *Lékařská chemie II: bioorganická chemie*, 2. zcela přepracované vydání, pp. 9, Masarykova univerzita, Brno, ČR.

Fidaleo M., Lavecchia R. (2003) Kinetic Study of Enzymatic Urea Hydrolysis in the pH Range 4-9. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly* **17**, 311–318.

Gazzola C., Blakeley R. L., Zerner B. (1973) On the Substrate Specificity of Jack Bean Urease (Urea amidohydrolase, EC 3.5.1.5). *Canadian Journal of Biochemistry* **51**, 1325–1330.

Howell S. F., Sumner J. B. (1934) The Specific Effects of Buffers upon Urease Activity. *Journal of Biological Chemistry* **104**, 619–626.

Kittnar O., Pokorný J. (2009) Vylučování. In *Základy lékařské fyziologie* (Miloš Langmeier *et al.*, ed.), pp. 105–123, Grada Publishing, Praha, ČR.

Klouda P. (2003) *Moderní analytické metody*, 2. upravené vydání, pp. 10–15, Ostrava, ČR.

Koolman J., Röhm K.-H. (2005) *Color Atlas of Biochemistry*, 2nd ed., pp. 172, Thieme, Stuttgart, Germany.

Krajewska B. (2009a) Ureases. I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **59**, 9–21.

Krajewska B. (2009b) Ureases. II. Properties and their customizing by enzyme immobilizations: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **59**, 22–40.

Kranendijk M., Struys E. A., van Schaftingen E., Gibson K. M., Kanhai W. A., van der Knaap M. S., Amiel J., Buist N. R., Das A. M., de Klerk J. B., Feigenbaum A. S., Grange D. K., Hofstede F. C., Holme E., Kirk E. P., Korman S. H., Morava E., Morris A., Smeitink J., Sukhai R. N., Vallance H., Jakobs C., Salomons G. S. (2010) *IDH2* Mutations in Patients with D-2-Hydroxyglutaric Aciduria. *Science* **330**, 336.

Kubač P. (2005) Vyšetření moči a močového sedimentu. In *Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia* (Petr Štern *et al.*, ed.), pp. 207, Karolinum, Praha, ČR.

Kumari C., Varughese B., Ramji S., Kapoor S. (2016) Liquid–Liquid Extraction and Solid Phase Extraction for Urinary Organic Acids: A Comparative Study from a Resource Constraint Setting. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* **31**, 414–422.

Liu A., Kushnir M. M., Roberts W. L., Pasquali M. (2004) Solid phase extraction procedure

for urinary organic acid analysis by gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **806**, 283–287.

Musilová J., Glatz Z. (2011) Metabolomika – základní pojmy, strategie a metodologie. *Chemické listy* **105**, 745–751.

Nguyen D.-T., Lee G., Paik M.-J. (2013) Keto acid profiling analysis as ethoxime/*tert*-butyldimethylsilyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **913–914**, 48–54.

Orata F. (2012) Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. In *Advanced Gas Chromatography - Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications* (Mustafa Ali Mohd, ed.), pp. 83-108, InTech, Rijeka, Croatia.

Pelouch V. (2005) Metabolismus bílkovin. In *Obecná a klinická biochemie pro bakalářské obory studia* (Petr Štern *et al.*, ed.), pp. 76–77, Karolinum, Praha, ČR.

Plíhalová L. *et al.* (2017) Chemie pro biology II, 2. rozšířené vydání, pp. 12–15, Univerzita Palackého, Olomouc, ČR.

Pokorný J. (2009) Funkce trávicího traktu. In *Základy lékařské fyziologie* (Miloš Langmeier *et al.*, ed.), pp. 137, Grada Publishing, Praha, ČR.

Pöge A. P., Autschbach F., Korall H., Trefz F. K., Mayatepek E. (1997) Early clinical manifestation of glutaric aciduria type I and nephrotic syndrome during the first months of life. *Acta paediatrica* **86**, 1144–1147.

Racek J. *et al.* (2006) Klinická biochemie, 2. přepracované vydání, pp. 75, Galén, Praha, ČR.

Rinaldo P. (2008) Organic acids. In *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics* (Nenad Blau, Marinus Duran, K. Michael Gibson, ed.), pp. 153–158, Springer, Berlin, Germany.

Sánchez-Guijo A., Hartmann M. F., Wudy, S. A. (2013) Introduction to Gas Chromatography-Mass Spectrometry. In *Hormone Assays in Biological Fluids, Vol. 1065* (Michael J. Wheeler, ed.), pp. 27-44, Springer Science+Business Media, New York, USA.

Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A. (1998) Principles of instrumental analysis, 5th ed.,

pp. 679, Harcourt College Publishers, Orlando, FL, USA.

Ševčík J. (2004) Plynová chromatografie. In *Analytické separační metody* (Karel Štulík *et al.*, ed.), pp. 117, Karolinum, Praha, ČR.

Tanaka K., West-Dull A., Hine D. G., Lynn T. B., Lowe T. (1980) Gas-Chromatographic Method of Analysis for Urinary Organic Acids. II. Description of the Procedure, and Its Application to Diagnosis of Patients with Organic Acidurias. *Clinical Chemistry* **26**, 1847–1853.

Webb-Robertson B.-J., Kim Y.-M., Zink E. M., Hallaian K. A., Zhang Q., Madupu R., Waters K. M., Metz T. O. (2014) A Statistical Analysis of the Effects of Urease Pretreatment on the Measurement of the Urinary Metabolome by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Metabolomics* **10**, 897–908.

Zhang A., Sun H., Wu X., Wang X. (2012) Urine metabolomics. *Clinica Chimica Acta* **414**, 65–69.

Zhang N., Geng F., Hu Z.-H., Liu B., Wang Y.-Q., Liu J.-C., Qi Y.-H., Li L.-J. (2016) Preliminary study of urine metabolism in type two diabetic patients based on GC-MS. *American Journal of Translational Research* **8**, 2889–2896.