

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Fakulta přírodovědecká

Katedra analytické chemie

**MOŽNOSTI VYUŽITÍ INFRAČERVENÉ SPEKTROSKOPIE
PŘI ANALÝZE HOMOCYSTEINU**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor práce: Bc. Lucia Švábiková

Studijní obor: Analytická chemie

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Juraj Ševčík, Ph.D.

Olomouc 2016

Souhrn

Cílem mé diplomové práce bylo pokusit se o identifikaci, a případně také o kvantifikaci, aminokyseliny homocysteinu v plazmě pomocí infračervené spektrometrie.

Infračervená spektrometrie je analytická metoda, o níž se v souvislosti s klinickou praxí začíná uvažovat, jelikož k ní není potřeba tolika drahých a pro životní prostředí mnohdy nebezpečných chemikálií, jako je tomu např. u HPLC, MS či imunoanalytických stanovení. Obvykle také není nutná nějaká složitější úprava vzorku, jako je např. derivatizace.

Homocystein je díky své struktuře pozoruhodná aminokyselina. Ve své molekule obsahuje síru, díky níž je pro život nepostradatelný. Pokud je ale v plazmě přítomný ve zvýšené koncentraci (tzv. hyperhomocysteinémie), může být pro organismus velmi nebezpečný, jelikož je zapojen do etiopatogeneze celé řady onemocnění, z nichž nejzávažnější je vznik trombů a embolů vedoucích k infarktům, mrtvicím a emboliím, případně až ke smrti.

Vědci zjistili, že v podstatě u každého onemocnění (ne však u virových a bakteriálních infekcí) je hladina homocysteinu zvýšená, přestože mnohé účinky jeho působení nejsou ještě zcela objasněny.

Klíčová slova: Infračervená spektrometrie, homocystein, hyperhomocysteinémie.

Summary

The aim of my thesis was to try to identify, and possibly also to quantify, the amino acid homocysteine in plasma using infrared spectrometry.

Infrared spectrometry is an analytical method which is started to consider in connection with clinical practice, since it is not necessary for many expensive and often environmentally hazardous chemicals, such as e.g. by HPLC, MS or immunoassay determination. Usually it is also not necessary a complicated sample preparation, such as e.g. derivatization.

Homocysteine is remarkable amino acid due to its structure. It contains sulfur in its molecule, which makes it indispensable for life. However, if the homocysteine is presented in plasma in increased concentration (hyperhomocysteinemia) it may be very dangerous for the organism, since it is involved in the etiopathogenesis of many diseases, the most serious is the formation of thrombi and emboli leading to heart attacks, strokes and embolisms optionally up to death.

Scientists have discovered that substantially each disease (but not in viral and bacterial infections) is elevated homocysteine level, although many of the effects of its action are not yet fully understood.

Keywords: Infrared spectrometry, homocysteine, hyperhomocysteinemia.

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, že práce je prezenčně zpřístupněna v knihovně Katedry analytické chemie, Přírodovědecké Fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci dne

.....

Vlastnoruční podpis

Ráda bych upřímně poděkovala vedoucímu své práce, panu prof. RNDr. Juraji Ševčíkovi, Ph.D., a také panu Ing. Davidovi Mildemu, Ph.D. za jejich čas, pomoc, ochotu a rady, které mi poskytli během psaní mé práce.

Také bych chtěla poděkovat panu prof. RNDr. Tomáši Adamovi, Ph.D. a celé Laboratoři dědičných metabolických poruch Fakultní nemocnice Olomouc nejen za poskytnutý materiál, ale paní RNDr. Evě Hlídkové také za cenné rady při psaní mé práce. Dále bych ráda poděkovala paní laborantce Haně Staškové za ochotu při shánění chemikálií a dalšího materiálu, který jsem ke své práci potřebovala.

Velký dík patří také mé rodině a blízkým za jejich podporu a trpělivost.

Obsah

Obsah	6
1. Úvod	10
2. Teoretická část	11
2.1 Infračervená spektroskopie.....	11
2.1.1 Princip a rozdělení infračervené spektroskopie.....	11
2.1.1.1 Infračervené záření	12
2.1.1.2 Rozdělení infračervené spektroskopie	12
2.1.1.3 Princip infračervené spektroskopie.....	14
2.1.2 Instrumentace	17
2.1.2.1 Disperzní infračervené spektrometry.....	17
2.1.2.2 Nedisperzní infračervené spektrometry	19
2.1.2.3 Infračervené spektrometry s Fourierovou transformací (IČ interferometry, FT-IR) .	19
2.1.3 Způsoby zápisu infračervených spekter	20
2.1.4 Techniky měření infračervených spekter	22
2.1.4.1 Transmisní (transmitanční) techniky.....	22
2.1.4.2 Odrazové (reflexní, reflektanční) techniky.....	26
2.2 Homocystein.....	31
2.2.1 Význam homocysteinu pro organismus	31
2.2.1.1 Přenos CH ₃ skupiny – methylace.....	32
2.2.1.2 Zapojení do dýchacího řetězce.....	32
2.2.2 Metabolismus homocysteinu.....	33
2.2.2.1 Methioninový cyklus	33
2.2.2.2 Remethylace homocysteinu	34
2.2.2.3 Transsulfurace homocysteinu	37
2.2.3 Regulace metabolismu homocysteinu	37
2.2.4 Poruchy metabolismu homocysteinu	37
2.2.5 Homocystein v tělních tekutinách.....	39
2.2.5.1 Homocystein thiolakton	40
2.2.6 Hyperhomocysteinémie a její komplikace	42
2.2.7 Stanovení homocysteinu	43

2.2.7.1	Faktory ovlivňující koncentraci homocysteinu při odběru krve	44
2.2.7.2	Odběr krve	45
2.2.7.3	Stabilita homocysteinu v krvi, plazmě a séru	45
2.2.8	Metody stanovení homocysteinu	46
2.2.9	Separáční metody	49
2.2.9.1	Chromatografické metody	49
2.2.9.2	Kapilární elektroforéza (CE)	50
2.2.10	Enzymatick� metody	51
2.2.11	Imunoanalytické metody (imunochemick� metody)	51
3.	Experiment�ln� �st	53
3.1	Chemikálie	53
3.2	Přístroje	53
3.3	Infra�erven� spektrometr	54
3.4	Měření a vyhodnocování infračervených spekter v MIR	54
3.4.1	Měření infračervených spekter	54
3.4.1.1	Měření tabletkovou (KBr) technikou	54
3.4.1.2	Měření technikou zeslaben� tot�ln� reflexe (ATR)	55
3.4.2	Nastaven� I� spektrometru pro techniku KBr tablety	55
3.4.3	Nastaven� I� spektrometru pro techniku ATR	56
3.4.4	Vyhodnocování a interpretace infračervených spekter	58
3.4.4.1	Spektra standardů měřen� tabletkovou metodou	58
3.4.4.2	Spektra vzorků plazmy měřen� technikou ATR	58
3.5	Příprava standardů a vzorků	59
3.5.1	Příprava KBr tablety pro měření pozadí	59
3.5.2	Příprava KBr tablety pro měření standardů	59
3.5.3	Příprava vzorků plazmy pro měření technikou ATR	60
3.5.4	Příprava vzorků plazmy ve fakultní nemocnici	61
3.6	Opakování pokusu z článku Analysis of plasma homocysteine levels among patients with chronic renal failure - A spectroscopic approach	62
3.6.1	Moje provedení	62
3.7	Izolace methionyl, leucyl a isoleucyl - tRNA synthetasy z pekařského droždí	63
3.8	Syntéza homocystein thiolaktonu vyizolovanými enzymy	64
3.9	Příprava homocystein thioaktonu zahříváním	65

3.9.1	Moje provedení syntézy zahříváním	66
3.9.1.1	Příprava chemikálií	66
3.9.1.2	Vlastní provedení pokusu.....	67
3.9.1.3	Další pokusy pro optimalizaci.....	69
3.9.1.4	Kalibrační řada homocysteinu pro HPTLC	72
3.9.1.5	Kalibrační řada homocystein thiolaktonu pro HPTLC.....	72
3.9.1.6	Pokusy s dithiothreitem	73
3.9.1.7	Pokusy s 2 - merkptoethanolem	74
3.9.2	Pokusy s plazmou	75
3.10	Syntéza homocystein thiolaktonu za účasti platiny jako katalyzátoru	78
3.11	Měření a vyhodnocování infračervených spekter v NIR	80
3.11.1	Měření infračervených spekter	80
3.11.2	Nastavení IČ spektrometru pro měření v NIR	81
3.11.3	Vyhodnocování a interpretace infračervených spekter	82
3.11.3.1	Spektra standardů	82
3.11.3.2	Spektra plazmy	82
3.12	Příprava standardů a vzorků	83
3.12.1	Příprava standardů.....	83
3.12.2	Příprava vzorků.....	83
3.13	Kvantifikace homocystein thiolaktonu v programu TQ Analyst.....	84
4.	Výsledky a diskuze.....	85
4.1	Vyhodnocení a interpretace infračervených spekter.....	85
4.1.1	Spektra standardů měřená tabletkovou metodou	85
4.1.2	Spektra vzorků plazmy měřená technikou ATR.....	86
4.2	Opakování pokusu z článku Analysis of plasma homocysteine levels among patients with chronic renal failure - A spectroscopic approach.....	87
4.3	Izolace methionyl, leucyl a isoleucyl - tRNA synthetasy z pekařského droždí a následná syntéza homocystein thiolaktonu vyizolovanými enzymy	89
4.4	Příprava homocystein thiolaktonu zahříváním	91
4.4.1	Kalibrační řada homocysteinu a homocystein thiolaktonu pro HPTLC.....	91
4.4.2	Pokusy s dithiothreitem	92
4.4.3	Pokusy s 2 – merkptoethanolem	94
4.4.4	Pokusy s plazmou	95

4.5 Syntéza homocystein thiolaktonu za účasti platiny jako katalyzátoru	97
4.6 Vyhodnocování a interpretace infračervených spekter v NIR.....	98
4.6.1 Spektra standardů	98
4.6.2 Spektra plazmy	99
4.7 Kvantifikace homocystein thiolaktonu v programu TQ Analyst.....	100
5. Závěr	101
6. Literatura.....	102
7. Seznam použitých zkratk	107
8. Přílohy	110

1. Úvod

Sírná aminokyselina homocystein byla sice objevena už na počátku 30. let 20. století, ovšem pozornost vědců a lékařů zaujala až o 30 let později, kdy americký lékař Kilmer McCully přišel na souvislost mezi těžkou hyperhomocysteinémií (homocystinurií) a tromboembolickým onemocněním. Veškeré své poznatky a teorie nejen o homocysteinu, ale také o cholesterolu, shrnul do knihy s názvem *The Homocysteine Revolution: Medicine for the New Millenium* (1967).

Výzkum homocysteinu, jeho metabolismu, účinků na lidský organismus a možnosti jeho stanovení, byl největší v 90. letech 20. století a na počátku století následujícího. Nyní už zájem o něj relativně opadáva, jelikož se lékaři a vědci nemohou shodnout, zda jsou i mírná a středně těžká hyperhomocysteinémie vysokým rizikovým faktorem pro rozvoj tromboembolického onemocnění, či nikoliv.

Jejich pozornost je věnována zejména pacientům s těžkou hyperhomocysteinémií, u kterých byla tato souvislost prokázána.

2. Teoretická část

2.1 Infračervená spektroskopie

Infračervená spektroskopie je nedestruktivní spektrální analytická metoda ^{1, 2, 15}, která slouží k identifikaci zejména organických látek, ale využití našla také při analýzách látek anorganických ^{1, 2}. Můžeme jí proměřit látky pevné, kapalné i plynné ^{1, 2, 3, 11, 13}, a proto je v současnosti běžně používanou analytickou metodou jak v laboratořích kontrolních, tak i ve výzkumných laboratořích ^{1, 2, 3}. Lze ji využít jak pro kvalitativní, tak pro kvantitativní analýzu.

Při kvalitativních analýzách se využívá k identifikaci strukturních jednotek v analyzovaném vzorku známé i neznámé látky. Pokud je analyzovaným vzorkem známá látka, tak se dokazuje její přítomnost v daném vzorku a naopak pokud jde o neznámou látku, tak se infračervená spektroskopie využívá k určení charakteristických funkčních skupin dané látky ^{2, 15}.

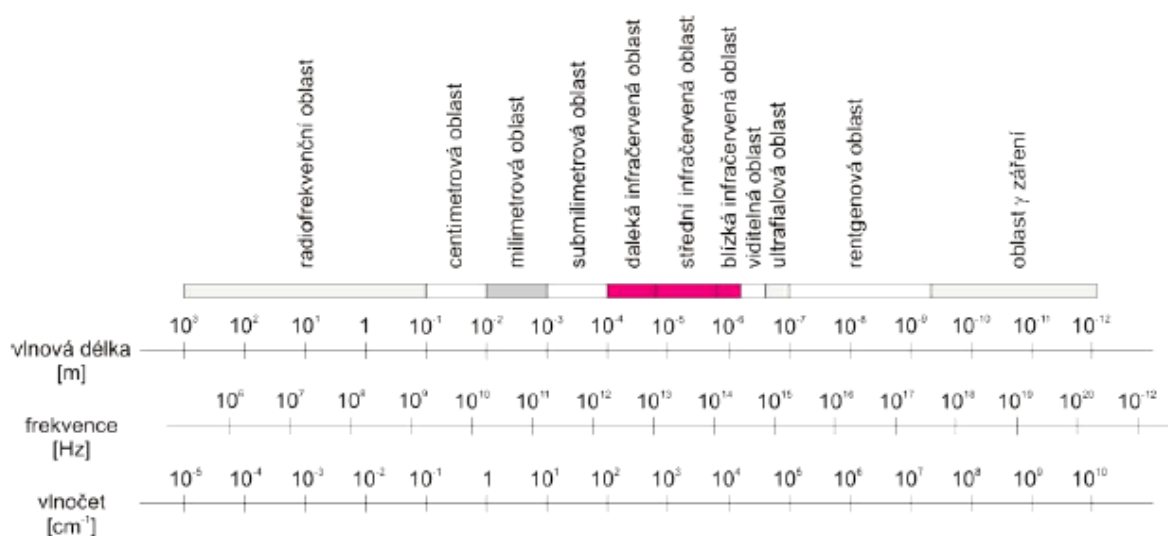
Kvantitativní analýza je, co se týče provedení a vyhodnocení, složitější, jelikož se pro stanovení obsahu nedá použít výpočet podle Lambert – Beerova zákona. Pokud je potřeba stanovit obsah látky ve vzorku, tak se využívají chemometrické metody, u nichž je hlavní důraz kladen na vytvoření kalibračního modelu. K tomu se využívá zejména analýza hlavních komponent (PCA) a dále metoda regrese hlavních komponent (PCR) nebo metoda nejmenších čtverců (PLS) ³.

2.1.1 Princip a rozdělení infračervené spektroskopie

Podstatou infračervené spektroskopie je interakce fotonů infračerveného záření s molekulami látky, na kterou toto záření dopadá ^{1, 2, 9}. Podle toho, zda látka po interakci fotony přijme nebo vyzáří, pak jde o absorpční infračervenou spektroskopii (látka fotony pohltí) nebo o emisní infračervenou spektroskopii (látka fotony vyzáří) ⁴.

2.1.1.1 Infračervené záření

Infračervené záření je neviditelné elektromagnetické vlnění, které sahá od červené oblasti viditelného záření až po oblast mikrovln ^{1,2}. Tomuto rozsahu odpovídají vlnové délky asi 780 nm – 1000 μm, častěji se však tyto hodnoty udávají jako vlnocet $\tilde{\nu}$ – těmto vlnovým délkám odpovídají vlnocety zhruba 12821 – 10 cm⁻¹ (Obr. 1) ³. Tyto hodnoty ale nejsou jednoznačně vymezeny, u jednotlivých autorů se mohou trochu lišit z toho důvodu, že hranice vymežující infračervené záření v elektromagnetickém spektru nejsou přesně stanoveny ^{3,4}.



Obrázek 1: Elektromagnetické spektrum (převzato z <http://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infračervená+spektrometrie.pdf>)

2.1.1.2 Rozdělení infračervené spektroskopie

Infračervená oblast se dělí na blízkou (Near Infrared Region), střední (Middle Infrared Region) a vzdálenou (Far Infrared Region) IČ oblast (Tab. I) ^{1, 2, 3}. Střední IČ oblast je někdy nazývána jako vlastní IČ oblast, jelikož je nejlépe probádaná a tím i nejvíce využívaná ¹.

Tabulka I: Rozdělení jednotlivých oblastí podle vlnových délek a příslušných vlnočtů (hodnoty převzaty z Muselík J.: Chem. Listy 106, 10 (2012) - článek se odkazoval na Český lékopis z roku 2005)

IČ oblast	Zkratka	Rozsah vlnových délek [μm]	Rozsah vlnočtů [cm^{-1}]
blízká	NIR	0,780 – 2,5	12821 - 4000
střední	MIR	2,5 – 50	4000 - 200
vzdálená, daleká	FIR	50 – 1000	200 - 10

- **NIR**

Blízká IČ oblast je oblast blízkého infračerveného záření, což je záření v rozsahu vlnových délek 780 – 2500 nm, respektive oblast vlnočtů 12821 – 4000 cm^{-1} ³. Jiný zdroj uvádí rozsah blízkého infračerveného záření v rozmezí vlnových délek 800 – 2500 nm a rozsah vlnočtů 12500 – 4000 cm^{-1} ⁵. Absorpce záření v této oblasti je způsobena nejčastěji kombinačními a násobnými přechody (tzv. overtóny) vazeb C-H, O-H, S-H a N-H, jejichž pravděpodobnost vzniku je mnohem menší, než je pravděpodobnost vzniku základních (tzv. fundamentálních) přechodů v MIR, a proto mohou mít spektra v této oblasti až 1000x nižší intenzitu než spektra v MIR ^{3,5}. Měření je rychlé a relativně jednoduché, jelikož obvykle vzorek před analýzou nevyžaduje žádnou speciální úpravu, takže se minimalizuje spotřeba chemikálií a jednorázových analytických setů a tím jsou menší také dopady na životní prostředí. Navíc se vzorky mohou měřit přímo ve skleněných obalech, někdy lze také proměřit i vzorky v některých transparentních plastových obalech ⁵.

Tato oblast slouží pro kvalitativní i kvantitativní analýzu, v obou případech se k následnému zpracování a vyhodnocení používají metody chemometrie ^{3,5}.

- **MIR**

Střední IČ oblast je oblast infračerveného záření v rozsahu vlnových délek 2500 – 50000 nm, respektive oblast vlnočtů 4000 – 200 cm^{-1} ³, někdy se uvádí rozsah vlnočtů 4000 – 400 cm^{-1} ^{1,6}.

Oblast MIR se dále dělí na oblast charakteristických vibrací (vlnočtů) funkčních skupin a na oblast otisku palce, tzv. fingerprint region^{1, 6}. Rozsah vlnočtů oblasti charakteristických vibrací je $4000 - 1500 \text{ cm}^{-1}$, respektive $4000 - 1250 \text{ cm}^{-1}$ ⁶. Oblast otisku palce, v níž se projevují převážně deformační vibrace a skeletální vibrace (vibrace zbytku molekuly bez charakteristických funkčních skupin), méně často pak valenční vibrace těžších atomů, zahrnuje vlnočty $1500 - 400 \text{ cm}^{-1}$, respektive $1250 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ⁶.

Záření této oblasti je molekulami ozařovaných látek absorbováno nejčastěji, proto je tato oblast velmi hojně využívána¹. Slouží zejména k identifikaci čistých látek (hlavně látek organických) a k určení strukturního uspořádání v molekule^{3, 6}.

- **FIR**

Vzdálená IČ oblast je oblast infračerveného záření v rozsahu vlnových délek $400 - 10 \text{ cm}^{-1}$, která je jen zřídka využívána pro objasnění struktury sloučenin. Projevují se zde vibrace nejen těžkých atomů zejména anorganických sloučenin, ale také vibrace slabých vodíkových vazeb¹³.

2.1.1.3 Princip infračervené spektroskopie

Jak již bylo řečeno, podstatou infračervené spektroskopie je interakce fotonů infračerveného záření s molekulami analyzované látky. Energie těchto fotonů je pouze $1 - 60 \text{ kJ.mol}^{-1}$, proto nemohou vybudit elektrony v molekulových orbitalech. Tato energie je dostatečná pouze k excitaci molekul do vyšších vibračních a rotačních stavů^{2, 4}.

Atomy tvořící molekulu jsou navzájem spojeny vazbami, které nejsou rigidní⁴. Naopak tyto vazby vykazují určitou pružnost, a proto mohou atomy v molekule vibrovat kolem své rovnovážné pozice, přičemž frekvence vibrací závisí nejen na síle vazby a vzdálenosti vázaných atomů, ale také na hmotnosti příslušné molekuly^{2, 4, 10}.

- **Pohyby molekul**

Každá molekula se v prostoru pohybuje. Může vykonávat několik typů pohybů – translační, vibrační a rotační^{1, 2, 4}. Za normálního stavu jsou tyto pohyby molekulou vykonávány na základní energetické úrovni, která má určitou hodnotu. Pokud je

ale molekulou absorbován foton infračerveného záření s určitou energií, tak může molekula přejít na vyšší energetickou hladinu a vykonávat na ní vibrační a rotační pohyby. K přechodu na vyšší energetickou hladinu ale může dojít pouze tehdy, pokud je energie absorbovaného fotonu rovna přesně rozdílu energetických hladin, mezi nimiž k excitaci dochází ^{1, 10}.

$$\Delta E = h \cdot \nu \text{ (cit. }^{11}\text{)},$$

kde ΔE je rozdíl energií excitované a základní hladiny přechodu molekuly, h je Planckova konstanta a ν je frekvence emise nebo absorpce fotonu infračerveného záření ¹¹.

Mezi jednotlivými hladinami jsou povoleny pouze ty přechody, které vyhovují výběrovému pravidlu – dochází při nich ke změnám kvantových čísel charakterizujících jednotlivé energetické hladiny. V případě rotačních pohybů dochází ke změně kvantového čísla o ± 1 , zatímco v případě vibračních pohybů se kvantové číslo mění o 1, 2, 3 atd. ^{1, 10}.

Excitace pouze rotačního pohybu je možná pouze tehdy, když je fotonům infračerveného záření vystavena látka v plynném skupenství, jejíž molekuly si při rotacích vzájemně nepřekáží. U látek v kapalném a pevném skupenství hrají roli i pohyby vibrační ¹, které si lze představit jako periodické změny mezijaderné vzdálenosti mezi vázanými atomy ^{2, 4}.

Pokud je molekula tvořena N atomy, tak má $3N$ stupňů volnosti ^{2, 4, 10, 11, 13}. Tři z celkového počtu těchto pohybů přísluší translačnímu pohybu těžiště molekuly ve směru os x , y a z . Další tři pohyby v případě nelineární molekuly (v případě lineární molekuly dva) jsou určeny pro popis rotačního pohybu molekuly a zbývající pohyby přísluší vibračním pohybům molekuly ^{2, 4, 10, 13}.

Tyto vibrační pohyby molekuly se nazývají vibrační stupně volnosti. Pro lineární molekulu se počet vibračních stupňů volnosti vypočítá podle vztahu $3N - 5$ a pro nelineární molekulu se jejich počet vypočítá dle vztahu $3N - 6$ ^{1, 2, 4, 10, 11}.

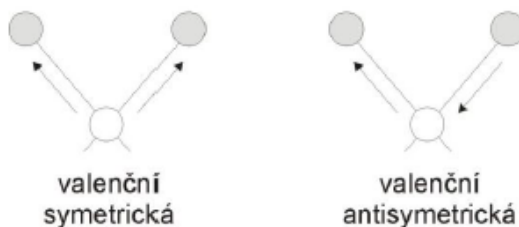
- **Typy vibrací**

Vibrace jsou pohyby, během nichž se mění buď délka vazby, nebo vazebný úhel ¹. Pokud se mění pouze délka vazeb a vazebné úhly zůstávají zachovány, jde o valenční vibrace.

Pokud ale dochází ke změně úhlů mezi vazbami, zatímco vzdálenost jader vázaných atomů se nemění, jde o vibrace deformační.

Valenční vibrace mohou být symetrické a antisymetrické (Obr. 2) ^{1, 2, 4, 10, 11}. Symetrické valenční vibrace jsou ty vibrační pohyby, u kterých dochází k současnému prodlužování a zkracování všech vazeb, zatímco v případě antisymetrických valenčních vibrací se některé vazby současně prodlužují, ale alespoň jedna z vazeb se v ten samý okamžik zkracuje ^{1, 2, 4, 10}.

Frekvence valenčních vibrací je vždy vyšší než frekvence, která odpovídá deformačním vibracím stejné funkční skupiny. To je způsobeno tím, že na natáhnutí vazby mezi jádry vázaných atomů, je třeba dodat více energie než na její ohnutí ^{2, 4}.

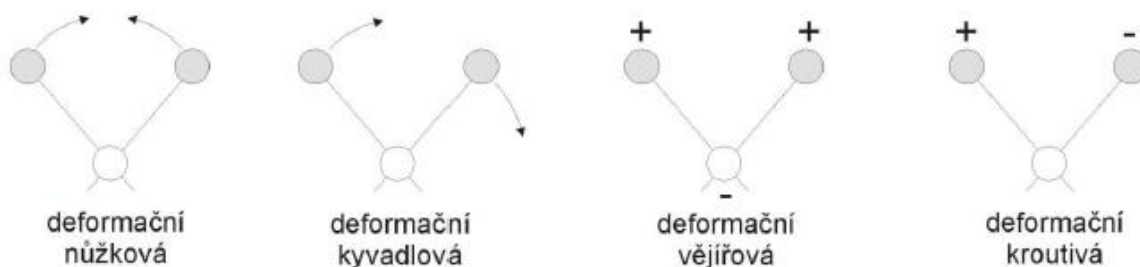


Obrázek 2: Znárodnění symetrického a antisymetrického valenčního vibračního pohybu (převzato z <http://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infračervená + spektrometrie.pdf>)

Deformační vibrace se dělí na vibrace rovinné a mimorovinné ^{1, 2, 4, 10, 11}. Mezi rovinné vibrace řadíme nůžkové a kyvadlové vibrace, zatímco mezi mimorovinné vibrace patří vibrace kroutivé a vějířové (Obr. 3) ^{1, 2, 4, 10}.

Základní podmínkou pro to, aby byla jakákoliv vibrace v infračerveném spektru pozorovatelná (tzv. aktivní), je změna dipólového momentu ^{1, 2, 11}. Čím je tato změna větší, tím je daný absorpční pás v infračerveném spektru výraznější ^{1, 11}. Tato podmínka souvisí s tím, že elektrický vektor fotonu infračerveného záření může interagovat pouze s elektrickým dipólem dané molekuly. To znamená, že pokud vibrující molekula nevykazuje změnu dipólového momentu, tak nedochází k absorpci fotonu infračerveného záření a vibrace se v IČ spektru neprojeví ¹. Proto jsou ve spektrech obvykle dobře viditelné polární vazby, které jsou

snadno polarizovatelné, jako je např. vazba C=O, zatímco nepolární vazby, např. vazba C=C, v symetrických molekulách absorbují infračervené záření pouze slabě anebo vůbec ².



Obrázek 3: Znázornění rovinného (nůžková a kyvadlová vibrace) a mimorovinného (vějířová a krouťivá vibrace, kde + znázorňuje pohyb atomu před rovinu nákresny a – pohyb atomu za tuto rovinu) deformačního pohybu (převzato z [http://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infračervená +spektrometrie.pdf](http://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infračervená%20spektrometrie.pdf))

2.1.2 Instrumentace

Infračervená spektra se měří pomocí infračervených spektrometrů, které se liší svou konstrukcí. V současnosti jsou k dispozici tři typy přístrojů pro měření infračervených spekter – disperzní IČ spektrometry, nedisperzní IČ spektrometry a interferometrické IČ spektrometry (IČ spektrometry s Fourierovou transformací), které jsou v současnosti velmi rozšířené ^{1,2}.

2.1.2.1 Disperzní infračervené spektrometry

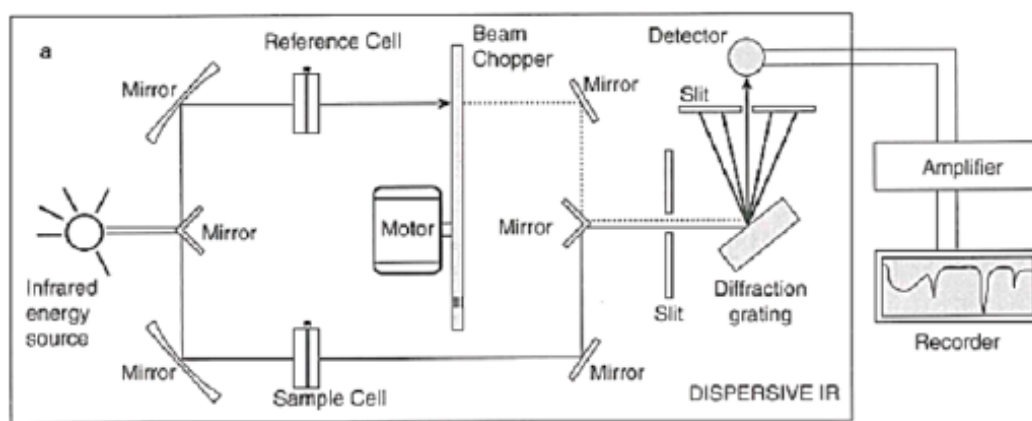
Disperzní IČ spektrometry jsou přístroje obsahující disperzní, rozkladný prvek, tzv. monochromátor ^{1, 10, 11, 14, 15}, který slouží k rozkladu polychromatického infračerveného záření na záření monochromatické ^{1, 10, 14, 15}. Rozkladným prvkem je buď difrakční mřížka, nebo rozkladný hranol ^{1, 10, 15}. Právě díky rozkladnému prvku jsou tyto přístroje nevhodné pro ta měření, která musí být velmi rychlá a citlivá. Použití disperzního přístroje není vhodné například při analýzách eluátu vytékajícího z kolony při kolonové separaci ¹¹.

Zdrojem záření může být keramická tyčinka s navinutým odporovým vláknem, které po nažhavení na teplotu 1000 – 1400 °C emituje IČ záření ^{2, 12}. Dalšími zdroji záření jsou

Nernstova tyčinka zhotovená z oxidů zirkonu, yttria a erbia či thoría nebo Globar, což je tyčinka z karbidu křemíku^{1, 10, 11, 12}. Obě tyto tyčinky po nažhavení na teplotu v rozmezí 1500 – 2000 °C emitují spojité IČ záření, které poté prochází vzorkem¹.

Vzhledem k tomu, že sklo v IČ oblasti absorbuje, musí být veškerá optika i kyvety pro vzorky z materiálů, které IČ záření propouští, ale neabsorbují. Tuto podmínku splňují halogenidy alkalických kovů, např. KBr, NaCl, LiF, CsI, CaF₂, TiBr a mnohé další, z nichž se optika a kyvety vyrábí^{1, 2, 10}.

Disperzní přístroje mohou být jednopaprskové nebo dvoupaprskové. Schéma dvoupaprskového přístroje je na Obr. 4. Ze zdroje vycházející polychromatické IČ záření je rozděleno do dvou paprsků, z nichž jeden prochází srovnávací, referenční celou, v níž je obvykle rozpouštědlo, a druhý měrnou celou se vzorkem^{1, 10, 12, 14}. Následně jdou oba paprsky do monochromátoru s rozkladným prvkem, kde jsou rozloženy na jednotlivé vlnové délky (jednotlivá monochromatická záření)^{1, 10, 14}. Ty poté postupně dopadají na detektor, čímž vyvolají elektrický signál úměrný intenzitě dopadajícího paprsku^{1, 10, 14}. Detektorem mohou být např. různé termočlánky, které jsou často používány, nebo komůrka naplněná zředěným plynem se zrcátkem na stěně, tzv. Golayova cela^{1, 10}.



Obrázek 4: Schéma dvoupaprskového disperzního infračerveného spektrofotometru (převzato z <http://ach.upol.cz/user-files/intranet/06-im-ir-1351625867.pdf>)

2.1.2.2 Nedisperzní infračervené spektrometry

Tyto přístroje jsou analogií k disperzním IČ spektrometrům, od kterých se liší tím, že neobsahují žádný rozkladný prvek (monochromátor). Monochromatické záření vychází přímo ze zdroje, kterým často bývají lasery, např. laserové diody². Laserové diody jsou pevnolátkové vysoce monochromatické lasery, které v současnosti pomalu nahrazují dříve používané plynové vysoce monochromatické lasery⁴.

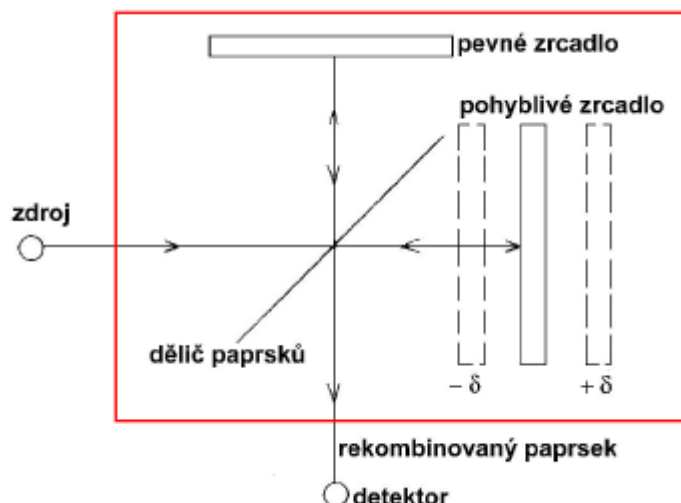
2.1.2.3 Infračervené spektrometry s Fourierovou transformací (IČ interferometry, FT-IR)

Tento typ přístrojů obsahuje místo rozkladného prvku interferometr, nejčastěji Michelsonův interferometr (Obr. 5), jehož základní části jsou dělič paprsků a dvě zrcadla – jedno z nich je pohyblivé, druhé je pevné a vzájemně jsou na sebe kolmé^{1, 2, 10 - 12, 14, 15}.

Zdrojem záření je, stejně jako u disperzních přístrojů, keramická tyčinka, Globar nebo Nernstova tyčinka, která po zahřátí emituje spojitě IČ záření^{2, 11}. Tyto detektory emitují záření v červené oblasti, zatímco pro dalekou oblast se používá vysokotlaká rtuťová lampa a pro oblast blízko lampa wolframohalogenová¹¹.

Infračervené záření dopadá pod úhlem 45° na dělič paprsků, který propustí pouze část spektra (např. střední IČ záření)^{2, 14}. Část záření (50%) děličem projde a dopadne na pohyblivé zrcadlo, zbylá část záření (opět 50%) se od děliče odrazí směrem na pevné zrcadlo^{2, 11, 12, 14}. Od obou zrcadel jsou paprsky odraženy zpátky a na děliči se spolu opět skládají za vzniku rekombinovaného paprsku s jinou intenzitou záření^{2, 10 - 12, 14, 15}. Interference odražených paprsků závisí na poloze pohyblivého zrcadla^{2, 10, 14, 15}, jehož poloha je kontrolována laserem^{10, 15}, nejčastěji He-Ne¹⁰.

Rekombinovaný paprsek prochází přes kyvetový prostor se vzorkem na detektor^{2, 10, 14}, na který jsou kladeny vysoké nároky, jelikož musí mít velmi rychlou odezvu (odezva u FT-IR musí být daleko rychlejší než odezva u disperzních a nedisperzních přístrojů). Detektorem, který požadavek na velmi rychlou odezvu splňuje, je triglycinsulfátový pyroelektrický detektor (TGS), případně fotovodivostní detektor ze směsi teluridu rtuti a kadmia^{1, 10}.



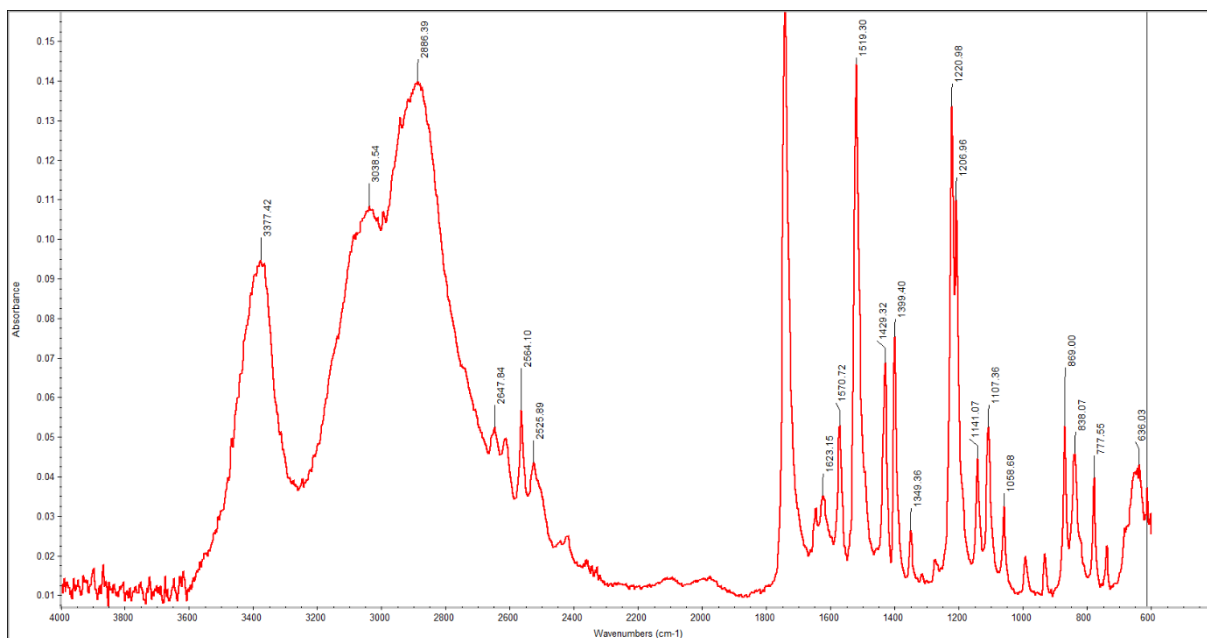
Obrázek 5: Schéma Michelsonova interferometru (převzato z [http://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infračervená + spektrometrie.pdf](http://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infračervená%20spektrometrie.pdf))

Grafickým záznamem z tohoto spektrometru je interferogram ^{1, 10, 12, 14, 15}, což je závislost intenzity IČ záření prošlého vzorkem na vychýlení pohyblivého zrcadla ^{1, 15}. V každém interferogramu jsou obsaženy veškeré spektrální informace, protože signál dopadající na detektor je součtem všech možných interferencí při všech možných frekvencích ^{2, 10, 15}. Z jednotlivých naměřených interferogramů je spočítán průměrný interferogram, který je pomocí matematické operace nazvané Fourierova transformace převeden na klasický záznam infračerveného spektra (nejčastěji jde o závislost transmitance na vlnočtu) ^{1, 2, 10, 14, 15}.

2.1.3 Způsoby zápisu infračervených spekter

Infračervené spektrum je grafický záznam o absorpci nebo emisi fotonů infračerveného záření analyzovanou látkou. K absorpci fotonu dochází pouze tehdy, pokud se velikost energie IČ záření přesně rovná rozdílu energetických hladin. Ve spektrech se po pohlcení fotonů objeví absorpční pásy, které jsou IČ spektrometry měřeny v závislosti na vlnové délce λ (μm) nebo na vlnočtu $\tilde{\nu}$ (cm^{-1}) ^{1, 2, 4}.

IČ spektrum je tedy závislost absorbance A, transmittance (propustnosti) T nebo reflektance R na vlnočtu $\tilde{\nu}$, případně na vlnové délce λ (ukázka IČ spektra Obr. 6) ^{1,2,4}.



Obrázek 6: Infračervené spektrum polystyrenu, ukazuje závislost absorbance na vlnočtu v oblasti MIR – rozsah vlnočtů je $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ (měřeno dne 4. 11. 2015 na FT-IR spektrometru ThermoNicolet Nexus 6700)

Absorbance je definovaná jako dekadický logaritmus poměru intenzity paprsku I_0 dopadajícího na vzorek a intenzity paprsku I , který vzorkem prošel. Absorbance se používá tehdy, pokud je nutná kvantifikace analytu ^{1,4} nebo u spekter, která jsou měřena ve vzdálené IČ oblasti ².

$$A = \log (I_0/I) = \log (1/T) \text{ (cit. } ^{1,2})$$

Propustnost, transmittance je definována jako poměr intenzity paprsku I , který vzorkem prošel a intenzity paprsku I_0 dopadajícího na vzorek. Transmittance se obvykle udává v procentech a slouží ke kvalitativnímu určení dané látky ^{1,2,4}.

$$T = I/I_0 \text{ (cit. } ^{1,2})$$

Reflektance je definována jako poměr intenzity paprsku I_{odraz} , který se od vzorku odrazil a intenzity paprsku I_0 dopadajícího na vzorek ⁴.

$$R = I_{\text{odraz}}/I_0 \text{ (cit. } ^4)$$

2.1.4 Techniky měření infračervených spekter

IČ spektroskopie je metoda, pomocí níž se dají analyzovat vzorky plynné, kapalné i pevné. K jejich měření existují různé metody, které se volí nejen podle povahy vzorku, ale také podle toho, jaké spektrální informace potřebujeme ze vzorku získat ^{1,2, 10}.

2.1.4.1 Transmisní (transmitanční) techniky

Principem těchto technik je přímý průchod infračerveného záření ozařovaným vzorkem ^{2, 8, 9, 11, 16}, z čehož vyplývá jejich výhoda – možnost měřit pomocí nich analyzované vzorky ve všech třech skupenstvích uvedených výše ^{2, 10, 11, 16}.

Vzorky se nejčastěji měří v kyvetách z materiálů propustných pro infračervené záření. Tuto podmínku splňují například chlorid sodný nebo bromid draselný, z nichž se kyvety vyrábí nejčastěji, jelikož jsou propustné pro IČ záření v širokém rozmezí infračerveného spektra. Kyvety zhotovené z těchto materiálů ale mají tu nevýhodu, že se rozpouští v polárních látkách, jako je voda, kyseliny, alkoholy a mnohé další látky.

Proto musely být vyvinuty také kyvety z jiných materiálů, které jsou odolné a nerozpouští se. Takovými materiály jsou například směsný krystal jodidu a bromidu thallného (KRS-5). Jeho použití má také své nevýhody, jelikož jde o toxický materiál s vysokým indexem lomu. Dále se používá chlorid stříbrný, který je ale citlivý na světlo, nebo směsný krystal ZnSe.

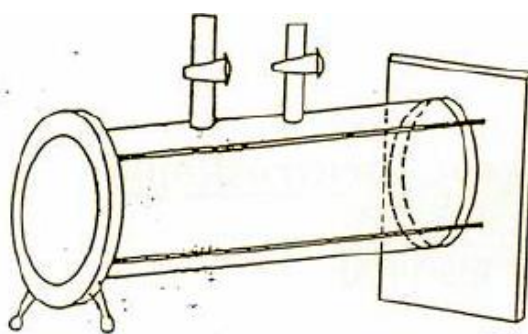
Kyvety zhotovené z jodidu cesného, případně z bromidu cesného, našly využití při měření vzorků ve vzdálené oblasti infračerveného spektra ¹⁶.

- **Měření plynných vzorků**

Analýza plynů pomocí infračervené spektroskopie se uplatňuje jednak při monitorování životního prostředí a jednak také při určování koncentrací plynných látek

v komerčních produktech a procesech, přičemž koncentrace, které je IČ analyzátor schopen detekovat, jsou v hodnotách ppb ¹⁷.

Plynné vzorky se měří v plynových kyvetách ^{2, 16, 18}, jejichž optická dráha může být 10 cm až 100 m ¹⁸. Plynová kyveta je skleněný váleček se dvěma plnicími otvory, na jehož obou koncích jsou okénka z materiálu, který propouští infračervené záření (náčres plynové kyvety Obr. 7) ^{11, 16}. Těmito materiály mohou být například ZnSe, KBr, BaF₂ a další ¹⁸. Plnicí otvory jsou opatřeny ventily, které slouží k evakuaci kyvety a k nasávání analyzovaných plynů podtlakem ¹⁶.



Obrázek 7: Plynová kyveta s optickou dráhou 10 cm (převzato z <http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/ftir.pdf>)

Pokud se analyzují plyny, které jsou ve vzorku přítomny pouze ve stopových koncentracích, tak se používají kyvety, v nichž jsou soustavy zrcadel, která umožňují mnohonásobný průchod paprsku. Tím je dosaženo optické dráhy v rozsahu až desítek metrů a analýzy vzorku ¹⁶.

- **Měření kapalných vzorků**

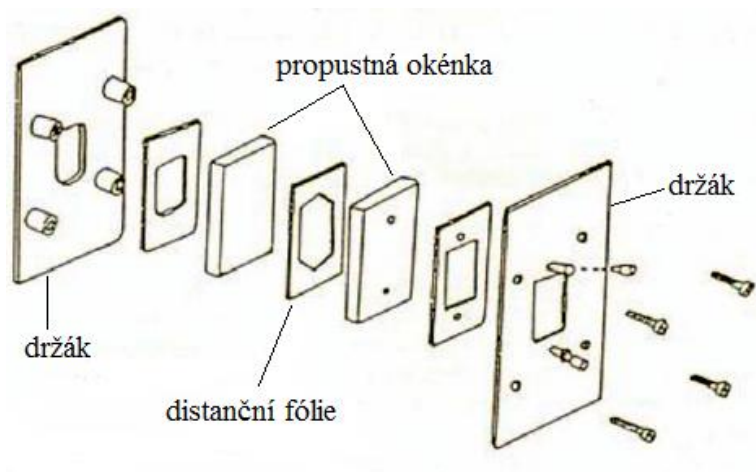
Infračervená spektroskopie se k měření kapalin využívá velmi často. Měří se pomocí kapalných vzorků i roztoků původně pevných látek, které se rozpustí ve vhodném rozpouštědle ¹⁶.

K měření kapalných vzorků se používají buď kapalinové kyvety, nebo se měřená kapalina nanese jako tenká vrstva mezi dvě okénka, či na polymerní porézní nosič ². Kapalinová kyveta je složena z několika částí (Obr. 8) ¹⁶. Jejím základem jsou dvě pro IČ

záření propustná okénka, která jsou obvykle oddělena distanční fólií, jež bývá zhotovena například z teflonu nebo hliníku. Obě okénka jsou umístěna v kovovém plášti, který slouží jako jejich držák. Z jedné strany jsou v držáku i v propustném okénku vyvrtány dva otvory, které slouží k dávkování analyzovaného vzorku. Vzorek se do kyvety dávkuje pomocí injekční stříkačky, která se zasune do jednoho z vyvrtaných otvorů, přičemž druhým otvorem z kyvety odchází vzduch a později případný přebytečný vzorek ^{11, 16}.

Pro měření velmi zředěných roztoků se používají speciální kyvety, které se od běžně používaných kyvet liší svou tloušťkou. Dále je možné vzorek proměřit také technikou kapilární vrstvy, během níž není mezi propustnými okénky distanční fólie, tudíž je vzorek analyzované kapaliny stlačen pouze mezi okénky ¹⁶.

Při volbě rozpouštědla pro měření roztoků musíme brát v úvahu to, že každé rozpouštědlo v IČ oblasti absorbuje záření určitých vlnových délek, respektive vlnočtů, takže ve spektru uvidíme nejen absorpční pásy molekul vzorku, ale také pásy rozpouštědla. Proto je nutné dát pozor na to, aby mělo rozpouštědlo co největší propustnost infračerveného záření v co nejširším rozsahu IČ spektra a zároveň nereagovalo s rozpouštěnou látkou a navíc bylo inertní vůči materiálu, z něhož jsou zhotovena propustná okénka kyvet ^{1, 10, 11, 16}.



Obrázek 8: Kapalinová kyveta (převzato z <http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/ftir.pdf> a upraveno v programu Malování)

Uvedené podmínky nejlépe splňují nepolární rozpouštědla s malým dipólovým momentem a symetrickou molekulou, jako je například sirouhlík, tetrachlormethan a případně i chloroform^{1, 10, 16}. Dají se použít také cyklohexan nebo aceton, i když mají jednu velkou nevýhodu, kterou je přítomnost velkého množství absorpčních pásů ve spektru¹⁶. Zcela nevhodné je použití vody jako rozpouštědla, jelikož velmi silně absorbuje IČ záření^{1, 11} a navíc rozpouští okénka vyrobená z alkalických halogenidů, jako je například chlorid sodný¹¹.

- **Měření pevných vzorků**

Pevné vzorky lze proměřit několika způsoby. Nejčastěji používanými technikami jsou tabletkové a suspenzní techniky. K proměření spekter pevných vzorků se dají použít také kyvety s okénky z NaCl, KBr či z polyethylenu. Další možností je přímé měření analyzovaných polymerů ve formě tenké folie^{1, 2}.

Tabletková technika

Principem této metody je smíchání rozmělněného pevného vzorku (obvykle 1 – 5 mg podle velikosti jeho absorpance) s vysušeným bromidem draselným (100 – 200 mg). Vzniklá směs se musí dokonale zhomogenizovat buď ve vibračním mlýnku^{1, 16}, nebo v achátové třecí misce. Zhomogenizovaná směs se poté přenesse do speciální formy a v ní se umístí do lisu, ve kterém dojde za vysokého tlaku k vylisování průhledné tabletky. Tato tabletky se poté umístí do speciálního držáku, v němž dojde k proměření vzorku^{1, 11, 16}.

KBr je pro tuto techniku vhodným optickým materiálem, jelikož v rozsahu vlnočtů 4000 – 600 cm⁻¹ neabsorbuje IČ záření. Přesto je nutné tabletku se vzorkem měřit vůči referentní tabletce vylisované z čistého KBr, která se proměří jako pozadí¹.

Velkou nevýhodou této techniky je to, že během přípravy vzorku může vlivem velkého tlaku v lisu dojít ke změnám v krystalické struktuře látek, tudíž může být výsledné spektrum vzorku zkreslené. Navíc je zde možnost chemické interakce vzorku se zvoleným optickým materiálem, která opět vede ke zkreslení výsledného spektra^{1, 8, 16}. Ve spektrech, která se získají měřením vzorku touto metodou, mohou vadit také absorpční pásy vody, které se v něm objeví v případě, že nejsou chemikálie na přípravu vzorku dostatečně vysušeny¹¹.

Suspenzní technika

Při měření touto metodou se využívá suspenze jemně rozetřené analyzované pevné látky (asi 5 mg) s parafínovým olejem, tzv. nujolem. Vzniklá suspenze se následně nanese mezi dvě okénka z vhodného propustného materiálu a změří se infračervené spektrum.

I tato metoda má několik nevýhod. Samotný nujol absorbuje v oblasti MIR^{1, 16}, tudíž se pro získání úplného IČ spektra kombinuje spektrum měřené suspenze s nujolem se suspenzemi s halogeny, například s tripenem (hexachlorobutadienem), jelikož tyto suspenze ve svých spektrech neobsahují absorpční pásy vibrací skupiny C-H¹⁶.

Navíc je velmi důležité důkladné rozetření vzorku, jinak na krystalcích látky dochází k rozptylu IČ záření, které se ve výsledném spektru projeví chvostováním^{1, 11}, tudíž není možná jeho správná interpretace¹.

2.1.4.2 Odrazové (reflexní, reflektanční) techniky

Původně byly tyto techniky vyvinuty pro měření vzorků, které nepropouštěly IČ záření. Takovými vzorky byly zejména neprůhledné pevné materiály. V současnosti se reflexními technikami měří jak vzorky pevných látek, tak i kapalně vzorky, přičemž výběr konkrétní techniky závisí na jejich charakteru^{1, 2, 16}.

- **Metoda zeslabené úplné reflexe –ATR (Attenuated Total Reflectance)**

Použití této metody je vhodné pro analýzu vzorků, které silně absorbují infračervené záření. Takovéto vzorky jsou nejen vodné roztoky a emulze, ale také další kapalně a viskózní vzorky, gely, polymery, prášky a mnohé další formy^{2, 16}. Ukázalo se, že je vhodná také pro měření biologických tekutin a suchých filmů⁸.

Principem této techniky je násobný úplný odraz infračerveného záření procházejícího krystalem z materiálu s vysokým indexem lomu, s nímž je analyzovaná látka ve velmi těsném kontaktu (Obr. 9)^{2, 9, 16}. Díky tomu záření proniká do analyzovaného materiálu jako tzv. evanescenční vlna. Hloubka tohoto průniku do povrchu vzorku je v řádovém rozmezí μm až mm, tudíž záření charakterizuje pouze tenké povrchové vrstvy. Z toho důvodu se tato technika volí tehdy, pokud je potřeba analyzovat povrch zkoumaného vzorku^{2, 9, 16}.

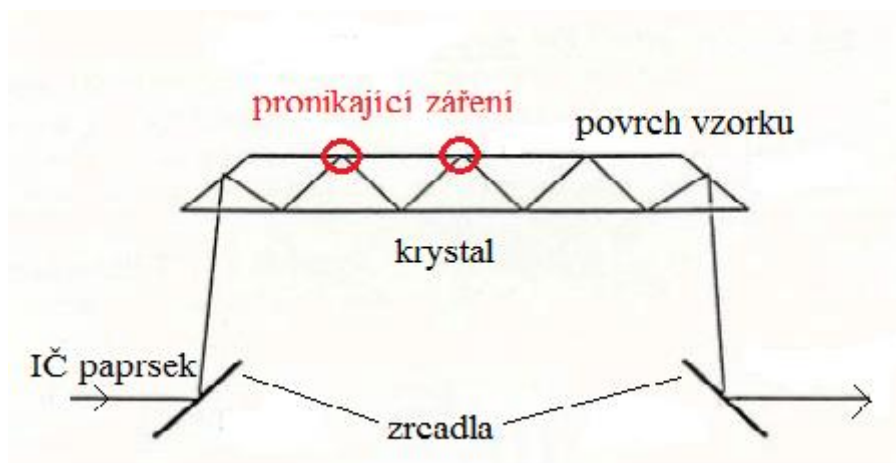
Poté, co vzorek absorbuje záření o určité frekvenci, je tato složka infračerveného paprsku v úplně odraženém záření zeslabena ².

Krystaly mají nejčastěji tvar lichoběžníkového hranolu, jehož měřicí plocha je rovinná ^{2, 16}. Hranol může mít i trojúhelníkový průřez, měřicí plocha je opět planární. Podle tvaru hranolu a geometrie paprsku, která s jeho tvarem souvisí, se rozlišují hranoly jednodrazové a víceodrazové ¹⁶. Mohou být zhotoveny z různých materiálů - existují například krystaly diamantové, ZnSe, safírové, křemíkové, germaniové a mnohé další ^{2, 9, 11, 16}.

Pomocí zrcadel je do krystalu přiváděno infračervené záření ze zdroje tak, aby úhel dopadu záření na fázové rozhraní krystal – vzorek vyhověl podmínce úplného odrazu, čili aby byl úhel dopadu záření Θ menší nebo rovný meznímu úhlu Θ_m ^{2, 16}.

$$\sin \Theta_m = \frac{n_2}{n_1} \text{ (cit. } ^{16}\text{),}$$

kde n_1 je index lomu měřicího krystalu a n_2 je index lomu vzorku ¹⁶.

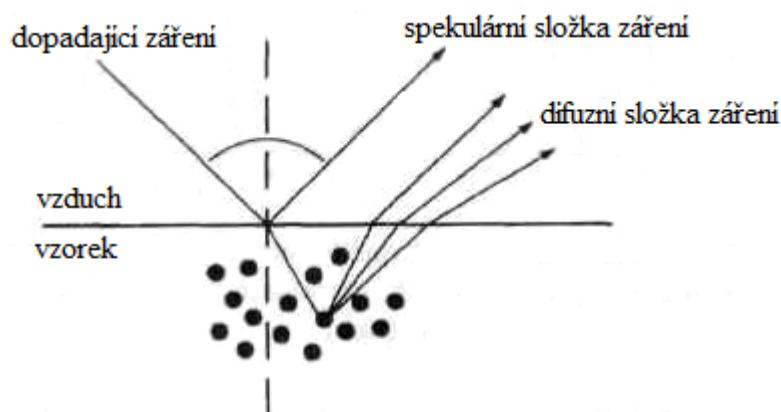


Obrázek 9: ATR krystal, v němž dochází k vícenásobnému odrazu infračerveného paprsku na fázovém rozhraní krystal (opticky hustší prostředí) – vzorek (opticky řidší prostředí) (převzato z <http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/ftir.pdf> a upraveno v programu Malování)

- **Metoda difúzní reflexe – DRIFT, DRIFTS (Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform Spectroscopy)**

Tato technika měření infračervených spekter je vhodná hlavně pro práškové a těžko zpracovatelné pevné vzorky^{2, 7, 11, 16}, jako jsou například kousky laků, půdy nebo zesíťované nerozpustné polymery^{2, 7, 16}. Její výhodou je nejen snadná a rychlá příprava vzorku bez jakýchkoliv destruktivních vlivů, jelikož odpadá nutnost lisování tabletek¹⁶, ale také to, že jde o velmi citlivou metodu vhodnou pro měření i velmi malých množství analytů⁷.

Na pevný práškový vzorek dopadá paprsek infračerveného záření, přičemž část záření je vzorkem absorbována, část je odražena (spekulární reflexe) a část je rozptýlena poté, co do vzorku vstoupí a následně z něj po odrazu opět vystoupí (difúzní reflexe, Obr. 10). Difúzně rozptýlené záření je následně vhodně zvolenou optikou převedeno na detektor, který vyhodnotí informaci o absorpci záření ve vzorku (difuzi záření do vzorku)^{2, 7, 16}.



Obrázek 10: Schéma znázorňující interakci infračerveného záření při měření metodou DRIFT (převzato z Machovič V., Novák F.: Chem. Listy 92, 151 (1998) a upraveno v programu Malování)

Vzorky mohou být měřeny buď přímo, v čisté formě, nebo ve směsích se substráty – vhodné jsou například KBr nebo KCl^{2, 7}. Substráty se při měření DRIFT technikou používají zejména tehdy, pokud je koncentrace analytu ve vzorku vysoká nebo pokud jsou částice moc velké, takže by se zvyšovala spekulární složka záření oproti upřednostňované reflexní

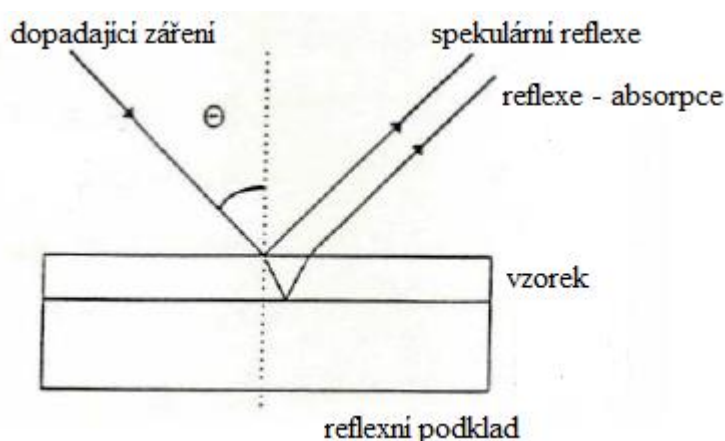
složce ^{2, 7}. Na druhou stranu při smíchání vzorku se substrátem, a jeho následném měření, může být vzorek ovlivněn stopovým množstvím vody v substrátu, případně mezi nimi může docházet k vzájemným reakcím, například k iontové výměně ⁷.

Výsledná spektra nejsou zaznamenána jako klasická závislost absorbance či transmitance na vlnové délce, respektive vlnočtu. Zaznamenávají se v lineárních jednotkách Kubelka – Munk ⁷, které vyjadřují vztah mezi koncentrací vzorku a intenzitou pásů ve spektrech ¹⁶.

Pro opakovatelnost měření je třeba, aby byla velikost částic v rozmezí 10 – 20 μm a aby bylo plnění měřicího kelímku definované ^{2, 7}.

- **Metoda zrcadlového odrazu, spekulární reflexe (Specular reflection)**

Při měření touto metodou je vzorek nanesen na lesklé podložce, od níž se odráží infračervené záření dopadající na ni pod určitým úhlem (Obr. 11). Odražené záření (spekulární reflexe) přitom musí splňovat Snellův zákon, čili úhel dopadu se rovná úhlu odrazu. Intenzita odraženého záření závisí na úhlu dopadu paprsku, na indexu lomu a povrchu vzorku a také na absorpčních vlastnostech vzorku ^{2, 16}.



Obrázek 11: Schematické znázornění spekulárního (zrcadlového) odrazu vzorku naneseného na reflexní podklad, Θ je úhel dopadu záření na vzorek (převzato z <http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/ftir.pdf> a upraveno v programu Malování)

Spektra lze měřit dvěma způsoby – spekulárně reflexním a reflexně absorpčním. Při spekulární reflexi dochází k odrazu od povrchu vzorku, zatímco při reflexi – absorpci dochází k průniku záření do vzorku, k odrazu od kovové reflexní podložky a opětovnému průniku vzorkem. Každý z nich je proto vhodný pro měření jiných typů vzorků¹⁶.

Reflexe - absorpce je vhodná pro analýzu tenkých filmů nanesených na kovových podložkách a silně absorbujících materiálů, zatímco spekulární reflexe se používá pro měření polymerních vrstev, polovodičů a dalších materiálů^{2, 16}.

2.2 Homocystein

Homocystein, 2-amino-4-sulfanylbutanová kyselina (vzorce všech forem homocysteinu Tab. II), je neesenciální aminokyselina, která v organismu vzniká z esenciální aminokyseliny methioninu přijímaného potravou^{19–26}.

Spolu s methioninem a cysteinem patří mezi sírné sloučeniny obsahující ve svých molekulách thiolovou skupinu SH-^{19, 21–26}. Díky síře, kterou ve své molekule obsahuje, je velmi reaktivní a v organismu se účastní mnoha reakcí, bez nichž by nebyl možný život. Vyskytuje se ve všech buňkách všech živých organismů, ať už bakterií, rostlin, či živočichů²³. Na druhou stranu je ale právě díky této skupině pro buňky látkou toxickou, a proto je v nich velmi rychle metabolizován na produkty, které už je nemohou poškodit^{23, 24}. Jeho toxicita se projevuje přímo i nepřímo. Přímým působením poškozují enzymy důležité pro nejrůznější biochemické reakce, takže pak tyto reakce probíhají špatně nebo dokonce vůbec. Navíc podporuje vznik volných radikálů, které dále poškozují nejen endotel cévních stěn, ale také enzymy či nejrůznější orgány buněk. Pokud jsou zasaženy mitochondrie, tak vznikají nejrůznější genetická onemocnění a navíc je ovlivněna také tvorba energie²³ a buněčné dýchání, které v nich probíhá²¹.

Na rozdíl od methioninu a cysteinu není zapojen do proteosyntézy, není tedy ani součástí bílkovin – je neproteinogenní^{21, 25, 26}.

Znám je už od roku 1932, kdy byl objeven a popsán dvěma biochemiky Butzem a du Vigneaudem^{23, 25}.

2.2.1 Význam homocysteinu pro organismus

Pro organismus, zejména pro jeho správné fungování, je homocystein nepostradatelný, jelikož je zapojen do methylačních reakcí probíhajících v buňkách všech živých organismů²⁴. Spolu s dalšími látkami s thiolovou funkční skupinou je zapojen do buněčného dýchání a také do rozmnožování buněk^{21, 23}.

2.2.1.1 Přenos CH₃ skupiny – methylace

Přenos methylového zbytku CH₃- souvisí s metabolismem homocysteinu a s jeho zapojením do methioninového cyklu ²⁴.

Methioninový cyklus zahrnuje celou kaskádu reakcí, na nichž se účastní několik enzymů s příslušnými kofaktory. Na jeho počátku je methionin z potravy, jenž je postupnými přeměnami metabolizován na homocystein, který je přeměněn buď zpět na methionin, nebo je degradován na cystein (více viz část o metabolismu Hcy) ²⁴.

Jedním z meziproductů tohoto cyklu je S-adenosylmethionin. Právě tato látka je zdrojem methylových skupin pro všechny methylační reakce probíhající v buňkách. Methylační reakce jsou důležité nejen pro tvorbu DNA, RNA a pro následnou tvorbu proteinů ^{21 - 24}, ale také pro syntézu fosfolipidů, neurotransmiterů na nervových synapsích, histonů a mnohých dalších látek ^{21, 24}.

V případě, že je průběh cyklu porušen nebo zpomalen, dojde k nedostatečné methylaci látek (hypomethylaci), které jsou na něm závislé a tím i k rozvoji nejrozličnějších onemocnění ²⁴.

Přenos methylových skupin pomocí homocysteinu a jeho metabolismu souvisí i s rozmnožováním, konkrétně se vznikem zárodečných buněk – spermií a vajíček. V případě, že není vznikající DNA správně vytvářena a methylována, dochází ke vzniku genových mutací, na jejichž podkladě poté vznikají vrozené poruchy metabolismu a imunity vyvíjejícího se plodu ²³.

2.2.1.2 Zapojení do dýchacího řetězce

Látky s thiolovou skupinou, mezi něž patří i homocystein, se podílejí na buněčném dýchání a na tvorbě energie, která s ním souvisí ²¹. Zatím není jasné, zda se na něm homocystein podílí přímo nebo nepřímo. Jisté je to, že je pro buňku nepostradatelný, jelikož na něm závisí její rozmnožování i energetický metabolismus ²³.

Úkolem thiosloučenin je získat využitelné energie pro buňku. Tato energie je získávána při reakci plynného vodíku s kyslíkem v dýchacím řetězci ²¹, při níž kromě ní vzniká také

voda. Za standardních podmínek ve zkumavce je reakce při přeskoku jiskry bouřlivá, a pokud by stejně proběhla v živém organismu, nemohl by ji využít. Proto probíhá postupně, přičemž její jednotlivé kroky jsou řízeny enzymy, které umožní její uchovávání v makroergních vazbách sloučenin s thiolovou skupinou. Tyto zásoby ovšem nejsou neomezené, a proto musí být průběžně doplňovány ²¹.

2.2.2 Metabolismus homocysteinu

Homocystein vzniká z methioninu, který je přijímán v potravě - jeho zdrojem jsou zejména živočišné bílkoviny ^{19, 21}. Doporučený denní příjem této esenciální aminokyseliny 10 – 40 mg/kg hmotnosti člověka ¹⁹.

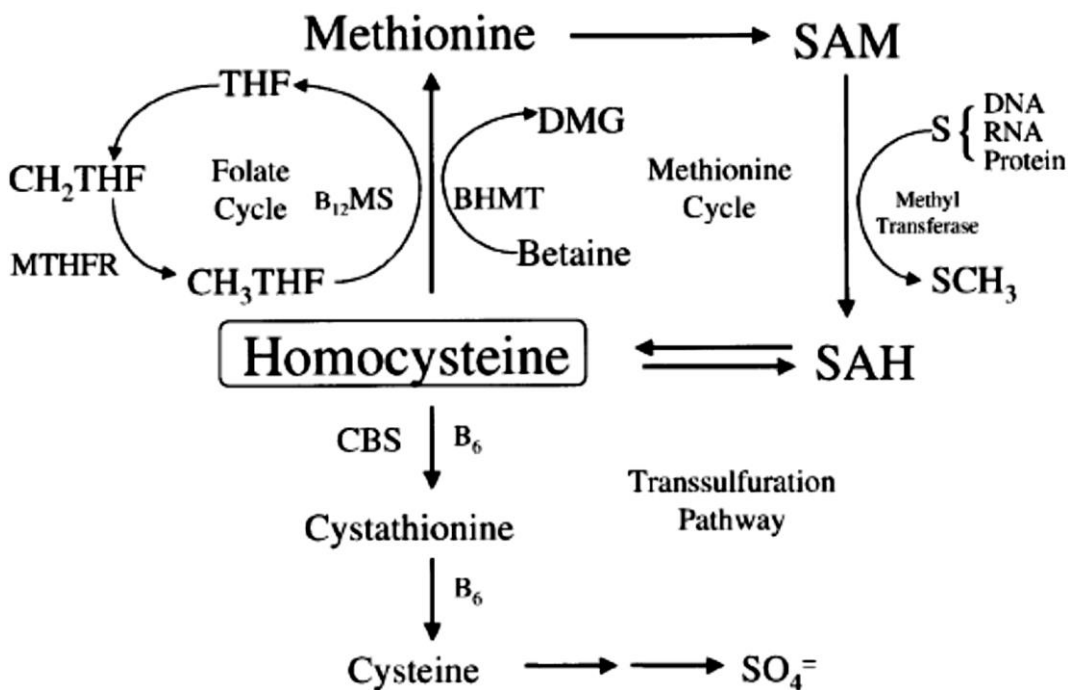
Methionin je pro organismus velmi důležitý, jelikož z něj vzniká S-adenosylmethionin, který je univerzálním dárce methylové skupiny při methylačních reakcích probíhajících ve všech buňkách bakterií, rostlin i živočichů včetně lidí ^{19, 21, 22, 25 - 27}. Z tohoto důvodu by pouhý příjem methioninu potravou zdaleka nestačil k pokrytí potřeb organismu ²¹. Proto dochází k remethylaci homocysteinu zpět na methionin ^{21, 25}. Další metabolickou dráhou je vznik cysteinu z methioninu, který rovněž běží přes homocystein ¹⁹. Jde o transulfurační metabolickou dráhu, která je nevratná ^{19, 25}. Další cestou, jak se buňky zbavují nadbytečného homocysteinu, je jeho uvolnění do extracelulárního prostoru ^{20, 25, 27}.

2.2.2.1 Methioninový cyklus

K tomu, aby methionin mohl poskytnout methylovou skupinu, vázanou na atomu síry, do reakce, která ji vyžaduje, musí dojít nejprve k jeho aktivaci ^{19, 21}. K té dochází reakcí s ATP za vzniku S-adenosylmethioninu (SAM) ^{19, 21, 26}, která je katalyzovaná enzymem methioninkinasou (methioninadenosyltransferasou, EC 2.5.1.6) ^{19, 21, 25}. Vzniklý SAM podléhá demethylaci, během níž předá CH₃ – skupinu vhodnému příjemci ^{19, 21}, např. DNA, RNA nebo dopaminu ¹⁹.

Demethylací SAM vznikne S-adenosylhomocystein (SAH) ^{19, 21, 26}. SAH je nestálá sloučenina ^{19, 21}, která je za účasti enzymu S-adenosylhomocysteinhydrolasy (EC 3.3.1.1) rozložena na homocystein a adenosin ^{19 - 21, 26, 32}. Uvolněný adenosin je v organismu využit

k obnově ATP ²¹, zatímco homocystein je buď metabolizován zpět na methionin, nebo je degradován na cystein ^{21, 32}.



Obrázek 12: Schéma metabolismu homocysteinu, na němž jsou zaznamenány jednotlivé metabolické dráhy od výchozích látek až po jejich degradační produkty a enzymy katalyzující příslušné reakce (převzato z Jacobsen D. W.: Clin. Chem. 44, 1833 (1998))

Vysvětlivky: SAM – S-adenosylmethionin; SAH – S-adenosylhomocysteine; BHMT – betainhomocysteinmethyltransferasa; DMG - dimethylglycin; B₁₂ MS – methioninsynthasa; THF – tetrahydrofolát; CH₂THF – methylen tetrahydrofolát; CH₃THF – methyltetrahydrofolát; MTHFR – methylen tetrahydrofolát reduktasa; CBS – cystathionin-β-synthasa

2.2.2.2 Remethylace homocysteinu

Při remethylaci dochází k opětovnému vzniku methioninu z homocysteinu ^{19, 21, 26, 28}. Podstatou tohoto děje je navázání CH₃ – skupiny na thiolovou skupinu homocysteinu ^{19, 21}, které probíhá v redukčním prostředí ²¹. Existují dvě metabolické dráhy, pomocí nichž

k remethylaci dochází^{20, 21}. Jedna z nich je reakce s 5 - methyltetrahydrofolátem katalyzovaná enzymem methioninsynthasou (neboli 5 - methyltetrahydrofoláthomocystein methyltransferasou, EC 2.1.1.13), druhou cestou je reakce s betainem katalyzovaná betainhomocysteinmethyltransferasou (EC 2.1.1.5)^{20, 21}.

- **Remethylace 5 - methyltetrahydrofolátem**

Reakce je katalyzována enzymem methioninsynthasou (neboli 5 - methyltetrahydrofoláthomocysteinmethyltransferasou, EC 2.1.1.13), pro jehož správné fungování je nezbytná přítomnost kobalaminu (vitamínu B₁₂) jakožto nosiče methylové skupiny, a 5 - methyltetrahydrofolátu jakožto jejího donoru^{19 - 21, 25, 26, 28, 31}. Tato reakce probíhá ve všech buňkách³¹.

Význam kyseliny listové při remethylaci

Kyselina listová (folová, někdy označovaná jako vitamín B₉, folacin^{29, 30}) patří mezi esenciální látky, které musí být přijímány potravou, jelikož si je lidský organismus nedokáže sám vytvořit²⁹. Jedná se o látku, která je rozpustná ve vodě a která není sama o sobě biologicky aktivní. Biologickou aktivitu vykazují pouze její metabolity, zejména 5 - methyltetrahydrofolát (metafolin), které vznikají v játrech³⁰. Potravou přijatá listová kyselina je přeměněna přes dihydrotetrahydrofolát a tetrahydrofolát na 5, 10 - methylen tetrahydrofolát. Ten je účinkem enzymu methylen tetrahydrofolát reduktasy (MTHFR, EC 1.5.1.20) přeměněn na 5 - methyltetrahydrofolát^{29, 30}, který předává methylovou skupinu kobalaminu a ten zase homocysteinu^{21, 29, 30}.

Pro organismus je kyselina listová velmi důležitá, jelikož v něm vycytává methylové zbytky, které se odštěpily při reakcích z velkých molekul^{21, 29}. Takovými jednouhlíkatými štěpy jsou např. volná mravenčí kyselina, methyl či formaldehyd. Folát, konkrétně tetrahydrofolát (THF), je na sebe váže^{22, 26, 29}, čímž napomáhá detoxikaci organismu a zabraňuje hromadění volných radikálů v organismu²², jelikož by v organismu působily silně toxicky²¹. K tomu, aby je na sebe mohl navázat, musí být potravou přijatá listová kyselina nejprve aktivována, přičemž k její aktivaci dochází přijetím čtyř vodíkových protonů. Při této reakci, která je enzymově katalyzovaná, vzniká tetrahydrofolát, který je na sebe schopen navázat zbytek CH₃-^{21, 22}. Po navázání jednouhlíkaté skupiny dojde buď k její oxidaci

na molekulu CO₂, nebo k redukci na CH₃ – skupinu. To, kterým směrem se bude reakce ubírat, závisí na okolním pH^{21,22}.

Význam vitamínu B₁₂ (kobalaminu)

Vitamín B₁₂ je rovněž esenciální látka, která musí být přijímána potravou z toho důvodu, že ji živočichové, a dokonce ani rostliny, nedokáží syntetizovat. To dokáží pouze mikroorganismy, zatímco živočichové, včetně člověka, jej musí skladovat ve svém organismu – konkrétně v játrech²⁹.

Kobalamin přebírá jednouhlíkatý zbytek redukováný na CH₃ - skupinu od tetrahydrofolátu^{21, 29}. K převzetí methylové skupiny musí být ve formě radikálu, tudíž je při této reakci nutné dodání dostatečného množství energie²¹. Během reakce vzniká radikál methylkobalamin^{21, 29}, jenž předá methylovou skupinu homocysteinu za vzniku methioninu a navrácení kobalaminu do výchozího, neaktivovaného stavu.

Pokud není kobalamin aktivován, tak mu nemůže tetrahydrofolát předat methylovou skupinu a ta nemůže být dále předána homocysteinu. Skupina zůstává vázána na tetrahydrofolátu a ve formě 5 - methyltetrahydrofolátu je skladována v organismu v erythrocytech jako jeho zásoba²¹.

- **Remethylace betainem**

Tato metabolická dráha probíhá v jaterní tkáni a na rozdíl od folátového cyklu není závislá na přítomnosti methylkobalaminu¹⁹. Podle jiného zdroje může k remethylaci betainem docházet kromě jaterní tkáně také v ledvinách^{20, 22, 31} a v mozku – tedy ve tkáních s vysokou spotřebou kyslíku²².

Betain, který je v této metabolické dráze zdrojem methylové skupiny^{20, 22, 31}, vzniká v organismu z cholinu^{22, 31}, degradačního produktu lecithinu²². Produktem reakce, která je katalyzována enzymem betainhomocysteinmethyltransferasou (EC 2.1.1.5)^{19, 31}, je glycin a dva jednouhlíkaté zbytky, které jsou vychytány tetrahydrofolátem a posléze zapojeny do remethylačních metabolických drah²².

2.2.2.3 Transsulfurace homocysteinu

Podstatou této ireverzibilní reakce je kondenzace homocysteinu s aminokyselinou serinem, při níž vzniká cystathionin^{19, 20, 25, 26, 28}. Reakce je katalyzovaná enzymem cystathionin – β – synthasou (CBS, EC 4.2.1.22), jejímž kofaktorem je vitamín B₆^{19 – 21, 26, 28}, konkrétně jeho aktivovaná forma pyridoxal – 5' – fosfát (PLP). Cystathionin však není konečným produktem této dráhy^{19 – 21}. Účinkem enzymu γ – cystathioninasy (EC 4.4.1.1) je cystathionin štěpen na cystein a homoserin, které jsou v organismu dále využívány^{19, 21}. Podle jiných zdrojů je cystathionin štěpen na cystein a α – ketobutyrát^{20, 22, 25, 26}.

2.2.3 Regulace metabolismu homocysteinu

Pokud není metabolismus homocysteinu v buňkách porušen, ať už vlivem genetických defektů nebo nedostatečného příjmu vitamínů fungujících jako kofaktory enzymů příslušných reakcí, je nitrobuněčná koncentrace Hcy udržována v úzkém koncentračním rozmezí.

V buňkách existuje několik mechanismů, které hladinu homocysteinu regulují¹⁹. Jedním z nich je samotný S – adenosylmethionin, který ovlivňuje jak 5 – methylentetrahydrofolátreduktasu (MTHFR, EC 1.5.1.20), tak cystathionin – β – synthasu (EC 4.2.1.22). MTHFR je účinkem SAM inhibována, zatímco CBS je jím naopak aktivována^{19, 20}, pokud je příjem methioninu v potravě zvýšený²⁰.

Dalším mechanismem je methylace aminoskupiny glycinu, při níž vznikne sarkosin. Reakce je katalyzována enzymem glycin – N – methyltransferasou (GNMT, EC 2.1.1.20) a využívá se při ní nadbytečný SAM¹⁹.

Dalším mechanismem jsou různé afinity enzymů jednotlivých tkání k methioninu a také hodnoty jejich Michaelisovy konstanty K_m ^{19, 20}.

2.2.4 Poruchy metabolismu homocysteinu

Metabolismus homocysteinu může být porušen jak exogenními vlivy, tak i vlivy endogenními³¹.

Endogenní příčiny poruchy metabolismu jsou způsobeny mutacemi genů kódujících enzymy, které jsou důležité pro odbourávání homocysteinu v buňkách, ať už jeho remethylací za vzniku methioninu nebo transsulfurací za vzniku cysteinu. Nejčastěji je mutacemi postihnuta MTHFR, ale nevyhýbají se ani CBS ³¹.

Nejčastějšími mutacemi MTHFR jsou mutace C677T ^{28, 30, 31} (normální bázi tohoto genu je cytosin, ale v případě této mutace je zaměněn za thymin ³⁰, což se v proteosyntéze projeví záměnou alaninu za valin ³³) a A1298C (normální bázi tohoto genu je adenosin, ale v případě této mutace je zaměněn za cytosin, což se v proteosyntéze projeví záměnou glutaminu za alanin ³⁴), při nichž vznikají enzymy s nižší aktivitou – např. v případě mutace C677T vzniká termolabilní enzym ^{30, 31, 33, 34}. Mutace mohou být homozygotní, při nichž jsou zasaženy obě alely, nebo heterozygotní, kdy je jedna z alel špatná a druhá je dobrá. Heterozygotní mutace MTHFR jsou mnohem častější a jejich projevy jsou mnohem mírnější, než v případě homozygotních konstitucí ³¹. U heterozygotních forem MTHFR C677T dokonce ani nemusí dojít ke zvýšení hladiny homocysteinu v krvi, pokud je příjem vitamínů B₆, B₁₂ a kyseliny listové dostatečný, jelikož aktivita MTHFR bývá snížena jen velmi lehce.

Co se týče mutace A1298C, tak ta se u postiženého jedince nemusí vůbec projevit hromaděním homocysteinu v těle ani v případě homozygotní konstituce, pokud je izolovaná a není kombinovaná s mutací C677T. Nicméně pokud má daný jedinec obě dvě uvedené mutace MTHFR, tak je aktivita enzymu snížena a v organismu pacienta dochází ke hromadění homocysteinu ³⁰, který nemůže být dostatečně rychle remethylován zpět na methionin z toho důvodu, že je snížena tvorba 5 - methyltetrahydrofolátu ^{28, 30}.

Dále může být poškozen enzym CBS, umožňující vstup homocysteinu do transsulfurační dráhy. Tento enzym je závislý na příjmu vitamínu B₆ v potravě. Pokud je funkce tohoto enzymu nedostatečná a enzym je mutovaný ³³, trpí jedinci autozomálně recesivním dědičným onemocněním, homocystinurií ^{33, 35}, které se projevuje zvýšeným obsahem homocystinu v moči a celkového homocysteinu a methioninu v krvi ³⁵.

U postižených jedinců s homocystinurií je výrazně zvýšené riziko tromboembolických příhod, navíc jsou často mentálně retardováni a vykazují také psychiatrické poruchy ³⁵.

Ke zvýšení hladiny homocysteinu může dojít také tehdy, pokud je porušena absorpce nebo transport vitamínu B₁₂ ve střevě nebo v těle, případně pokud nedochází k jeho konverzi

na methylkobalamin. Tento vitamín je kofaktorem methioninsynthasy, enzymu zodpovědného za remethylaci homocysteinu na methionin³³.

Naopak exogenními příčinami špatného metabolismu homocysteinu je nedostatečný příjem vitamínů B₆, B₁₂ a kyseliny listové, čili kofaktorů enzymů zabezpečujících správné odbourávání homocysteinu^{31,34}. Nedostatečný příjem je ovšem jen jeden z faktorů³³. Hladinu homocysteinu v krvi také ovlivňuje životní styl, věk, pohlaví, etnický původ a různá onemocnění, ať už přímo či vlivem užívaných léků³³.

Pokud je metabolismus homocysteinu porušen, tak dochází ke zvyšování jeho množství v organismu – k hyperhomocysteinémii (více viz Hyperhomocysteinémie a její komplikace³¹).

2.2.5 Homocystein v tělních tekutinách

V krvi, nebo spíše v krevní plazmě, se homocystein vyskytuje nejen v redukované formě, ale také ve formě oxidované^{26, 33}. V současnosti se stanovuje zejména celkový homocystein, který vyjadřuje sumu všech jeho forem v plazmě³³.

Obsah volného, redukováného homocysteinu v plazmě se pohybuje okolo 1 - 2 %, zbylých 98 – 99 % připadá na homocystein oxidovaný, jenž se v krvi vyskytuje v několika formách^{19, 25, 26, 33}. V případě, že dojde k oxidaci dvou molekul homocysteinu, při níž vzniká disulfidový můstek, jde o homocystin^{25, 33}. Disulfidový můstek může vzniknout také mezi homocysteinem a cysteinem, kdy jde o smíšený disulfid.

Největší zastoupení má proteinově vázaný homocystein (proteinově vázáno je okolo 70 % celkového homocysteinu²⁵), který patří rovněž mezi smíšené disulfidy a který vzniká reakcí s proteiny obsahujícími reaktivní cysteinové zbytky, jako je např. plazmatický albumin³³. Více Tab. II.

Další formy, v nichž se homocystein vyskytuje v krevní plazmě, jsou homocystein thiolakton, homocysteinamid – (lipo)proteinový addukt a homocysteinylglycin disulfid¹⁹.

2.2.5.1 Homocystein thiolakton

Homocystein thiolakton je sirný cyklický ester homocysteinu, který v organismu vzniká účinkem enzymu methionyl-tRNA synthetasy^{36 - 38} pro zabránění inkorporace homocysteinu do vznikajících proteinů^{26, 36, 37}. Vznik homocystein thiolaktonu u bakterie *Escherichia coli* mohou katalyzovat dvě další tRNA syntetasy, a to isoleucyl-tRNA syntetasa a leucyl-tRNA syntetasa³⁷, podle jiného zdroje tyto 3 enzymy katalyzují jeho vznik i u lidí, což je umožněno na základě strukturní podobnosti těchto 3 aminokyselin s methioninem²⁶.

Thiolakton vzniká ve dvou krocích – v prvním kroku vzniká z homocysteinu a z ATP enzymově vázaný homocystinyl adenylát, který je následně ve druhém kroku na homocystein thiolakton za současného uvolnění AMP^{36, 37}. Thiolakton je v lidském organismu hydrolyzován dvěma enzymy – homocystein thiolakton hydrolasou v plazmě a paraoxonasou³⁸.

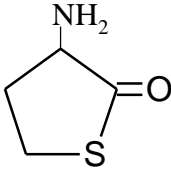
U zdravých buněk s nepoškozeným metabolismem homocysteinu vzniká thiolakton pouze v minimálním množství, ale pokud se buňky transformují do nádorových buněk nebo je u nich metabolismus neregulovaný, vzniká v nadbytečném množství a organismu škodí³⁷.

Homocystein thiolakton je díky intramolekulární thioesterové skupině velmi reaktivní²⁶ a váže se na aminokyselinu lysin, která je součástí proteinů, amidovými vazbami³⁹. Dále může acylovat také volné aminoskupiny asparaginu, glutaminu a argininu – dochází k homocysteinylnaci²⁶.

Pro buňky je homocysteinylnace toxická, jelikož způsobuje poškození proteinů jejich multimerizací a srážením³⁹. Navíc zvyšuje internalizaci LDL cholesterolu makrofágy, což vede ke zvýšení aterogenity LDL cholesterolu^{38, 39}. N-homocysteinylovaný LDL cholesterol se váže na membránové receptory, přičemž do intracelulárního prostoru buňky je uvolňován homocystein jakožto hydrolytický produkt³⁹. Homocystein poté způsobuje poškození buněk a oxidační změny, které jsou pravděpodobně způsobeny tvorbou superoxidu a peroxidu vodíku zvýšenou lipoperoxidací membrán³⁹.

Tabulka II: Formy homocysteinu v krevní plazmě s jejich procentuálním zastoupením (kreslené v programu ChemSketch podle předlohy, kterou byly zdroje ¹⁹ a ³³)

Redukovaný homocystein		
Forma	Vzorec	Zastoupení v plazmě [%]
Homocystein	$\text{HS-CH}_2\text{CH}_2\underset{\text{NH}_2}{\text{CH}}\text{-COOH}$	1
Oxidovaný homocystein		
Homocystin	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{S-CH}_2\text{CH}_2\text{CH-COOH} \\ \\ \text{S-CH}_2\text{CH}_2\text{CH-COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	5 - 10
Smíšený disulfid homocysteincystein	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{S-CH}_2\text{CH}_2\text{CH-COOH} \\ \\ \text{S-CH}_2\text{CH-COOH} \\ \\ \text{NH}_2 \end{array}$	5 - 10
Proteinově vázaný homocystein	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{S-CH}_2\text{CH}_2\text{CH-COOH} \\ \\ \text{S-} \text{protein} \end{array}$	80 - 90
Homocysteincysteinyglycin disulfid	$\begin{array}{c} \text{NH}_2 \\ \\ \text{S-CH}_2\text{CH}_2\text{CH-COOH} \\ \\ \text{S-CH}_2\text{CH-C-NH-CH}_2\text{-COOH} \\ \quad \parallel \\ \text{NH}_2 \quad \text{O} \end{array}$	-
Homocysteinamid – (lipo)proteinový addukt	$\text{(lipo)protein} \text{---NH-C(=O)-CH(NH}_2\text{)CH}_2\text{CH}_2\text{SH}$	-

Homocystein thiolakton		-
-------------------------------	---	---

2.2.6 Hyperhomocysteinémie a její komplikace

Fyziologická hladina homocysteinu v krvi, respektive v plazmě, je v rozmezí 5 – 15 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ^{20, 24, 31, 33} u mužů a 5 – 12 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ u žen ²⁴. Jiní autoři uvádějí fyziologické rozmezí do 16 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ ¹⁴⁰, respektive 5 – 16 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ jak u mužů, tak u žen ^{19, 26}. Tyto hodnoty se liší i v závislosti na věku, pohlaví, výživě, životním stylu, zdraví a také v závislosti na etnické příslušnosti ^{24, 28, 33}.

Jakékoliv zvýšení koncentrace homocysteinu nad horní hranici fyziologického rozmezí je hyperhomocysteinémie. Rozlišují se tři typy hyperhomocysteinémie – mírná, středně těžká a těžká (referenční rozmezí koncentrací Tab. III) ^{19, 24, 26, 40}.

Tabulka III: Rozmezí koncentrací při normální koncentraci homocysteinu v plazmě a při hyperhomocysteinémii

	[$\mu\text{mol.l}^{-1}$]
Fyziologické rozmezí	5 – 15 (muži) 5 – 12 (ženy)
Mírná hyperhomocysteinémie	15 – 30 (respektive 16 – 30)
Středně těžká hyperhomocysteinémie	30 – 100
Těžká hyperhomocysteinémie	>100

Příčiny hyperhomocysteinémie mohou být různé ^{19, 28, 33}. Na jejím rozvoji se podílí jak nadbytečný příjem zejména živočišných bílkovin v kombinaci s nedostatečnou konzumací

potravin obsahujících 3 klíčové vitamíny pro metabolismus homocysteinu (listová kyselina, vitamíny B₆ a B₁₂), tak i bodové mutace způsobující změny a sníženou funkci enzymů katalyzujících reakce odbourávání této aminokyseliny^{19, 28, 33}.

Mírná hyperhomocysteinémie bývá obvykle způsobena nedostatečným přísunem vitamínů, či nadměrným příjmem methioninu v potravě, méně často k ní dochází kvůli mírným změnám v molekule enzymů vedoucích ke snížení jejich aktivity⁴⁰. K mírnému zvýšení homocysteinu v plazmě může dojít také u pacientů užívajících léky, jako jsou např. metotrexát, L – DOPA, theofylin a karbamazepin^{24, 40}.

Naopak za těžkou hyperhomocysteinémií stojí nejčastěji mutace enzymu CBS^{23, 35, 40}, při níž dochází k nadměrnému vylučování homocystinu močí – proto se někdy mluví o homocystinurii a ne o těžké hyperhomocysteinémii^{23, 24}. Nemocní s touto chorobou trpí předčasnou aterosklerózou a trombotickým onemocněním všech cév, tepen i žil, které vedou k předčasným infarktům, mrtvicím i plicním emboliím a ty zase k předčasným úmrtím⁴⁰, kdy se nemocní nedožívají ani 30 let^{23, 24}. Dále se těžká hyperhomocysteinémie vyskytuje také u pacientů s chronickým selháním ledvin^{20, 24, 26, 28, 32}, s nádorovými onemocněními či systémovým lupus erythematoses²⁸.

Hyperhomocysteinémie způsobuje nejen předčasnou aterosklerózu a s tím související poškození endotelu, kardiovaskulární a tromboembolické onemocnění (tepenné i žilní)^{24, 28, 34}, ale také neurodegenerativní onemocnění^{24, 43}, jako je např. Alzheimerova choroba^{26, 28}.

Pokud hyperhomocysteinémií (zejména z nedostatečného příjmu listové kyseliny²⁶) trpí budoucí maminka nejen během těhotenství, ale i před ním, vznikají u vyvíjejícího se plodu nejrůznější defekty neurální trubice. Dále hrozí zvýšené riziko potratu, abrupce placenty, předčasný porod či dokonce smrt plodu³¹.

2.2.7 Stanovení homocysteinu

Pokud se v současnosti mluví o stanovení koncentrace homocysteinu v plazmě, tak jde ve skutečnosti o stanovení celkového homocysteinu. Celkový homocystein zahrnuje všechny formy Hcy – redukované i oxidované, volné i vázané^{20, 41}.

Při stanovení Hcy je nutné dodržovat určité zásady, aby nedocházelo k umělému zvyšování jeho koncentrace – velký důraz je tedy kladen zejména na preanalytickou fázi stanovení ⁴¹.

2.2.7.1 Faktory ovlivňující koncentraci homocysteinu při odběru krve

Při odběru krve se musí vzít v potaz několik faktorů, na něž se musí dát pozor, aby nedošlo k umělému zvýšení koncentrace homocysteinu v krvi a tím i ke špatnému výsledku při jeho stanovení ⁴¹. Mezi tyto faktory patří:

Strava a životní styl

Při stanovení koncentrace celkového homocysteinu se krev odebírá nalačno (po 12 hodinovém lačnění) ⁴¹, případně po zátěži methioninem při tzv. methioninovém zátěžovém testu (methionin loading test) ⁴², jenž byl primárně vyvinut pro testování heterozygotní konstituce enzymu CBS ⁴². Večeře před odběrem by měla být pouze lehká, bez vysokého obsahu bílkovin ⁴¹.

Koncentrace homocysteinu je zvýšená u alkoholiků, kteří jsou na alkoholu dlouhodobě závislí ⁴¹ a u kuřáků ^{24, 42}.

Věk, pohlaví, rasa

Koncentrace homocysteinu závisí na věku – jeho nejnižší hladiny mají děti, s přibývajícím věkem se postupně zvyšuje ^{41, 42}. Tento nárůst pravděpodobně souvisí s tím, že u starších osob dochází ke snižování absorpce vitamínů skupiny B ve střevech a také s klesající glomerulární filtrací ⁴¹.

Muži mají vyšší obsah homocysteinu než ženy ^{41, 42}, což je pravděpodobně dáno vlivem pohlavních hormonů. Tuto teorii potvrzuje také to, že je jeho obsah nejnižší u fyziologických těhotenství ⁴¹, příčinou může být i rozředění krve ⁴².

Velmi vysoké koncentrace homocysteinu mají zejména obyvatelé v rozvojových zemích ⁴².

Poloha a délka zatažení paže při odběru

Pokud je krev odebírána pacientovi ležícímu na zádech, dochází ke snížení koncentrace homocysteinu zhruba o 10 %, což je pravděpodobně způsobeno tím, že v plazmě klesá obsah albuminu, na nějž se Hcy váže⁴². Tudíž je ideální poloha pro odběr krve pro toto stanovení polosed – pololeh, přičemž paže by neměla být zatažena déle než 3 minuty, jinak dojde ke zvýšení koncentrace homocysteinu téměř o 3 %⁴¹.

2.2.7.2 Odběr krve

Krev se odebírá z loketní žíly do speciálních odběrových zkumavek, které obsahují vhodné antikoagulační činidlo (to platí pro stanovení z plazmy – pro stanovení ze séra se nesmí přidat žádné antikoagulační činidlo)^{24, 41 - 44}. Tím je nejčastěji ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA), ale dají se použít také heparin lithný a citrát sodný^{24, 41, 42}. Dále se ke krvi přidávají další látky, jako fluorid sodný s heparinem, 3-deazaadenosin nebo kyselý citrát, které v ní stabilizují koncentraci homocysteinu. Ovšem ne všechna tato činidla jsou kompatibilní se všemi testy, které se pro stanovení používají^{41, 42}.

2.2.7.3 Stabilita homocysteinu v krvi, plazmě a séru

V plné krvi je homocystein nestabilní, dochází v ní k umělému zvyšování jeho koncentrace v závislosti na čase a teplotě, při níž je krev ponechána^{20, 42, 44}. Toto postupné zvyšování koncentrace je způsobeno tím, že v erytrocytech pokračuje syntéza homocysteinu, který je následně uvolněn do extracelulárního prostoru – do odebrané krve⁴². Proto je odebraná krev uchovávána na ledu a nejpozději do 30 - 60 minut (tato hodnota je spíše orientační, délka uložení vzorku na ledu před centrifugací závisí na použitém antikoagulačním činidle) se musí stočit na centrifuze, aby byla krevní tělíska odstraněna a koncentrace homocysteinu dále nerostla^{20, 24, 42}.

V plazmě, která se připravuje centrifugací a oddělením krevních tělísek, je homocystein stabilní při laboratorní teplotě po dobu 4 dnů^{41, 44}, při teplotě 0 – 2 °C v lednici

je stabilní několik týdnů a největší stabilitu vykazuje při skladování při teplotě -20 °C v mrazáku, kdy je jeho stabilita až několik let ⁴¹.

V séru je koncentrace homocysteinu oproti plazmě mírně vyšší – asi o 5 – 10 % ^{20, 24, 42} (což odpovídá zvýšení o 0,5 – 1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$) z toho důvodu, že je sérum připravováno tak, že se odebraná krev nechá stát 30 – 60 minut při laboratorní teplotě. Během této doby dojde ke koagulaci krevních tělísek, které se odstraní. Poté je v něm homocystein stabilní po dobu asi 48 hodin při laboratorní teplotě ⁴². Stabilita v jednotlivých materiálech k analýze je shrnutá v Tab. IV.

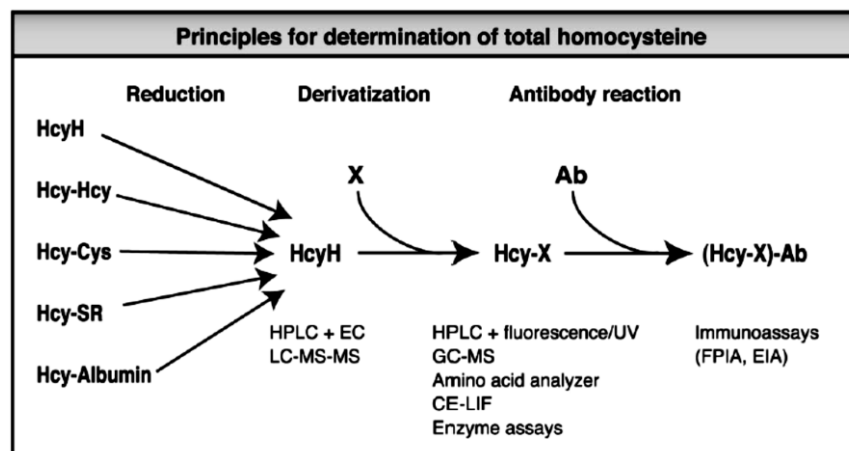
Tabulka IV: Stabilita homocysteinu v plné krvi, v optimálně připravené plazmě a v optimálně připraveném séru (hodnoty byly převzaty ze zdroje ⁴²)

Vzorek	Teplota [°C]	Stabilita
Plná krev	pokožová	< 1 hodinu
	0 – 2	4 – 12 hodin
Plazma/sérum	pokožová	až 4 dny
	0 – 2	několik týdnů
	-20	několik let

2.2.8 Metody stanovení homocysteinu

Pro stanovení koncentrace homocysteinu (v naprosté většině případů celkového Hcy) je nutné před vlastním stanovením plazmu či sérum upravit.

Jelikož se v plazmě vyskytuje v různých podobách, volný a vázaný, oxidovaný i redukovaný (podrobně viz část *Homocystein v tělních tekutinách*) ^{19, 22}, musí se před vlastním stanovením nejprve provést redukce, kterou dojde k uvolnění homocysteinu ze všech forem na volný, redukovaný homocystein ^{19, 22, 33}. Dále následuje precipitace bílkovin, při níž dojde k jejich odstranění (tzv. deproteinace). Poté už může následovat vlastní stanovení koncentrace homocysteinu nebo derivatizace homocysteinu, případně reakce s protilátkou při imunoanalytických stanoveních (Obr. 13) ²².



Obrázek 13: Principy stanovení koncentrace celkového homocysteinu v plazmě nebo v séru (převzato z Refsum H., Smith A. D., Ueland P. M., Nexo E., Clarke R., McPartlin J., Johnston C., Engbaek F., Schneede J., McPartlin C., Scott J. M.: *Clin. Chem.* 50, 3 (2004))

Vysvětlivky: HcyH – redukovaný homocystein, Hcy-Hcy – homocystin, Hcy-Cys – smíšený disulfid homocystein-cystein, Hcy-SR – smíšený disulfid s homocysteinem, HPLC + EC – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s elektrochemickou detekcí, LC-MS-MS – kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií, HPLC + UV – vysokoúčinná kapalinová chromatografie s UV detekcí, GC-MS – plynová chromatografie s hmotnostní detekcí, CE-LIF – kapilární elektroforéza s laserem indukovanou fluorescencí, FPIA – imunoanalýza s polarizovanou fluorescencí, EIA – enzymová imunoanalýza

Redukce homocysteinu

Jako redukční činidla pro uvolnění vázaného a oxidovaného homocysteinu se nejčastěji používají dithiotreitol, borohydrid sodný a deriváty fosfinu, jako je např. tris(2- karboxyethyl) fosfin nebo tri-N-butyl fosfin^{19, 22, 33}.

Precipitace proteinů

Vysrážení bílkovin se provádí přidáním kyselin k plazmě či séru. K tomuto účelu se používají 3 kyseliny, konkrétně kyselina chloristá, trichloroctová kyselina a případně

i sulfosalicylová kyselina. Současně s kyselinou se ke vzorku přidává také malé množství EDTA. Vysrážené bílkoviny se od vzorku oddělí centrifugací ²².

Derivatizace homocysteinu

Volba derivatizačního činidla závisí na volbě metody pro stanovení koncentrace homocysteinu. Pokud se stanovuje automatickým analyzátozem aminokyselin, používá se ninhydrin, zatímco pokud je analytickou koncovkou HPLC s fluorescenční detekcí, používají se k derivatizaci např. monobromobiman či 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonát amonný (S-BDF) ^{19, 22}, detekce v případě separace HPLC může být také elektrochemická ¹⁹. Pro analýzy pomocí plynové chromatografie se používají ethylchloromravenčany, jejichž působením vznikají těkavé N(O,S)-ethoxy-karbonylové ethylestery aminokyselin ²².

Po provedení všech kroků, potřebných k ošetření plazmy před vlastním stanovením koncentrace, následuje zvolená analytická koncovka. Rutinní metody, které jsou v současnosti využívány v klinických laboratořích ke stanovení nejrůznějších analytů, musí být jednoduché, rychlé, robustní a vhodné pro automatizaci, aby bylo denně proměřeno co nejvíc vzorků ⁴⁵.

Analytickými koncovkami v současnosti využívanými ke stanovení homocysteinu jsou HPLC, kapilární elektroforéza ^{46, 48, 49}, enzymatické či imunoanalytické stanovení ⁴⁷ a plynová chromatografie ⁴⁹. Detekce u těchto separačních technik může být fluorescenční nebo elektrochemická ^{46 - 48}, případně i spektrofotometrická detekce absorpcí UV záření ^{46, 48}. V současnosti se při detekcích uplatňuje také spojení s hmotnostní spektrometrií ^{46 - 48}. Vyvíjejí se i zcela nové metody pro stanovení nejen celkového homocysteinu, ale také jeho jednotlivých forem, jež jsou v plazmě zastoupeny ⁴⁶. Tyto metody využívají nejrůznější senzory, které jsou založeny například na organických barvivech (o-ftaldialdehyd, azobarviva, xantenová barviva a další ^{46, 48}), stříbrných nanoklastrech, zlatých nanočásticích či na polovodičových kvantových tečkách ⁴⁶.

2.2.9 Separační metody

Tyto metody zahrnují tři analytické techniky – HPLC, GC a CE ⁵⁰. Vzorčky jsou rozděleny v koloně, která bývá obvykle kapilární, a následně jsou analyty detekovány a kvantifikovány detektorem. Pořadí eluce jednotlivých analytů závisí na jejich retenčním čase a ten zase na interakci analytu částicemi nebo povrchem kolony ²⁰.

2.2.9.1 Chromatografické metody

Pokud chceme ke stanovení využít chromatografické metody, tak je obvykle nutná derivatizace (derivatizační činidla viz *Metody stanovení homocysteinu – Derivatizace homocysteinu*), jelikož bez jejího provedení by nebylo možné stanovit koncentraci homocysteinu ⁵⁰. Derivatizaci nemusíme provádět tehdy, pokud je detekce homocysteinu elektrochemická, nebo pokud je detektorem hmotnostní spektrometr ⁴².

Chromatografické metody kladou velké nároky nejen na přístrojové vybavení a drahé reagensy, ale také na kvalifikované zaměstnance laboratoře ^{41, 50}. Kdysi tyto metody nebyly vhodné pro rutinní stanovení, jelikož nebyly v minulosti automatizované, a proto měly nízký denní výkon. To už ale v současnosti neplatí – tyto metody jsou plně automatizované, jsou vybaveny autosamplery a v klinických laboratořích se často využívají ^{20, 50}.

- **Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)**

HPLC bývá spojena s fluorescenční ⁵¹ nebo coulometrickou detekcí ^{52, 53}, ale v současnosti se uplatňuje také spojení s hmotnostní spektrometrií, konkrétně s tandemovou hmotnostní spektrometrií ^{54, 55}. Separace může probíhat jak na reverzních fázích ^{20, 52}, tak na iontovýměnných fázích ^{51, 52} a dokonce je možné ke stanovení použít také HILIC mód⁵⁵.

Pokud se homocystein stanovuje HPLC s fluorescenční detekcí, je nutná jeho derivatizace, jelikož sám od sebe nefluoreskuje ^{20, 51}. Derivatizace může proběhnout jak před kolonou ²⁰, tak za ní ⁵¹. Při předkolonové derivatizaci se nejčastěji využívá SBD-F nebo monobromobiman (mBrB) ²⁰, zatímco při postkolonové derivatizaci je využíván hlavně o-phtalaldehyd (OPA) ⁵¹. Derivatizace umožní přijetí kvanta excitačního záření o určité

vlnové délce, po němž dojde k vybuzení homocysteinu a k následnému uvolnění kvanta emisního záření o jiné vlnové délce, díky němuž je Hcy kvantifikován ⁵⁶.

Při HPLC stanovení s elektrochemickou detekcí není nutná derivatizace, což je velká výhoda této metody ^{20, 52}. Další výhodou je možnost současného určení několika analytů ^{20, 53}. Naopak je ale nutné použít vnitřní standard, kterým může být např. penicilamin, který je stejně jako homocystein elektrochemicky aktivní a má podobnou strukturu ⁵². Detektory mohou mít nejen měřící cely s určitým potenciálem na elektrodách, ale také ochrannou celu, jejímž úkolem je nejen snižování šumu pozadí detektoru, ale také odstraňování nečistot mobilní fáze jejich oxidací ^{52, 53, 56}. Při detekci je homocystein oxidován – oxidace je spojena s generací elektrického proudu, jehož nárůst je měřen a z proudové odezvy je poté určen obsah homocysteinu ve vzorku ^{52, 56}.

- **Plynová chromatografie (GC)**

I v případě separace plynovou chromatografií je nutná derivatizace homocysteinu. Jako derivatizační činidlo se používá např. N-methyl-N-(tercbutyldimethylsilyl)trifluoroacetamid, jehož působením vzniknou tercbutyldimethylsilyl deriváty, které jsou separovány v kapilární koloně a poté jsou kvantifikovány pomocí hmotnostního spektrometru ²⁰ s elektronovou ionizací ⁵⁷. Rovněž se při ní používá vnitřní standard, kterým je deuterovaný homocystein ²⁰.

Výhodou této metody je nejen možnost současného stanovení několika analytů, např. homocysteinu, cysteinu, methioninu, cystathioninu, serinu, methylmalonové kyseliny, N,N-dimethylglycinu a N-methylglycinu, ale také vysoká specificita a citlivost. Naopak nevýhodou je vysoká cena vybavení a chemikálií ^{20, 57}.

2.2.9.2 Kapilární elektroforéza (CE)

Pro stanovení homocysteinu se využívá spojení kapilární elektroforézy s laserově indukovanou fluorescencí (CE-LIF), jelikož jde o rychlou a plně automatizovanou metodu se selektivní detekcí ^{58 - 60}. Stejně jako u HPLC a GC se při ní používá interní standard, kterým je D-penicilamin (DP). Koncentrace homocysteinu ve vzorku je určena pomocí kalibračních křivek využívajících poměr Hcy/DP a Hcy/Cys ⁵⁸.

Kapilární elektroforéza je výborná separační technika už z toho důvodu, že je k analýze potřeba velmi malé množství vzorku ⁵⁹. Navíc laserově indukovaná fluorescence je dostatečně citlivá i pro nepatrná množství analytu, tudíž je toto spojení v klinických laboratořích hojně využíváno ^{59, 61}.

Lasery, které se využívají, jsou např. helium-kadmiový ⁵⁹ nebo argon-iontový ^{56, 60}. Emitované záření dopadá na fotonásobič, jehož signál je úměrný koncentraci analytu ve vzorku ⁵⁹. V případě stanovení homocysteinu, i dalších thiolů, je nutné provést derivatizaci, aby mohl fluoreskovat ^{60, 61}. Jako derivatizační činidlo pro CE se používá např. 4-aminosulfonyl-7-fluoro-2, 1, 3-benzoxadiazol (ABD-F) ⁶¹.

2.2.10 Enzymatické metody

Enzymatické metody pro stanovení homocysteinu využívají několika krokovou reakci za účasti enzymů zahrnutých v jeho odbourávání ^{41, 62, 63}. Prvním krokem je nejčastěji redukce, po níž následuje přeměna homocysteinu za vzniku metabolitu a jednoduššího produktu (např. pyruvát, H₂O₂ či H₂S ⁵⁶), jenž je následně kvantifikován – ať už přímo, nebo nepřímou ^{41, 63}. Pokud je detekce fluorescence, musí být provedena rovněž derivatizace ⁶². Kromě fluorescence může být detekce také spektrofotometrická ⁵⁶.

Výhodou těchto metod je to, že není potřeba složitá příprava vzorku a většinou ani jeho derivatizace, navíc je lze provést na běžných analyzátořech a oproti imunoanalytickým stanovením jsou levnější ⁴¹.

2.2.11 Imunoanalytické metody (imunochemické metody)

Tyto metody jsou poměrně rychlé, plně automatizované díky autosamplerům, a tudíž vhodné pro rutinní stanovení ^{41, 64}.

Jsou založeny na reakci antigenu se specifickou protilátkou, což je reakce, při níž vzniká rozpustný komplex antigen – protilátka. Pro detekci a následnou kvantifikaci se jedna z jeho komponent, antigen nebo protilátka, musí označit vhodnou značkou (indikátorem) ^{56, 65}.

Imunoanalytické metody mohou být kompetitivní i nekompetitivní. U kompetitivních metod soutěží antigen se stejným značeným antigenem, který byl do vzorku přidán ve známém množství, o vazebná místa protilátky, jíž je ve vzorku pouze omezené množství. Během reakce vzniknou dva komplexy - jeden značený a druhý neoznačený, přičemž množství neoznačeného antigenu vázaného na protilátku je nepřímo úměrné značenému antigenu vázanému na protilátku.

Naopak při nekompetitivním uspořádání je protilátka, obvykle vázaná na stěně reakční nádoby nebo na kuličkách z pevné látky, přítomna v nadbytku. Antigen se na ni naváže a poté se do reakční směsi přidá další protilátka, tentokrát značená, která se naváže na antigen za vzniku sendvičové struktury – proto se někdy nekompetitivní metody označují pojmem sendvičové. Tato struktura se následně kvantifikuje ⁶⁵.

Podle použitého indikátoru se imunoanalytická stanovení dělí do tří skupin – enzymová imunoanalýza (EIA), imunoanalýza s polarizovanou fluorescencí (FPIA) a chemiluminiscenční imunoanalýza (ICL, CLIA) ^{41, 56}. Při EIA je indikátorem vhodný enzym ^{64, 65}, při CLIA luminofor a při FPIA látka se skupinou schopnou fluorescence - podle zvoleného indikátoru může být detekce provedena spektrofotometricky, fluorimetricky nebo luminoforicky ⁶⁵.

3. Experimentální část

Ve své diplomové práci se zabývám stanovením aminokyseliny homocysteinu v lidské plazmě pomocí infračervené spektroskopie. Toto stanovení není úplně triviální, jelikož plazma je komplexní vzorek obsahující velké množství sloučenin. Tyto sloučeniny jsou tvořeny stejnými atomy jako můj analyt – nejen uhlíkem, vodíkem a kyslíkem, ale také dusíkem a sírou, tudíž s ním při stanovení interferují.

Proto jsem strukturu svého analytu potřebovala nějak modifikovat, aby se posunuly hodnoty jeho vlnočtů směrem k nižším nebo vyšším hodnotám a já jsem jej tak mohla ve vzorcích prokázat a případně se pokusit i o jeho kvantifikaci.

3.1 Chemikálie

DL - cystein hydrochlorid, bezvodý; DL - methionin; DL - homocystein thiolakton, hydrochlorid; bromid draselný; butan-1-ol; octová kyselina; diethylentriaminpentaoctová kyselina; kyselina chlorovodíková; kyselina fosforečná; hexahydrát kyseliny chloroplaticité; 2 - merkaptoethanol; DL – dithiothreitol; (všechny chemikálie firmy Sigma Aldrich); DL – homocystein (chemikálie firmy Fluka); ninhydrin p.a.; Lachema - laboratorní chemikálie); 1 M hydroxid sodný; práškový a granulovaný cín; hexachloroplaticitan draselný; mořský písek praný; síran amonný, p.a.; pekařské droždí (*Saccharomyces cerevisiae*) značek Vivo a Noli; ethanol; plazma; HPTLC destička (firma Merck)

3.2 Přístroje

Infračervený spektrometr Nicolet 6700 FT-IR, Thermo Scientific; Lis Graseby Specac, LOT, ORIEL; laboratorní vortex IKA® MS 3 basic; pH metr inoLAB pH 7110; magnetická míchačka Variomag Mono (Komet); centrifuga; termostaty

3.3 Infračervený spektrometr

Veškeré standardy i vzorky plazmy jsem měřila na infračerveném spektrometru Nicolet 6700 FT-IR firmy Thermo Scientific. Spektrometr jsem ovládala pomocí řídicího programu OMNIC 8, v němž jsem zadávala parametry měření, spouštěla jsem v něm analýzy a také jsem jej používala k vyhodnocování a ukládání naměřených spekter.

3.4 Měření a vyhodnocování infračervených spekter v MIR

3.4.1 Měření infračervených spekter

K měření jednotlivých vzorků a standardů jsem používala jak nástavec pro techniku KBr tablety, tak nástavec pro měření ATR technikou. Podle zvolené techniky jsem vždy použila příslušný nástavec a nastavila jsem parametry měření v programu OMNIC v záložce Experimental Setup (podrobné nastavení viz *Nastavení IČ spektrometru pro techniku KBr tablety* a *Nastavení IČ spektrometru pro techniku ATR*).

Po zapnutí programu OMNIC 8 jsem si vybrala příslušný experiment Transmission – MIR (transmission_MIR.EXP) a v záložce Experimental Setup – Collect nastavila počet skenů na 32 a rozlišení na 4 cm^{-1} v případě měření tabletkovou technikou a 64 skenů a rozlišení 8 cm^{-1} pro snímání spekter tabletkovou technikou. Finálním formátem byla absorbance a spektrum pozadí bylo snímáno po každých 100 minutách nebo před každým vzorkem.

Spektra standardů jsem měřila tabletkovou metodou v rozsahu vlnočtů 4000 – 400 cm^{-1} , zatímco spektra vzorků jsem proměřovala ATR technikou v rozsahu vlnočtů 4000 – 600 cm^{-1} . Po jejich naměření jsem spektra vždy uložila a příslušné absorpční pásy jsem označila vlnočty.

3.4.1.1 Měření tabletkovou (KBr) technikou

V případě měření tabletkovou technikou jsem nejprve změřila spektrum pozadí, kterým byla tabletky z čistého bromidu draselného. Naměřené pozadí jsem si uložila a poté

jsem vůči němu měřila spektra standardů, kterými byly konkrétně homocystein, homocystein thiolakton, methionin, cystein a cystin. Spektrum cystinu jsem měřila spíše z toho důvodu, že jsem chtěla vidět, jak vypadá oxidovaná thiolová skupina (disulfidový můstek) v IČ spektru a abych zjistila, zda je tam zřetelný posun k jiným vlnočtům, jelikož v mých vzorcích být přítomný nemohl z toho důvodu, že byly pro stanovení celkového homocysteinu redukovány.

Pozadí bylo stabilní po dobu 100 minut, poté jsem jej musela změřit znovu. Příprava tabletek viz *Příprava standardů a vzorků*.

3.4.1.2 Měření technikou zeslabené totální reflexe (ATR)

Při měření vzorků technikou ATR jsem jako pozadí proměřila vzduch a uložila jsem si jej, abych vůči němu vzorky proměřila. Podle typu experimentu jsem pozadí měřila buď před každým vzorkem, nebo jsem si v záložce Experimental Setup - Collect nastavila měření pozadí pokaždých 100 minutách, pokud jsem vzorky měřila v průběhu času, kdy jsem sledovala vliv odpařování vody z usychající plazmy nanesené na krystalu.

Plazmu jsem měřila hned po nanesení na krystal a poté v intervalech po 10 minutách po dobu 1 hodiny, kdy na krystalu zcela zaschla. Jednotlivá spektra jsem si zobrazila v jednom okně programu OMNIC a sledovala jsem změnu tvaru a šířky absorpčních pásů.

3.4.2 Nastavení IČ spektrometru pro techniku KBr tablety

Technikou KBr tablety jsem měřila standardy - homocystein, homocystein thiolakton, methionin, cystein a cystin. Parametry pro měření jsem nastavovala v záložce Experimental Setup – Bench.

Při měření transmisních spekter technikou KBr tablety nebyla optická rychlost (rychlost, jakou se pohybovalo pohyblivé zrcadlo) nastavená vždy na 0,6329, ale při některých měřeních jsem ji musela snížit na 0,4747, aby signál IČ paprsku v rozmezí vhodném pro měření a přístroj měřil správně.

Na rozdíl od spekter měřených technikou ATR se ale při snížené rychlosti dalo proměřit nejen pozadí, ale také tabletky se standardy a nedocházelo k přesycení převodníku. Také automatické zesílení bylo nižší, obvykle 2, jelikož jde o citlivější metodu.

Nastavené parametry přístroje

Parametr	
Sample compartment	Main
Detector	DTGS KBr
Beamsplitter	KBr
Source	IR
Accessory	Transmission E.S.P.
Window	None
Recommended range	4000 - 400
Max range limit	4000
Min range limit	400
Gain	Autogain
Optical velocity	0,6329
Aperture	100
Sample shuttle	-

3.4.3 Nastavení IČ spektrometru pro techniku ATR

ATR technikou jsem měřila vzorky plazmy pacientů FNOL s různou koncentrací obsažených látek (více viz *Příprava vzorků plazmy pro měření technikou ATR*). Parametry měření jsem opět nastavovala v záložce Experimental Setup – Bench.

Optická rychlost při měření technikou zeslabené totální reflexe (ATR) nebyla při všech měřeních 0,6329. Pozadí, kterým byl při měření vzduch, jsem měřila při optické rychlosti 0,4747 a automatickém zesílení (autogain). Při této technice bylo zesílení obvykle 8,

tedy nejvyšší, z toho důvodu, že jde o poměrně málo citlivou metodu. V některých případech jsem musela optickou rychlost snížit dokonce na 0,3165, aby byl paprsek laseru v přijatelném rozmezí.

Vzorky už jsem měřila při normální rychlosti pohyblivého zrcadla (0,6329), jelikož při rychlosti, kterou jsem měřila pozadí, docházelo k přesycení převodníku, při němž byla absorpance v záporných hodnotách, tudíž se spektra nedala vyhodnotit. Zesílení signálu detektoru bylo opět nejvyšší, tedy 8.

Nastavené parametry přístroje

Parametr	
Sample compartment	Main
Detector	DTGS KBr
Beamsplitter	KBr
Source	IR
Accessory	Smart MIRacle
Window	None
Recommened range	4000 - 400
Max range limit	4000
Min range limit	600
Gain	Autogain
Optical velocity	0,6329
Aperture	100
Sample shuttle	-

3.4.4 Vyhodnocování a interpretace infračervených spekter

3.4.4.1 Spektra standardů měřená tabletkovou metodou

Tabletkovou metodou jsem proměřovala absorpci infračerveného záření standardů v rozsahu vlnočtů $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$. Výsledná spektra vyjadřovala závislost absorbance na vlnočtu, přičemž nejvyšší vlnočet (4000 cm^{-1}) byl na ose x v levé části grafu a nejnižší (400 cm^{-1}) na ose x v pravé části grafu. Na ose y byla absorbance. Ve spektrech jsem vždy označila vlnočty absorpčních pásů tlačítkem Find peaks a vyhodnotila jsem je pomocí tabulek vlnočtů.

Jednotlivá spektra jsem navíc porovnávala i vůči sobě, abych zjistila, zda je u homocysteinu nebo jeho thiolaktonu posun některých jejich vlnočtů k jiným hodnotám, než jsou hodnoty vlnočtů ostatních sloučenin obsažených v plazmě.

Zjištěný odlišný vlnočet u homocystein thiolaktonu jsem poté porovnávala i s naměřeným spektrem plazmy bez přídavku homocystein thiolaktonu a poté i se spektrem s postupným přidáváním pevného thiolaktonu do plazmy, abych zjistila, zda je daný vlnočet v plazmě viditelný a zda s ním neinterferuje vlnočet žádné jiné sloučeniny, abych jej mohla použít k prokázání HTL ve vzorku.

3.4.4.2 Spektra vzorků plazmy měřená technikou ATR

Touto metodou jsem proměřovala spektra vzorků plazmy, které mi byly poskytnuty z Fakultní nemocnice Olomouc. Vzorky plazmy pacientů byly anonymní, znala jsem pouze jejich koncentraci homocysteinu.

Absorpci infračerveného záření jsem proměřovala v rozsahu vlnočtů $4000 - 600 \text{ cm}^{-1}$. Výsledná spektra opět vyjadřovala závislost absorbance na vlnočtu, přičemž nejvyšší vlnočet (4000 cm^{-1}) byl na ose x v levé části grafu a nejnižší (600 cm^{-1}) na ose x v pravé části grafu. Na ose y byla absorbance. Ve spektrech jsem opět označila vlnočty absorpčních pásů tlačítkem Find peaks a vyhodnotila jsem je pomocí tabulek vlnočtů.

Ze spekter se nedalo moc vyčíst, jelikož spektra obsahovala v oblasti charakteristických vibrací pouze pár širokých absorpčních pásů, do nichž byly zahrnuty

vlnočty všech sloučenin plazmy. Během usychání se pásy postupně zužovaly a vystupovaly z nich jednotlivé vlnočty.

Tato spektra byla v rozporu s článkem *Analysis of plasma homocysteine levels among patients with chronic renal failure - a spectroscopic approach*, který byl uveřejněn v časopise *Asian Journal of Chemistry*, vol. 22, no. 7 z roku 2010 v rozsahu stránek 5107 – 5112 (více viz *Opakování pokusu z článku Analysis of plasma homocysteine levels among patients with chronic renal failure - A spectroscopic approach*), a který jsem chtěla zopakovat.

3.5 Příprava standardů a vzorků

3.5.1 Příprava KBr tabletky pro měření pozadí

KBr tabletu jsem připravila tak, že jsem do ependorfy odměřila v exsikátoru vysušený KBr po rysku, která na ní byla vyznačena lihovým fixem. Toto množství KBr odpovídalo asi 200 mg látky.

Odměřený KBr jsem přesypala do achátové třecí misky, v níž jsem ho rozetřela na velmi jemný bílý prášek, který jsem opatrně přesypala do ocelové raznice. V ní jsem jej rovnoměrně rozprostřela a jeho povrch jsem se pokusila uhladit špachtlí, aby byla výsledná tableta všude stejně vysoká.

Ocelovou raznici jsem umístila do lisu, v němž jsem tabletu lisovala 15 minut pod tlakem 10 tun. Po uplynutí této doby jsem tabletu opatrně vyndala z raznice, abych ji nepoškodila, vložila jsem ji do držáku na tablety a ten jsem vložila do vzorkového prostoru infračerveného spektrometru, abych ji proměřila.

3.5.2 Příprava KBr tabletky pro měření standardů

Při přípravě tabletek standardů jsem postupovala stejným způsobem jako při přípravě tablety k proměření pozadí. Jediný rozdíl byl v tom, že jsem k vysušenému bromidu draselnému přidala standard, který jsem rovněž před měřením vysušila v exsikátoru.

Standardu jsem dávala trochu, pouze na špičku špachtle, aby jeho koncentrace v tabletě nebyla moc vysoká a aby se výsledné spektrum dalo vyhodnotit.

Odměřený KBr jsem přesypala do achátové třecí misky, přidala jsem k němu standard a společně jsem je rozprostřela na velmi jemný bílý prášek, který jsem opatrně přesypala do ocelové raznice. V ní jsem ho rovnoměrně rozetřela a jeho povrch jsem se pokusila uhladit špachtlí, aby byla výsledná tableta všude stejně vysoká.

Ocelovou raznici jsem umístila do lisu, v němž jsem tabletu lisovala 15 minut pod tlakem 10 tun. Po uplynutí této doby jsem tabletu opatrně vyndala z raznice, abych ji nepoškodila, vložila jsem ji do držáku na tablety a společně s ním jsem ji vložila do vzorkového prostoru infračerveného spektrometru, abych ji proměřila.

Při lisování tabletky s cysteinem jsem prostor ocelové raznice evakuovala, protože používaný standard DL - cystein hydrochlorid na sebe silně vázal vzdušnou vlhkost, takže v jeho spektrech vadila při interpretaci voda, která v oblasti MIR silně absorbuje a navíc vytvářela vodíkové vazby, které překrývaly absorpční pásy aminoskupiny cysteinu.

3.5.3 Příprava vzorků plazmy pro měření technikou ATR

Vzorky plazmy jsem před měřením nijak neupravovala, pouze jsem je nanesla na ATR krystal a proměřila jsem je v průběhu času. Nanášené množství na krystal bylo 10 μ l plazmy.

Tabulka V: Koncentrace homocysteinu ve vzorcích plazmy poskytnutých z fakultní nemocnice v Olomouci, kde byla koncentrace Hcy rovněž stanovena

Číslo vzorku	Koncentrace Hcy [μ mol.l ⁻¹]
1	9,6
2	7,5
3	11,1
4	82,2
5	9,4

Vzorky byly připraveny ve Fakultní nemocnici Olomouc na Oddělení klinické biochemie v Laboratoři dědičných metabolických poruch. Byla v nich změřena koncentrace homocysteinu, kterou jsem zpracovala do tabulky (Tab. V).

3.5.4 Příprava vzorků plazmy ve fakultní nemocnici

Všechny vzorky plazmy byly připraveny ve fakultní nemocnici v Olomouci, koncentrace homocysteinu v nich byla stanovena pomocí HPLC s fluorescenční detekcí.

Plazma byla připravena z nesrážlivé krve odebrané do zkumavky s EDTA z loketní žíly. Horní končetina se při odběru nezaškrtila, krev se nechala volně vytékat. Po odběru byla krev ve zkumavce jemně protřepána a nejpozději do 30 minut byla dopravena do laboratoře, kde byla stočena na centrifuze při 3600 otáčkách/min po dobu 8 minut a poté byla před vlastní analýzou dána do mrazáku, v němž byla uchovávána při teplotě -18 °C až do provedení analýzy.

Pro analýzu bylo do malé ependorfykly odpipetováno 50 µl plazmy (kalibračních roztoků a 2 kontrolních roztoků na 2 koncentračních hladinách H1 a H2). K tomuto množství plazmy bylo poté přidáno 25 µl interního standardu 2 - merkaptoethylaminu, 25 µl fosfátového pufru o pH 7,4 a 10 µl čerstvě připraveného redukčního činidla, kterým byl tris-(2-karboxyethyl)-fosfin (TCEP). Vzorek byl poté 30 minut inkubován při laboratorní teplotě.

Po uplynutí této doby k němu bylo přidáno 90 µl trichloroctové kyseliny (TCA) obsahující 1 mM EDTA a vzorek se opět ponechal stát při laboratorní teplotě. Následně byl vzorek opět stočen na malé centrifuze při 10000 otáčkách/min po dobu 10 minut.

Do vialky byla odpipetováno 10 µl NaOH, 125 µl borátového pufru o pH 9,5, 50 µl čerstvě připraveného SBD-F a 50 µl supernatantu ze stočeného vzorku. Vzorek byl následně inkubován 1 hodinu při 60 °C a poté byl analyzován HPLC s fluorescenční detekcí.

3.6 Opakování pokusu z článku *Analysis of plasma homocysteine levels among patients with chronic renal failure - A spectroscopic approach*

Tento článek byl vydán v časopise *Asian Journal of Chemistry*, vol. 22, no. 7, 2010. Autoři se v něm zabývali stanovením homocysteinu v krevní plazmě u 10 mužů s chronickým selháním ledvin. Jako kontrolu stanovili koncentrace plazmatického homocysteinu také u 10 zdravých mužů. Všichni muži, zdraví i nemocní, byli ve středním věku.

Všem byly odebrány 2 ml kapilární krve do zkumavek obsahujících ethylendiamintetraoctovou kyselinu (EDTA). Všechny vzorky krve byly okamžitě 3 minuty centrifugovány. Po centrifugaci byla plazma odebrána a uložena při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do té doby, než byla analyzována. Těsně před analýzou byly všechny vzorky rozmrazeny ohřátím na pokojovou teplotu ($25 - 30\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Poté byl vždy 1 ml plazmy rovnoměrně rozetřen po povrchu pelety z chromidu thallného a každý takto nanesený vzorek byl 30 minut sušen na vzduchu.

Před vlastní analýzou byla proměřena peleta bez vzorku jako pozadí, vůči němuž byly poté proměřeny vzorky.

Všechny vzorky byly měřeny v rozsahu vlnočtů $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$. Pro rozlišení spekter bylo pořízeno 16 skenů, navíc byla všechna spektra normalizována a korigována.

Autoři vyhodnotili jednotlivé absorpční pásy a přiřadili je konkrétním funkčním skupinám homocysteinu.

3.6.1 Moje provedení

Vzorky plazmy, které jsem obdržela k analýzám, jsem uchovávala v mrazáku. Před vlastní analýzou jsem jednotlivé vzorky nechala při laboratorní teplotě rozmrznout a poté jsem je stočila na vortexu, abych je rozmíchala.

Spektra vzorků jsem snímala na ATR krystalu ze ZnSe v rozmezí vlnočtů $4000 - 600\text{ cm}^{-1}$.

Nejprve jsem nastavila příslušný experiment Smart MIRacle Accessory, ZnSe a poté jsem v nastavení metody v Experimental Setup v záložce Collect zatrhla měření spektra pozadí po každých 100 minutách, další nastavení viz *Nastavení IČ spektrometru pro techniku ATR*.

Po nastavení parametrů metody jsem proměřila jako pozadí vzduch. Poté jsem na krystal nanesla 10 μl plazmy a nechala jsem ji na krystalu zaschnout. Vzorek jsem proměřila a popsala jsem v něm jednotlivé absorpční pásy pomocí tlačítka Find peaks.

Veškeré vlnočty jsem zpracovala do tabulky, jak ty mnou naměřené, tak hodnoty indických vědců, a vyhodnotila jsem je.

3.7 Izolace methionyl, leucyl a isoleucyl - tRNA synthetasy z pekařského droždí

Pro izolaci enzymů jsem nejprve připravila 100 ml 0,1 M fosfátového pufru o pH 7 tak, že jsem do odměrné baňky o objemu 100 ml nalila trochu destilované vody, odpipetovala jsem do ní 684 μl 85 % H_3PO_4 o hustotě $1,685 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$ a přelila jsem ji do kádinky o objemu 100 ml. Do roztoku jsem vložila míchadlo, kádinku jsem postavila na magnetickou míchačku a spustila jsem ji. Roztok jsem titrovala 50 % hydroxidem sodným až do pH 6,997 tak, že při přidávku NaOH jsem míchání vypnula a poté jsem jej zase zapnula. pH titrovaného roztoku jsem kontrolovala jeho měřením skleněnou elektrodou a roztok jsem vždy míchala do ustálení hodnoty pH na displeji elektrody.

Po dosažení požadovaného pH roztoku jsem jej přelila zpět do odměrné baňky a doplnila jsem ji destilovanou vodou po rysku. Poté jsem pufr dala vychladit do lednice, aby jeho teplota byla okolo $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Do vychlazené porcelánové misky z lednice jsem navázila 30 g kvasnic, přidala jsem k nim trochu praného mořského písku a několik kapek vychlazeného fosfátového pufru. Tuto směs jsem pořádně zhomogenizovala rozetřením a poté jsem ji kvantitativně převedla do kádinky, kterou jsem umístila do větší kádinky do polystyrenového boxu s ledem, abych

udržela teplotu prostředí v rozmezí 0 - 4 °C. Směs jsem nechala za občasného promíchání 30 minut extrahovat.

Po uplynutí této doby jsem směs rozdělila do centrifugačních zkumavek, v nichž jsem ji centrifugovala při 600 otáčkách/minutu po dobu 10 minut. Poté jsem odsála supernatant do čistých centrifugačních zkumavek a stočila jsem jej po dobu 35 minut při 6000 otáčkách/minutu. Získaný supernatant jsem opět odsála a rozdělila jsem jej na dvě části - jednu část jsem vysolila síranem amonným a druhou jsem nechala lyofilizovat bez přídavku jakékoliv chemikálie.

Supernatant jsem vysolovala síranem amonným do 30 % nasycení tak, že jsem k 37,5 ml extraktu získaného z kvasnic (což bylo poloviční množství extraktu) přidala 6,6 g pevného síranu. Toto množství jsem vypočítala z tabulek nalezených na stránkách VŠCHT (http://147.33.74.135/knihy/uid_isbn-80-7080-586-2/pages-img/249.html), kde byla uvedena hmotnost přídavku síranu amonného pro jednotlivé konečné koncentrace při teplotě 4 °C.

Po vysolení jsem dala takto upravený extrakt opět do centrifugačních zkumavek a stočila jsem ho 35 minut při 6000 otáčkách/minutu. Z roztoku mi měly vypadnout balastní proteiny, což se nestalo, proto jsem tuto část extraktu dala rovněž na lyofilizaci.

3.8 Syntéza homocystein thiolaktonu vyizolovanými enzymy

Do 6 skleněných vialek jsem dala malé množství standardu homocysteinu (do každé jiné množství - do vialky č. 1 pouze na špičku špachtle, do vialky č. 3 největší množství, asi trojnásobek Hcy ve zkumavce č. 1) a rozpustila jsem ho ve 200 µl fosfátového pufru. Poté jsem k roztoku přidala malé množství ATP a extrakt z kvasnic - lyofilizovaný i vysolený a lyofilizovaný. Vialky jsem uzavřela a inkubovala jsem je 6 hodin při 37 °C.

Po inkubaci jsem jednotlivé vzorky spolu se standardy homocysteinu a homocystein thiolaktonu, které jsem rozpustila v 1 ml fosfátového pufru, nanesla na silikagelovou destičku pro HPTLC a dala jsem ji vyvíjet do mobilní fáze butan-1-ol : octová kyselina : voda v poměru 5 : 1 : 4.

Mobilní fáze jsem připravila 40 ml tak, že jsem v odměrném válci odměřila 16 ml destilované vody do odměrné baňky a přidala jsem k ní 4 ml octové kyseliny a 20 ml butan-1-olu. Směs jsem pořádně promíchala a vlila jsem ji do chromatografické vany, kterou jsem přiklopila sklem a nechala jsem ji půl hodiny stát, aby se její prostor nasýtil parami mobilní fáze. Poté jsem do ní umístila tenkou vrstvu s nanesenými vzorky a vanu jsem opět přiklopila.

To, zda se homocystein a homocystein thiolakton rozseparují, jsem vyzkoušela na standardech během doby, kdy jsem čekala na inkubaci vialek s enzymy. Původní složení mobilní fáze bylo v jiném poměru (butan-1-ol : octová kyselina : voda 4 : 1 : 5), ale tato mobilní fáze je nedokázala úplně rozseparovat. Homocystein a jeho thiolakton by se daly rozlišit pouze na základě barvy (homocystein je růžovofialový a thiolakton žlutý), ale překrývaly by se a to by bylo nedostatečné. Z toho důvodu jsem hledala optimální poměr složek mobilní fáze tak, aby se lišily retardační faktory homocysteinu a thiolaktonu. Vyzkoušela jsem různé poměry, přičemž poměr 5 : 1 : 4 byl nejlepší.

Chromatogram se vyvíjel asi hodinu a půl. Po uplynutí této doby jsem jej vytáhla a tužkou jsem označila, kam až doputovalo čelo mobilní fáze. Tenkou vrstvu jsem vysušila pomocí fénu a pomocí Pasteurovy pipety jsem na ni nanasla ninhydrin, který jsem připravila rozpuštěním pevného ninhydrinu v ethanolu. Tenkou vrstvu jsem opět vysušila fénem a chromatogram jsem vyhodnotila.

3.9 Příprava homocystein thiolaktonu zahříváním

V literatuře jsem našla metodu na převedení homocysteinu na homocystein thiolakton HCl - dependentní dehydratací. Vzhledem k tomu, že šlo o patent, tak v něm byly zmíněny pouze použité chemikálie a jejich koncentrace, nikoliv jejich objemy. Proto jsem do skleněných vialek pipetovala různě objemy používaných sloučenin a hledala jsem jejich optimální poměr, při němž by došlo ke konverzi homocysteinu na jeho thiolakton.

Používanými chemikáliemi byly v patentu roztok homocysteinu o koncentraci 75 μM , 6M kyselina chlorovodíková, 100 μM diethylentriaminpentaoctová kyselina (DTPA)

a 1 mM dithiothreitol (DTT). Já jsem navíc používala ještě 1 mM 2 - merkaptoethanol, jímž jsem nahradila DTT v některých pokusech při přeměně standardu.

Při přeměně homocysteinu na thiolakton v plazmě autoři patentu použili 100 μ M DTPA, 1 mM EDTA a navíc k plazmě přidávali i 0,6 mM HClO₄ pro vysrážení bílkovin. Já jsem pokusy prováděla bez HClO₄, jelikož moje vzorky plazmy už proteiny neobsahovaly. Navíc jsem reakce zkoušela i s použitím DTT a 2 – merkaptoethanolu.

3.9.1 Moje provedení syntézy zahříváním

3.9.1.1 Příprava chemikálií

Příprava roztoku homocysteinu

Nejprve jsem si připravila roztok standardu homocysteinu o koncentraci 500 μ mol.l⁻¹ tak, že jsem si do 5 ml odměrné baňky odvážíla 0,34 mg standardu homocysteinu a doplnila jsem ji destilovanou vodou po rysku.

Příprava 6 M HCl

Dále jsem si připravila 6M HCl tak, že jsem do odměrné baňky o objemu 100 ml nalila trochu vody a poté jsem do ní odlila 59,5 ml koncentrované 32 % HCl a po rysku jsem ji doplnila destilovanou vodou.

Příprava 100 μ M roztoku DTPA

Pro přípravu 100 μ mol.l⁻¹ roztoku DTPA jsem si do odměrné baňky o objemu 50 ml odvážíla 1,97 mg DTPA a poté jsem baňku doplnila destilovanou vodou po rysku. Po provedených pokusech jsem zjistila, že je tato koncentrace moc velká a ruší mi stanovení na tenké vrstvě, proto jsem si připravila její roztok o koncentraci 100 pmol.l⁻¹. To jsem provedla tak, že jsem si do 10 ml odměrné baňky odpipetovala 10 μ l zásobního roztoku a baňku jsem doplnila destilovanou vodou po rysku.

Příprava 1 mM roztoku 2 – merkaptoethanolu

Roztok 2 – merkaptoethanolu s koncentrací 1 mmol.l^{-1} jsem připravila tak, že jsem do 50 ml odměrné baňky odpipetovala $3,5 \mu\text{l}$ zásobního roztoku o koncentraci $14,3 \text{ mol.l}^{-1}$ a doplnila jsem ji destilovanou vodou po rysku.

Příprava 1 mM roztoku DTT

Roztok DTT s koncentrací 1 mmol.l^{-1} jsem si připravila tak, že jsem do vialky odvážíla $0,15 \text{ mg}$ DTT, přidala jsem k němu 1 ml destilované vody a poté jsem roztok rozmíchala na vortexu.

Příprava 1 mM roztoku EDTA

Nakonec jsem si připravila roztok EDTA s koncentrací 1 mmol.l^{-1} . Do vialky jsem odvážíla $0,38 \text{ mg}$ EDTA, odpipetovala jsem k ní 1 ml destilované vody a poté jsem roztok pořádně rozmíchala na vortexu.

Příprava standardů homocysteinu a homocystein thiolaktonu pro HPTLC

Jako standard homocysteinu pro chromatografii na tenké vrstvě jsem použila připravený $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ roztok homocysteinu. Standard homocystein thiolaktonu jsem připravila tak, že jsem do ependorfky navážila $0,08 \text{ mg}$ pevného homocystein thiolaktonu, odpipetovala jsem k němu 1 ml destilované vody a vzniklý roztok jsem stočila na vortexu, abych jej pořádně promíchala.

3.9.1.2 Vlastní provedení pokusu

Poté, co jsem připravila všechny potřebné roztoky, jsem do 6 vialek označených čísly 1 – 6 odpipetovala roztok homocysteinu o koncentraci $500 \mu\text{M}$ a dále 6 M HCl , 100 pM DTPA a 1 mM roztok DTT podle tabulky VI.

Tabulka VI: Objemy pipetovaných roztoků homocysteinu, kyseliny chlorovodíkové, diethylentriaminpentaoctové kyseliny a dithiotreitolu

Vialka	Hcy [μ l]	HCl [μ l]	DTPA [μ l]	DTT [μ l]
1	200	1	1	1
2	200	2	1	1
3	200	3	1	1
4	200	4	1	1
5	200	5	1	1
6	200	10	1	1

Poté jsem všechny vialky uzavřela zátkami, dala je do polystyrenového držáku, který jsem vyrobila, a vložila jsem je do termostatu, v němž jsem je 2 hodiny inkubovala při teplotě 65 °C.

V mezičase jsem připravila 40 ml mobilní fáze stejným způsobem jako v části *Syntéza homocystein thiolaktonu vyizolovanými enzymy*. Směs v odměrné baňce jsem pořádně promíchala a následně jsem ji vlila do chromatografické vany, kterou jsem přiklopila sklem a nechala jsem ji půl hodiny stát, aby se její prostor nasýtil parami mobilní fáze.

Po inkubaci jsem vialky i s držákem vytáhla z termostatu a nechala jsem je zchladnout na laboratorní teplotu. Jednotlivé vzorky, společně se standardy homocysteinu a homocystein thiolaktonu, jsem nanesla na silikagelovou destičku pro HPTLC, pečlivě jsem ji popsala, vložila jsem ji do chromatografické vany s mobilní fází (butan-1-ol : octová kyselina : voda v poměru 5 : 1 : 4) a nechala jsem vyvíjet chromatogram.

Chromatogram se vyvíjel asi hodinu a půl. Po uplynutí této doby jsem jej vytáhla a tužkou jsem označila, kam až doputovalo čelo mobilní fáze. Tenkou vrstvou jsem vysušila pomocí fénu a pomocí Pasteurovy pipety jsem na ni nanesla ninhydrin, který jsem připravila rozpuštěním pevného ninhydrinu v ethanolu. Tenkou vrstvou jsem opět vysušila fénem a z chromatogramu jsem zjistila vhodné objemy 6 M HCl, s nimiž jsem dále prováděla pokusy.

3.9.1.3 Další pokusy pro optimalizaci

Z chromatogramu jsem zjistila, že nejlepší konverze homocysteinu na jeho thiolakton dehydratací pomocí zahřívání byla tehdy, když byl pipetovaný objem 6 M HCl 4 a 5 μl . S těmito objemy jsem tedy dále pracovala a testovala jsem je na roztocích homocysteinu o různých koncentracích.

Koncentrace testovaných roztoků homocysteinu byly 500, 250, 100, 50, 10 a 5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Nejprve jsem do ependorfy připravila 1 ml zásobního roztoku homocysteinu o koncentraci 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ tak, že jsem do ní navážila 0,07 mg standardu homocysteinu, odpipetovala jsem k němu 1 ml destilované vody a vzniklý roztok jsem promíchala na vortexu.

Ze zásobního roztoku jsem poté připravila ředěním roztoky o daných koncentracích, přičemž objemy, které bylo třeba odpipetovat, jsem předem vypočítala ze směšovací rovnice. Roztoky jsem doplnila destilovanou vodou do objemu 1 ml a promíchala jsem je na vortexu.

Do 6 vialek označených čísly 1 – 6 jsem odpipetovala roztok homocysteinu o daných koncentracích a do každé vialky jsem poté přidala 6 M HCl, 100 μM DTPA a 1mM roztok DTT podle tabulky VII.

Tabulka VII: Objemy pipetovaných roztoků homocysteinu o daných koncentracích, kyseliny chlorovodíkové, diethylentriaminpentaoctové kyseliny a dithiothreitolu

Vialka	Hcy [μl]	c_{Hcy} [μM]	HCl [μl]	DTPA [μl]	DTT [μl]
1	200	500	4	1	1
2	200	250	4	1	1
3	200	100	4	1	1
4	200	50	4	1	1
5	200	10	4	1	1
6	200	5	4	1	1

Poté jsem všechny vialky uzavřela zátkami, dala jsem je do polystyrenového držáku a spolu s ním jsem je vložila do termostatu, v němž jsem je 2 hodiny inkubovala při teplotě 65 °C.

V mezičase jsem opět připravila 40 ml mobilní fáze stejným způsobem jako v části *Syntéza homocystein thiolaktonu vyizolovanými enzymy*. Směs v odměrné baňce jsem pořádně promíchala, vlila jsem ji do chromatografické vany, vanu jsem přiklopila sklem a poté jsem ji nechala půl hodiny stát, aby se její prostor nasýtil parami mobilní fáze.

Po inkubaci jsem vialky i s držákem vytáhla z termostatu a nechala jsem je zchladnout na laboratorní teplotu. Jednotlivé vzorky, společně se standardy homocysteinu a homocystein thiolaktonu o koncentracích 500 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, jsem nanesla na silikagelovou destičku pro HPTLC, pečlivě jsem ji popsala, vložila jsem ji do chromatografické vany s mobilní fází (butan-1-ol : octová kyselina : voda v poměru 5 : 1 : 4) a nechala jsem vyvíjet chromatogram.

Chromatogram se vyvíjel asi hodinu a půl. Po uplynutí této doby jsem jej vytáhla a tužkou jsem označila, kam až doputovalo čelo mobilní fáze. Tenkou vrstvu jsem vysušila pomocí fénu a pomocí Pasteurovy pipety jsem na ni nanesla připravený roztok ninhydrinu v ethanolu. Tenkou vrstvu jsem opět vysušila fénem a chromatogram jsem vyhodnotila.

Tento pokus jsem prováděla také s 5 μl 6 M HCl a pro jistotu i se 3 μl 6 M HCl, ale vzhledem k tomu, že na tenké vrstvě není téměř vidět ani koncentrace homocysteinu 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, jsem pokus provedla pouze s roztoky homocysteinu o koncentracích 500, 250 a 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

Postupovala jsem stejným způsobem jako v předchozím pokusu - do 6 vialek označených čísly 7 - 12 jsem odpipetovala roztok homocysteinu o daných koncentracích a do každé vialky jsem poté přidala 6 M HCl, 100 pM DTPA a 1mM roztok DTT podle tabulky VIII.

Vialky jsem uzavřela zátkami a v polystyrenovém držáku jsem je vložila do termostatu, v němž jsem je 2 hodiny inkubovala při teplotě 65 °C.

V mezičase jsem připravila 40 ml mobilní fáze (butan-1-ol : octová kyselina : voda v poměru 5 : 1 : 4) způsobem popsáným dříve v části *Syntéza homocystein thiolaktonu vyizolovanými enzymy*. Směs v odměrné baňce jsem pořádně promíchala, vlila jsem ji do chromatografické vany, vanu jsem přiklopila sklem a poté jsem ji nechala půl hodiny stát, aby se její prostor nasýtil parami mobilní fáze.

Tabulka VIII: Objemy pipetovaných roztoků homocysteinu o daných koncentracích, kyseliny chlorovodíkové, diethylenetriaminpentaoctové kyseliny a dithiothreitolu

Vialka	Hcy [μl]	c_{Hcy} [μM]	HCl [μl]	DTPA [μl]	DTT [μl]
7	200	500	5	1	1
8	200	250	5	1	1
9	200	100	5	1	1
10	200	500	3	1	1
11	200	250	3	1	1
12	200	100	3	1	1

Po inkubaci jsem vialky i s držákem vytáhla z termostatu a nechala jsem je zchladnout na laboratorní teplotu. Jednotlivé vzorky, společně se standardy homocysteinu a homocystein thiolaktonu o koncentracích 500 μmol.l⁻¹, jsem nanesla na silikagelovou destičku pro HPTLC, popsala jsem ji, vložila ji do chromatografické vany s mobilní fází a nechala jsem vyvíjet chromatogram.

Chromatogram se vyvíjel asi hodinu a půl. Po uplynutí této doby jsem jej vytáhla a tužkou jsem označila čelo mobilní fáze. Tenkou vrstvu jsem vysušila pomocí fénu, Pasteurovou pipetou jsem na ni nanesla připravený roztok ninhydrinu v ethanolu, vysušila jsem ji fénem a chromatogram jsem vyhodnotila.

3.9.1.4 Kalibrační řada homocysteinu pro HPTLC

Kalibrační řadu homocysteinu jsem připravovala proto, abych zjistila, jaké koncentrace této aminokyseliny na tenké vrstvě uvidím. Jednotlivé kalibrační roztoky měly koncentrace 10, 1, 0,5, 0,1 a 0,05 mmol.l⁻¹. Nejprve jsem připravila roztok s nejvyšší koncentrací, tedy 10 mmol.l⁻¹, tak, že jsem do ependorfy navážila 1,36 mg standardu homocysteinu a odpipetovala jsem k němu 1 ml destilované vody. Roztok jsem promíchala na vortexu a poté jsem z něj ředěním připravila roztok o koncentraci 1 mmol.l⁻¹. Také jsem připravila roztoky o zbývajících koncentracích tak, že jsem vždy do další ependorfy odpipetovala vypočítaný objem předcházejícího roztoku s vyšší koncentrací, doplnila jsem jej destilovanou vodou do objemu 1 ml a rovněž jsem je promíchala na vortexu.

Takto připravené roztoky sem nanasla na silikagelovou HPTLC destičku (vždy jsem na ni nanasla 20 µl roztoku standardu), vysušila jsem je fénem, destičku jsem vložila do chromatografické vany s připravenou mobilní fází butan-1-ol : octová kyselina : voda v poměru 5 : 1 : 4 a nechala jsem vyvíjet chromatogram, který se vyvíjel asi hodinu a čtvrt.

Po uplynutí této doby jsem jej vytáhla a tužkou jsem označila, kam doputovalo čelo mobilní fáze. Tenkou vrstvu jsem vysušila fénem a pomocí Pasteurovy pipety jsem na ni nanasla připravený roztok ninhydrinu v ethanolu. Tenkou vrstvu jsem opět vysušila fénem a chromatogram jsem vyhodnotila.

3.9.1.5 Kalibrační řada homocystein thiolaktonu pro HPTLC

Kalibrační řadu homocystein thiolaktonu jsem rovněž připravovala proto, abych stejně jako v případě homocysteinu zjistila, jaké nejmenší koncentrace na tenké vrstvě uvidím.

Jednotlivé kalibrační roztoky měly stejné koncentrace jako u homocysteinu, tedy 10, 1, 0,5, 0,1 a 0,05 mmol.l⁻¹. Roztoky jsem připravovala stejným způsobem, jako kalibrační roztoky homocysteinu a chromatogram jsem také vyhodnocovala stejným způsobem.

3.9.1.6 Pokusy s dithiothreitem

Tyto pokusy jsem provedla z toho důvodu, abych zjistila, zda při vyšším obsahu DTT v reakční směsi dojde k větší konverzi homocysteinu na homocystein thiolakton. Postup byl stejný jako v předchozích pokusech.

Do 12 vialek označených čísly 1 – 12 jsem odpipetovala roztok homocysteinu o daných koncentracích a do každé vialky jsem poté přidala 6 M HCl, 100 pM DTPA a 1mM roztok DTT podle tabulky IX.

Tabulka IX: Objemy pipetovaných roztoků homocysteinu o daných koncentracích, kyseliny chlorovodíkové, diethylentriaminpentaoctové kyseliny a dithiothreitolu

Vialka	Hcy [μ l]	c _{Hcy} [μ M]	HCl [μ l]	DTPA [μ l]	DTT [μ l]
1	200	500	3	1	1,5
2	200	250	3	1	1,5
3	200	100	3	1	1,5
4	200	500	4	1	1,5
5	200	250	4	1	1,5
6	200	100	4	1	1,5
7	200	500	5	1	1,5
8	200	250	5	1	1,5
9	200	100	5	1	1,5
10	200	500	3	1	2
11	200	500	4	1	2
12	200	500	5	1	2

Vialky jsem uzavřela zátkami a v polystyrenovém držáku jsem je vložila do termostatu, v němž jsem je 2 hodiny inkubovala při teplotě 65 °C.

V mezičase jsem připravila 40 ml mobilní fáze (butan-1-ol : octová kyselina : voda v poměru 5 : 1 : 4) způsobem popsaným dříve v části *Syntéza homocystein thiolaktonu vyizolovanými enzymy*. Směs v odměrné baňce jsem pořádně promíchala, vlila jsem ji do chromatografické vany, přiklopila jsem ji sklem a poté jsem ji nechala půl hodiny stát, aby se její prostor nasýtil parami mobilní fáze.

Po inkubaci jsem vialky i s držákem vytáhla z termostatu a nechala jsem je zchladnout na laboratorní teplotu. Jednotlivé vzorky, společně se standardy homocysteinu a homocystein thiolaktonu o koncentracích $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$, jsem nanesla na silikagelovou destičku pro HPTLC (nanášela jsem na ni vždy 20 μl vzorků i standardů), kterou jsem popsala, vložila do chromatografické vany a nechala jsem vyvíjet chromatogram.

Chromatogram se vyvíjel asi hodinu a půl. Po uplynutí této doby jsem jej vytáhla a tužkou jsem označila čelo mobilní fáze. Tenkou vrstvu jsem vysušila pomocí fénu a Pasteurovou pipetou jsem na ni nanesla připravený roztok ninhydrinu v ethanolu. Tenkou vrstvu jsem opět vysušila fénem a chromatogram jsem vyhodnotila.

3.9.1.7 Pokusy s 2 - merkaptoethanolem

2 – merkaptoethanol jsem v tomto případě zaměnila za DTT, abych se pokusila zjistit, zda se dá při konverzi homocysteinu na homocystein thiolakton použít také jiné redukční činidlo a pokud ano, tak zda nebude jeho použití lepší.

Pokus jsem provedla tak, že jsem do 6 vialek označených čísly 1 – 6 odpipetovala roztok homocysteinu o koncentraci $500 \mu\text{M}$ a dále 6 M HCl, 100 pM DTPA a 1mM roztok 2 - merkaptoethanolu podle tabulky X.

Poté jsem všechny vialky uzavřela zátkami, dala jsem je do polystyrenového držáku a vložila jsem je do termostatu, v němž jsem je 2 hodiny inkubovala při teplotě $65 \text{ }^\circ\text{C}$.

V mezičase jsem připravila 40 ml mobilní fáze stejným způsobem jako v části *Syntéza homocystein thiolaktonu vyizolovanými enzymy*. Směs v odměrné baňce jsem pořádně promíchala, vlila ji do chromatografické vany, přiklopila ji sklem a nechala jsem ji půl hodiny stát, aby se její prostor nasýtil parami mobilní fáze.

Po inkubaci jsem vialky i s držákem vytáhla z termostatu a nechala jsem je zchladnout na laboratorní teplotu. Jednotlivé vzorky, společně se standardy homocysteinu a homocystein thiolaktonu, jsem nanesla na silikagelovou destičku pro HPTLC (vždy 20 µl vzorků i standardů) a popsala jsem ji. Poté jsem ji vložila do chromatografické vany s mobilní fází (butan-1-ol : octová kyselina : voda v poměru 5 : 1 : 4) a nechala jsem vyvíjet chromatogram.

Tabulka X: Objemy pipetovaných roztoků homocysteinu, kyseliny chlorovodíkové, diethylentriaminpentaoctové kyseliny a 2 - merkaptoethanolu

Vialka	Hcy [µl]	HCl [µl]	DTPA [µl]	Merkaptoethanol [µl]
1	200	1	1	1
2	200	2	1	1
3	200	3	1	1
4	200	4	1	1
5	200	5	1	1
6	200	10	1	1

Chromatogram se vyvíjel hodinu a půl. Po jeho vytažení z vany jsem tužkou označila čelo mobilní fáze a tenkou vrstvu jsem vysušila fénem. Pasteurovou pipetou jsem nananesla roztok ninhydrinu, opět jsem ji vysušila fénem a poté jsem z chromatogramu zjišťovala, zda se účinkem 2-merkaptoethanolu dá provést konverze homocysteinu na homocystein thiolakton a pokud ano, při jakých koncentracích 6 M HCl.

3.9.2 Pokusy s plazmou

Nejprve jsem připravila 3 ml plazmy s přidaným homocysteinem, jehož koncentrace byla 500 µmol.l⁻¹ tak, že jsem do dvou ependorfek navázila 0,1 mg homocysteinu a do každé jsem odpipetovala 1,5 ml plazmy a poté jsem je stočila na vortexu, abych je rozmíchala.

Z takto připraveného zásobního roztoku plazmy jsem ředěním připravila také 1 ml roztoků o koncentracích 250 a 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.

Do 12 vialek označených čísly 1 – 12 jsem odpipetovala plazmu obohacenou homocysteinem o daných koncentracích a dále 6 M HCl, 100 pM DTPA a 1mM roztok DTT nebo 2 - merkaptoethanolu podle tabulky XI.

Tabulka XI: Objemy pipetovaných roztoků homocysteinu, kyseliny chlorovodíkové, diethylentriaminpentaové kyseliny, dithiothreitolu a 2 - merkaptoethanolu

Vialka	Hcy [μl]	c_{Hcy} [μM]	HCl [μl]	DTPA [μl]	DTT [μl]	Merkaptoethanol [μl]
1	200	500	3	1	1	0
2	200	500	4	1	1	0
3	200	500	5	1	1	0
4	200	250	3	1	1	0
5	200	250	4	1	1	0
6	200	250	5	1	1	0
7	200	100	3	1	1	0
8	200	100	4	1	1	0
9	200	100	5	1	1	0
10	200	500	1	1	0	1
11	200	500	1	1	0	1
12	200	500	1	1	0	1

Poté jsem všechny vialky uzavřela zátkami, dala jsem je do polystyrenového držáku a vložila jsem je do termostatu, v němž jsem je 2 hodiny inkubovala při teplotě 65 °C.

Opět jsem připravila 40 ml mobilní fáze (butan-1-ol : octová kyselina : voda v poměru 5 : 1 : 4) způsobem popsáným dříve v části *Syntéza homocystein thiolaktonu vyizolovanými*

enzymy. Směs v odměrné baňce jsem pořádně promíchala a následně jsem ji vlila do chromatografické vany, přiklopila jsem ji sklem a nechala jsem ji půl hodiny stát, aby se její prostor nasýtil parami mobilní fáze.

Po inkubaci jsem vialky i s držákem vytáhla z termostatu, nechala jsem je zchladnout na laboratorní teplotu a poté jsem jednotlivé vzorky, společně se standardy homocysteinu a homocystein thiolaktonu, nanasla na silikagelové destičky pro HPTLC (15 μ l vzorků i standardů), popsala jsem je, vložila je do chromatografické vany s mobilní fází a nechala jsem vyvíjet chromatogramy.

Chromatogram se vyvíjel hodinu a půl. Po uplynutí této doby jsem jej vytáhla a tužkou jsem čelo mobilní fáze. Tenkou vrstvu jsem vysušila pomocí fénu a pomocí Pasteurovy pipety jsem na ni nanasla roztok ninhydrinu. Tenkou vrstvu jsem opět vysušila fénem a chromatogram jsem vyhodnotila.

Poté, co jsem zjistila, že v případě plazmy jsou převést na thiolakton pouze nižší koncentrace homocysteinu, zkusila jsem tuto metodu optimalizovat.

Do 6 vialek jsem odpipetovala plazmu obohacenou přídatkem homocysteinu o daných koncentracích, 6 M HCl, 100 pM DTPA a 1mM roztok DTT podle tabulky XII.

Vialky uzavřela zátkami, dala jsem je do polystyrenového držáku a vložila jsem je do termostatu, v němž jsem je 2 hodiny inkubovala při teplotě 65 °C.

Připravila jsem 40 ml mobilní fáze stejným způsobem jako v předcházejících pokusech. Směs v odměrné baňce jsem promíchala, vlila jsem ji do chromatografické vany, přiklopila jsem ji sklem a nechala jsem ji půl hodiny stát, aby se její prostor nasýtil parami mobilní fáze.

Po inkubaci jsem vialky i s držákem vytáhla z termostatu a nechala jsem je zchladnout na laboratorní teplotu. Jednotlivé vzorky, společně se standardy homocysteinu a homocystein thiolaktonu, jsem nanasla na silikagelovou destičku pro HPTLC (15 μ l vzorků a 20 μ l standardů), kterou jsem popsala, vložila jsem ji do chromatografické vany s mobilní fází (butan-1-ol : octová kyselina : voda v poměru 5 : 1 : 4) a nechala jsem vyvíjet chromatogram.

Tabulka XII: Objemy pipetovaných roztoků homocysteinu, kyseliny chlorovodíkové, diethylenetriaminpentaoctové kyseliny, EDTA a dithiothreitolu

Vialka	Plazma [μl]	cHcy [μM]	HCl [μl]	DTPA [μl]	EDTA [μl]	DTT [μl]
1	200	100	4	1	1	0
2	200	100	5	1	1	0
3	200	150	4	1	1	0
4	200	150	5	1	1	0
5	200	150	4	1	0	1
6	200	150	5	1	0	1

Chromatogram se vyvíjel asi hodinu a půl. Po uplynutí této doby jsem jej vytáhla a tužkou jsem označila, kam doputovalo čelo mobilní fáze. Tenkou vrstvou jsem vysušila pomocí fénu a Pasteurovou pipetou jsem na ni nanasla roztok ninhydrinu. Tenkou vrstvou jsem opět vysušila fénem a chromatogram jsem vyhodnotila.

3.10 Syntéza homocystein thiolaktonu za účasti platiny jako katalyzátoru

Tímto způsobem byl homocystein thiolakton syntetizován už na počátku 30. let 20. století přímo Vincentem du Vigneaudem a jeho spolupracovníky. Pro své účely jsem musela pracovní postup trochu upravit ze dvou důvodů – jednak jsem neměla tolik standardu, jednak jsem thiolakton nepotřebovala izolovat, pouze ho připravit.

Do každé ze 4 vialek jsem navázila 10 mg standardu homocysteinu a poté jsem jej rozpustila ve 100 μl 6 M HCl a stočila na vortexu. Následně jsem do každého roztoku přidala trochu cínu a pár kapek roztoku hexahydrátu kyseliny chloroplaticité nebo hexachloroplaticitanu draselného podle tabulky XIII.

Vialky jsem uzavřela zátkami, dala jsem je do polystyrenového držáku a vložila jsem je do termostatu, v němž jsem je 3 hodiny inkubovala při teplotě 60 °C.

Stejným způsobem jako v předchozích pokusech jsem připravila 40 ml mobilní fáze butan-1-ol : octová kyselina : voda v poměru 5 : 1 : 4. Směs v odměrné baňce jsem pořádně promíchala a následně jsem ji vlila do chromatografické vany, přiklopila jsem ji sklem a nechala jsem ji půl hodiny stát, aby se její prostor nasýtil parami mobilní fáze.

Tabulka XIII: Hmotnost homocysteinu v jednotlivých vialkách, objemy kyseliny chlorovodíkové, forma cínu a použitý katalyzátor

Vialka	Hcy [mg]	HCl [μl]	Cín	Katalyzátor
1	10	100	granulovaný	H ₂ PtCl ₆ .6H ₂ O
2	10	100	granulovaný	K ₂ PtCl ₆
3	10	100	práškový	H ₂ PtCl ₆ .6H ₂ O
4	10	100	práškový	K ₂ PtCl ₆

Po inkubaci jsem vialky s držákem vytáhla z termostatu a nechala jsem je zchladnout na laboratorní teplotu. Jednotlivé vzorky, společně se standardy homocysteinu a homocystein thiolaktonu, jsem nanesla na silikagelovou destičku pro HPTLC (20 μl vzorků i standardů), kterou jsem popsala, vložila jsem ji do chromatografické vany s mobilní fází a nechala jsem vyvíjet chromatogram.

Chromatogram se vyvíjel asi hodinu a půl. Po uplynutí této doby jsem jej vytáhla a tužkou jsem označila čelo mobilní fáze. Tenkou vrstvu jsem vysušila fénem, Pasteurovou pipetou jsem na ni nanesla roztok ninhydrinu, vysušila jsem ji fénem a chromatogram jsem vyhodnotila.

3.11 Měření a vyhodnocování infračervených spekter v NIR

3.11.1 Měření infračervených spekter

Měření se v této oblasti provádí transmisní technikou, při níž jsou vzorky měřeny v kyvetách z křemenného skla (příprava vzorků viz *Příprava standardů a vzorků*).

K měření jednotlivých vzorků a standardů jsem používala nástavec pro měření transmisní technikou. Do vzorkového prostoru jsem umístila držák s vidlicí vybíhající proti laserovému paprsku, na niž jsem položila podložní sklíčko pro mikroskopii. Na sklíčko jsem poté pokládala křemennou kyvetu s jednotlivými standardy a vzorky.

Veškerá spektra jsem opět měřila v programu OMNIC 8 firmy Thermo Scientific, po jehož zapnutí jsem vybrala příslušný experiment Transmission – NIR (transmission_NIR.EXP). Následně jsem v záložce Experimental Setup – Collect nastavila počet skenů na 32, rozlišení na 8 cm^{-1} , jako finální formát absorbanci a také to, že spektrum pozadí bylo snímáno po každých 100 minutách (podrobné nastavení viz *Nastavení IČ spektrometru pro měření v NIR*).

Spektra standardů i plazmy s přídavkem homocystein thiolaktonu jsem měřila transmisní technikou v rozsahu vlnočtů $12400 - 5400\text{ cm}^{-1}$. Po jejich proměření jsem spektra vždy uložila a příslušné absorpční pásy jsem označila vlnočty.

Rozdílem oproti měření v oblasti MIR bylo to, že signály standardů byly velmi slabé, největší signály dávala voda, proto jsem od spekter jednotlivých standardů odečítala spektrum čisté vody jakožto blanku. Takto jsem získala spektra čistých standardů bez rušivého vlivu vody, v nichž jsem vyhodnocovala jejich absorpční pásy a jejich intenzitu. Spektrum vody jsem odečetla také od spekter vzorků plazmy obohacené o homocystein thiolakton.

Spektra roztoků homocystein thiolaktonu jsem zpracovávala také v programu TQ Analyst 8 firmy Thermo Scientific, kde jsem se pokusila o kvantifikaci dvou roztoků s různými koncentracemi homocystein thiolaktonu.

3.11.2 Nastavení IČ spektrometru pro měření v NIR

V NIR jsem proměřovala jak standardy homocysteinu, homocystein thiolaktonu, methioninu a cysteinu, tak i plazmu s přídatkem pevného homocystein thiolaktonu. Tyto hodnoty jsem nastavovala v záložce Experimental Setup – Bench.

Při měřeních standardů v NIR jsem jednotlivé vzorky měřila při třech různých optických rychlostech – při rychlosti 0,6329, 0,4747 a 0,3165. Sledovala jsem jednotlivá spektra, tvar a šířku jejich absorpčních pásů a hodnotila jsem to, při jaké optické rychlosti pohyblivého zrcadla mají nejvyšší intenzitu. Intenzita byla nejvyšší právě při rychlosti 0,3165, kdy byl navíc signál laserového paprsku dopadajícího na detektor v referenčním rozmezí.

Zesílení při měření jednotlivých spekter jsem nastavila na autogain, kdy si přístroj sám vyhodnotil, jaké zesílení je nejlepší – obvykle to bylo největší zesílení paprsku, tedy 8.

Nastavené parametry přístroje

Parametr	
Sample compartment	Main
Detector	InGaAs
Beamsplitter	CaF ₂
Source	Bílé světlo
Accessory	Transmission E.S.P.
Window	None
Reccomended range	12400 - 5400
Max range limit	12400
Min range limit	5400
Gain	Autogain
Optical velocity	0,3165
Aperture	44
Sample shuttle	-

3.11.3 Vyhodnocování a interpretace infračervených spekter

3.11.3.1 Spektra standardů

Transmisní metodou jsem proměřovala absorpci infračerveného záření standardů v rozsahu vlnočtů $12400 - 5400 \text{ cm}^{-1}$. Výsledná spektra vyjadřovala závislost absorbance na vlnočtu, přičemž nejvyšší vlnočet (12400 cm^{-1}) byl na ose x v levé části grafu a nejnižší (5400 cm^{-1}) na ose x v pravé části grafu. Na ose y byla absorbance. Ve spektrech jsem vždy označila vlnočty absorpčních pásů tlačítkem Find peaks a vyhodnotila jsem je.

Od spekter jednotlivých standardů, které jsem připravila rozpuštěním vypočítané navážky pevné aminokyseliny ve vodě, jsem vždy odečítala spektrum vody, jelikož ta v této oblasti absorbovala IČ záření silně, tudíž nešlo určit, zda příslušný vlnočet patří standardu, nebo vodě. Vyhodnocovala jsem také spektra, od nichž jsem vodu neodečítala.

Jednotlivá spektra jsem navíc porovnávala i vůči sobě, abych zjistila, zda je u homocysteinu nebo jeho thiolaktonu posun některých jejich vlnočtů k jiným hodnotám, než jsou hodnoty vlnočtů ostatních sloučenin obsažených v plazmě.

3.11.3.2 Spektra plazmy

Spektra plazmy jsem měřila stejným způsobem jako spektra standardů v rozsahu vlnočtů $12400 - 5400 \text{ cm}^{-1}$. Výsledná spektra opět vyjadřovala závislost absorbance na vlnočtu, přičemž nejvyšší vlnočet (12400 cm^{-1}) byl na ose x v levé části grafu a nejnižší (5400 cm^{-1}) na ose x v pravé části grafu. Na ose y byla absorbance. Ve spektrech jsem si vždy označila vlnočty absorpčních pásů tlačítkem Find peaks a vyhodnotila jsem je.

Od spekter jednotlivých vzorků plazmy, které jsem připravila ředěním zásobního roztoku plazmy s koncentrací homocystein thiolaktonu $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$, jsem vždy odečítala spektrum vody, jelikož ta v této oblasti absorbovala IČ záření silně, tudíž nešlo určit, zda příslušný vlnočet patří vzorku, nebo vodě.

3.12 Příprava standardů a vzorků

3.12.1 Příprava standardů

Standardy jsem připravovala tak, že jsem do odměrné baňky o objemu 25 ml navážila vypočítané množství homocysteinu, homocystein thiolaktonu, methioninu a cysteinu tak, aby koncentrace zásobního roztoku byla 1 mmol.l^{-1} . Jednotlivé aminokyseliny jsem rozpustila v malém množství destilované vody, odměrnou baňku jsem doplnila po rysku a pořádně jsem roztok v ní promíchala.

Ředěním jsem připravila roztoky s koncentracemi 500, 250, 100, 50, 10 a $5 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$. Všechny tyto roztoky jsem opět připravovala do odměrných baněk o objemu 5 ml tak, že jsem odpipetovala vypočítané množství roztoku do odměrné baňky a doplnila jsem ji destilovanou vodou po rysku.

U roztoku homocystein thiolaktonu jsem připravila také roztoky o koncentracích 300 a $80 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$. Tyto roztoky jsem použila ke kvantifikaci homocystein thiolaktonu ve vzorku.

3.12.2 Příprava vzorků

Nejprve jsem připravila plazmu obohacenou o homocystein thiolakton tak, aby jeho výsledná koncentrace v ní byla $500 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$. To jsem provedla tak, že jsem do ependorfské navážila 0,08 mg homocystein thiolaktonu, odpipetovala jsem k němu 1 ml plazmy a vzniklý roztok jsem promíchala na vortexu.

Poté jsem připravila roztoky plazmy o koncentraci thiolaktonu 60 a $100 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$. To jsem provedla tak, že jsem odpipetovala vypočítané množství zásobního roztoku plazmy a poté jsem k němu odpipetovala destilovanou vodu tak, aby byl výsledný objem ředěných roztoků 3 ml a promíchala jsem je.

3.13 Kvantifikace homocystein thiolaktonu v programu TQ Analyst

O kvantifikaci homocystein thiolaktonu jsem se pokusila v softwaru TQ Analyst. Spektra kalibračních roztoků i dvou roztoků ke stanovení obsahu HTL jsem proměřila v programu OMNIC a poté jsem je dále zpracovávala v programu TQ Analyst.

Kalibrační roztoky měly koncentrace 1 mmol.l⁻¹, 500, 250, 100, 50, 10 a 5 μmol.l⁻¹. Dále jsem ke kalibraci použila i destilovanou vodu, v níž byla koncentrace analytu 0 μmol.l⁻¹. Roztoky, které jsem připravila k proměření, měly koncentraci homocystein thiolaktonu 300 a 80 μmol.l⁻¹.

Pokusila jsem se kvantifikovat také homocystein thiolakton přidaný do plazmy. Koncentrace thiolaktonu v roztocích plazmy byla 60 a 100 μmol.l⁻¹.

V programu TQ Analyst jsem zvolila jako metodu k vyhodnocení kalibrační závislosti a koncentrace homocystein thiolaktonu ve vzorcích metodu nejmenších čtverců (PLS) v záložce Description. Následně jsem si v záložce Pathlength nastavila konstantní tloušťku kyvety a v záložce Components jsem si nastavila název stanovovaného analytu, jeho zkratku a jednotku a také horní a dolní limit pro analýzu. Jako další jsem si v záložce Standards – Open Standard vložila do softwaru spektra standardů pro kalibraci a jejich koncentrace a dále jsem vybrala spektrální oblast v záložce Regions – Suggest. Kalibraci jsem provedla pomocí tlačítka Calibrate, program vyhodnotil kalibrační závislost a chybu stanovení. Poté už jsem jen vybrala spektra vzorků, jejichž koncentraci jsem chtěla proměřit, a provedla jsem jejich kvantifikaci. Pro kvantifikaci i s výběrem spekter jsem použila tlačítko Quantify.

Koncentraci homocystein thiolaktonu přístroj vyhodnotil, výsledky jsem obdržela v tabulce společně s chybou stanovení.

4. Výsledky a diskuze

4.1 Vyhodnocení a interpretace infračervených spekter

4.1.1 Spektra standardů měřená tabletkovou metodou

Tabletkovou metodou jsem proměřovala nejen spektra samostatných standardů (spektra viz přílohy 1 - 4), ale také spektra směsných tabletek (spektra viz přílohy 8 a 9), kdy jsem smíchala dva i více standardů (homocystein, homocystein thiolakton, cystein a methionin) dohromady, dobře jsem je zhomogenizovala a vylisovala jsem z nich tabletku, kterou jsem proměřila.

U spekter samostatných standardů jsem za pomoci tabulek vlnočtů vyhodnotila odpovídající absorpční pásy (přiřazení vlnočtů jednotlivým funkčním skupinám Tab. XIV). Poté, co jsem vyhodnotila jednotlivá spektra samostatných standardů, jsem porovnávala spektra standardů i vůči sobě navzájem (spektra viz přílohy 5 – 7) a hledala jsem v nich vlnočty, který by se od ostatních hodnot lišil dostatečně na to, abych mohla na jeho základě říct, že jde o určitou sloučeninu. Hodnoty vlnočtů u standardů homocysteinu, cysteinu a methioninu se k určení toho, o jakou látku jde, využít nedaly, jelikož byly podobné, ale u homocystein thiolaktonu jsem našla vlnočty, který u žádného jiného standardu nebyl.

Konkrétně šlo o vlnočty s hodnotou okolo $1995 - 1992 \text{ cm}^{-1}$, který jsem ve spektru žádné jiné aminokyseliny nenašla. Proto mě napadlo, že pokud bych homocystein dokázala převést na jeho thiolakton, mohl by jít v plazmě prokázat a snad i kvantifikovat.

Při překrývání spekter standardů přes sebe jsem zjistila, že rovněž cystein má v oblasti těsně pod 2000 cm^{-1} absorpční pás slabé intenzity stejně jako homocystein thiolakton, ale po dalším zkoumání jejich spekter jsem zjistila, že je tato hodnota zhruba o 20 cm^{-1} nižší (přesný vlnočty byl $1973,98 \text{ cm}^{-1}$) a že tedy nebude důkaz homocystein thiolaktonu ve vzorku rušit (viz spektrum 7 v příloze).

Při proměrování směsných tabletek jsem zjistila, že vlnočty $1995 - 1992 \text{ cm}^{-1}$ homocystein thiolaktonu je dobře viditelný také ve spektrech směsných tabletek. Bylo tomu tak nejen v případě, kdy jsem smíchala, rozemlela a vylisovala do tabletky homocystein

a homocystein thiolakton (viz spektrum 8 v příloze), ale také v případě, kdy jsem proměřovala tabletku obsahující všechny 4 standardy – homocystein, homocystein thiolakton, methionin i cystein (viz spektrum 9 v příloze).

4.1.2 Spektra vzorků plazmy měřená technikou ATR

Spektra vzorků plazmy jsem měřila technikou ATR ve střední oblasti. Měřila jsem jak čistou plazmu (viz spektrum 10 v příloze), kterou jsem nanesla na ZnSe krystal a nechala jsem ji na něm zaschnout, tak plazmu obohacenou o homocystein thiolakton (viz spektra 11 a 12 v příloze), který jsem do plazmy přidávala proto, abych zjistila, zda v ní půjde vidět a zda bych jej tudíž mohla využít pro stanovení homocysteinu v plazmě poté, co bych jej na thiolakton převedla.

Ve spektru 10, v němž byla měřena časová závislost změn spektra při usychání plazmy na krystalu, jde vidět, jak se mění jednotlivé absorpční pásy – snižují se a zužují, tudíž jsem postupně mohla označit jednotlivé vlnočty. Ve spektru jde vidět, že plazma u vlnočtů v rozmezí kolem 1995 cm^{-1} IČ záření neabsorbuje, což je vidět také ve spektru 13, v němž jsem porovnávala spektrum plazmy jak s homocysteinem, tak s homocystein thiolaktonem.

Ve spektru 11 jde vidět, jak se mění spektrum plazmy se zvyšující se koncentrací homocystein thiolaktonu, který jsem do plazmy přidávala. Plazmu s jeho přídatkem jsem opět nanesla na ATR krystal, nechala jsem ji na něm uschnout a teprve poté jsem ji proměřila.

Nejprve jsem thiolakton do plazmy přidávala po troškách bez vážení, tudíž jsem neznala jeho obsah v ní. Celkem jsem jej přidala do plazmy 5x, při posledním přídatku už šel zřetelně vidět pás thiolaktonu u vlnočtu $1995,06\text{ cm}^{-1}$, ve spektru byly vidět i některé další jeho vlnočty (viz spektrum 11 v příloze).

Poté jsem testovala, při jaké konkrétní koncentraci v plazmě thiolakton uvidím. Proto jsem připravila vzorky plazmy s obsahy homocystein thiolaktonu $100\text{ a }500\text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$ a $1, 50\text{ a }100\text{ mmol.l}^{-1}$. Tyto vzorky jsem postupně nanášela na ATR krystal a měřila jsem spektra po jejich zaschnutí. Ve spektrech s koncentracemi $100\text{ a }500\text{ }\mu\text{mol.l}^{-1}$ a $1\text{ a }50\text{ mmol.l}^{-1}$ nebyl vlnočet charakteristický pro homocystein thiolakton vůbec vidět, ovšem při měření spektra s koncentrací thiolaktonu 100 mmol.l^{-1} , jsem zjistila, že je tato koncentrace pro jeho důkaz

v plazmě moc velká. Proto jsem připravila také plazmu s koncentrací homocystein thiolaktonu 75 mmol.l^{-1} a proměřila jsem také ji. I tato koncentrace byla příliš vysoká, jak je vidět ve spektru 12.

To znamená, že pokud má být homocystein thiolakton v IČ spektru vidět, musí být jeho koncentrace v rozmezí $50 - 75 \text{ mmol.l}^{-1}$.

4.2 Opakování pokusu z článku Analysis of plasma homocysteine levels among patients with chronic renal failure - A spectroscopic approach

Tento pokus jsem opakovala z toho důvodu, abych viděla, jak vypadají vzorky plazmy při použití infračervené spektroskopie a zda je ve spektru vidět některý z vlnočtů homocysteinu. Spektra, která jsem naměřila technikou ATR, byla pěkně čitelná a obsahovala pouze pár absorpčních pásů.

Všechny tyto pásy, které autoři článku ve spektrech zjistili (Tab. XIV), a s nimiž se mnou naměřené pásy až na menší rozdíly ve vlnočtech shodovaly, však přisoudili pouze homocysteinu.

Tento závěr ovšem není správný, jelikož v plazmě není obsažen pouze homocystein, ale jsou v ní přítomny také další aminokyseliny a jiné látky, například sacharidy, které v této oblasti také absorbují IČ záření a které tím pádem k těmto pásům také přispěly.

V článku dále autoři uváděli, že široký pás u vlnočtů $3300 - 2300 \text{ cm}^{-1}$ (v mém případě $3650 - 2750 \text{ cm}^{-1}$) příslušel symetrickým a antisymetrickým valenčním vibracím aminoskupiny NH_2 , což dle mého názoru není pravda, jelikož půjde o absorpční pás vodíkových vazeb hydroxylových OH – skupin kyselých aminokyselin i dalších látek, které tyto skupiny obsahují (např. již zmíněné cukry).

Ve spektru 13 jsem porovnávala spektrum plazmy se spektrem homocysteinu i homocystein thiolaktonu. Jde v něm vidět, že plazma vykazuje vyšší absorbanci než čisté standardy a že žádný z jejích vlnočtů nemůžeme přisoudit pouze homocysteinu.

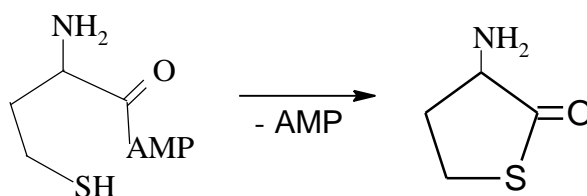
Tabulka XIV: Vlnočty, které naměřili autoři článku uveřejněného v časopise *Asian Journal of Chemistry* a hodnoty vlnočtů, které jsem naměřila při opakování jejich pokusu

Vibrace	Vlnočty z článku [cm ⁻¹]	Naměřené vlnočty [cm ⁻¹]
Symetrické a antisymetrické valenční vibrace vazby N-H	3300 - 2300	3650 - 2750
Valenční vibrace vazby N-H	3295	3282,56
Symetrické a antisymetrické valenční vibrace skupiny CH ₂	2996 - 2819	2930,48
Asymetrická deformační vibrace skupiny CH ₂	2930	2930,31
Valenční vibrace skupiny C=O	1656	1640,80
Deformační vibrace skupiny NH ₂	1542	1538,78
Valenční vibrace skupiny COO-	1480 - 1360	1396,50
Asymetrická valenční vibrace skupiny CH ₂	1456	1453
Vibrace vazby C-S	710 - 570	652,15
Vibrace disulfidické vazby S-S	540 - 500	-

Vibraci disulfidického můstku jsem ve svých spektrech neviděla ze dvou důvodů. Jednak jsem spektra snímala pouze v rozsahu vlnočtů 4000 - 600 cm⁻¹, takže vlnočty mimo toto rozmezí jsem neviděla, a jednak jsem měla redukovanou plazmu, v níž být ani nemohly.

4.3 Izolace methionyl, leucyl a isoleucyl - tRNA synthetasy z pekařského droždí a následná syntéza homocystein thiolaktonu vyizolovanými enzymy

Moje původní myšlenka byla převést homocystein na homocystein thiolakton pro stanovení infračervenou spektrometrií účinkem enzymů tRNA synthetas. Thiolakton by měl vznikat účinkem methionyl-tRNA synthetasy (v současné literatuře se uvádí, že jeho vznik mohou katalyzovat také další dvě tRNA synthetasy – isoleucyl-tRNA synthetasa a leucyl-tRNA synthetasa) ve dvoukrokové reakci, která je uvedena níže (Obr.14).



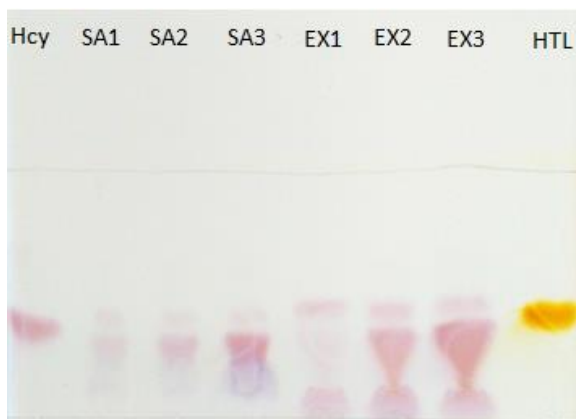
Obrázek 14: Syntéza homocystein thiolaktonu enzymem methionyl-tRNA synthetasou (MetRS)

Problémem bylo to, že se tento enzym nedá nikde koupit, tudíž jsem se jej pokusila izolovat z pekařského droždí (kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*) a poté jej použít na přeměnu homocysteinu na jeho thiolakton.

V literatuře jsem našla obecný postup izolace a extrakce enzymů, který jsem následně upravovala s návodem na izolaci některých konkrétních enzymů v návodech z VŠCHT uveřejněných na internetu.

Veškeré kroky jsem prováděla při teplotě okolo 0 °C, aby zůstala zachována biologická aktivita enzymů. Tuto teplotu jsem nemohla udržet jedině tehdy, když jsem prováděla centrifugaci extraktu z kvasinek, jelikož jsem neměla k dispozici chlazenou centrifugu, navíc centrifuga neměla dostatečný počet otáček, tudíž jsem extrakt musela centrifugovat déle, a tak se zahříval delší dobu.

Toto bylo pravděpodobně příčinou toho, že tento postup nefungoval – enzymy nebyly biologicky aktivní. Další příčinou mohlo být to, že jsem do reakční směsi dala malé množství ATP nebo malé množství enzymů, které byly obsaženy v extraktu společně s dalšími proteiny uvolněnými z buněk. Také jsem mohla zvolit teplotu, která není pro činnost kvasinek ideální nebo mohlo jít o kombinaci všech těchto faktorů.



Obrázek 15: Fotografie HPTLC destičky s vyvinutým chromatogramem po syntéze tRNA synthetasami vyizolovanými z pekařského droždí (fotografie byla upravena a zmenšena v programu Malování stejně jako všechny ostatní), homocystein a homocystein thiolakton jsou standardy s koncentrací $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$

Zkratky: SA1 – SA3 – extrakt, v němž byly enzymy a další proteiny vysoleny síranem amonným (nejmenší koncentrace Hcy a enzymů byla ve vialce označené SA1, největší ve vialce SA3); EX1 – EX3 – lyofilizovaný extrakt (nejmenší koncentrace Hcy a enzymů byla opět ve vialce označené EX1, největší ve vialce EX3)

Každopádně po nanesení inkubovaných vzorků spolu se standardy homocysteinu a homocystein thiolaktonu na tenkou vrstvu a vyvinutí chromatogramu (Obr. 15) na něm nebyl žádný thiolakton, pouze homocystein a další proteiny, které byly v extraktech obsaženy a na tenké vrstvě se rozdělily.

Pokud by při této syntéze nějaký homocystein thiolakton vznikal, byl by na chromatogramu vidět alespoň náznak žlutého proužku, který by byl trochu výš než

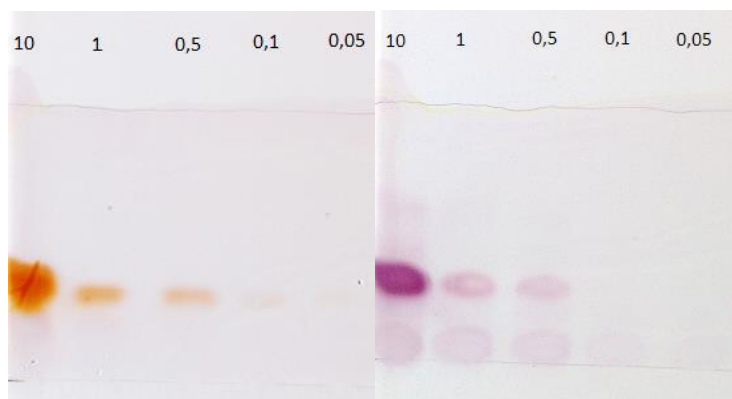
růžovofialový proužek homocysteinu, jelikož thiolakton má na tenké vrstvě při použití této mobilní fáze menší retenci.

4.4 Příprava homocystein thiolaktonu zahříváním

4.4.1 Kalibrační řada homocysteinu a homocystein thiolaktonu pro HPTLC

Kalibrační řady těchto dvou látek jsem dělala z toho důvodu, abych viděla, jakou nejmenší koncentraci homocysteinu a homocystein thiolaktonu na tenké vrstvě uvidím. Nanesla jsem na ni vždy 20 μl roztoků standardů, které měly koncentrace 10 a 1 mmol.l^{-1} a 500, 100 a 50 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Po vyvinutí chromatogramu jsem zjistila, že nejmenší koncentrace, která jde na tenké vrstvě vidět, je 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ (i když na fotografiích to není úplně patrné), tudíž nemá smysl připravovat roztoky homocysteinu pro konverzi na thiolakton pod tuto hodnotu.

Proto jsem pro pokusy s přeměnou homocysteinu na thiolakton připravovala roztoky o koncentracích Hcy 500, 250 a 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$.



Obrázek 16: Fotografie HPTLC destičky s vyvinutými chromatogramy kalibračních roztoků homocysteinu a homocystein thiolaktonu – vlevo je na tenké vrstvě nanesen homocystein thiolakton, vpravo homocystein; koncentrace jednotlivých roztoků jsou v mmol.l^{-1}

4.4.2 Pokusy s dithiothreitolom

Dithiothreitol jsem zpočátku používala jen v minimálním množství, do reakční směsi jsem přidávala jen 1 μl roztoku DTT o koncentraci 1 mmol.l^{-1} . K částečné přeměně homocysteinu na thiolakton toto množství stačilo, jak je vidět na obrázcích (Obr. 17 a 18).

Poté jsem zkoušela do reakční směsi pipetovat také větší objemy DTT, ale neviděla jsem žádnou změnu. Ať jsem pipetovala jakékoliv množství, skvrny homocysteinu a homocystein thiolaktonu se na tenké vrstvě nezměnily, vypadaly stále stejně velké (jejich barevná intenzita závisela na koncentraci roztoku homocysteinu) (Obr. 19).

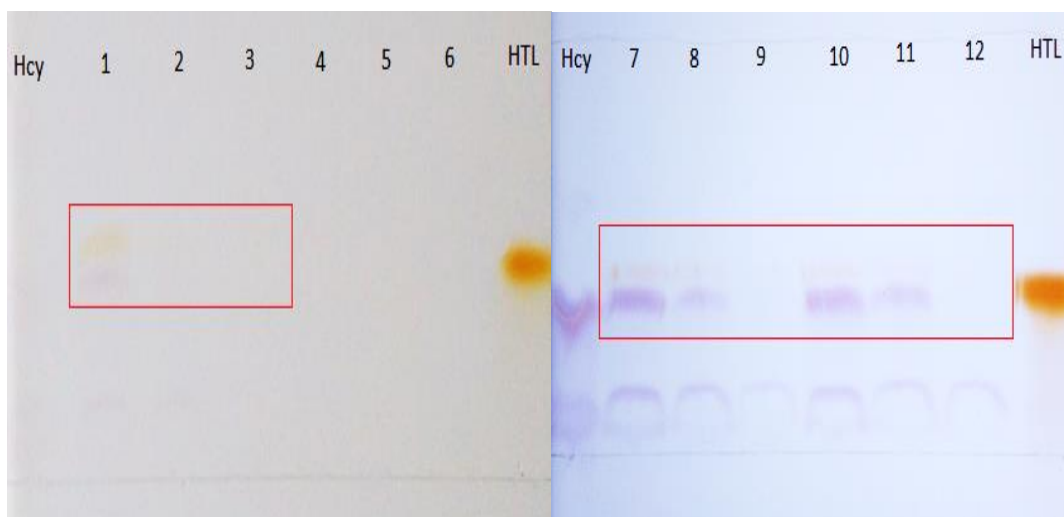


Obrázek 17: Fotografie HPTLC destičky s vyvinutým chromatogramem s první úspěšnou konverzí homocysteinu na jeho thiolakton, homocystein a homocystein thiolakton jsou standardy s koncentrací $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$

1 - 6 – čísla vialek obsahujících Hcy, 6 M HCl, 100 pM DTPA a 1 mM DTT (Tab. VI v experimentální části)

Dále jsem zkoušela, jak se bude měnit chromatogram, když budu pipetovat různé objemy HCl. Zjistila jsem, že už při 5 μl 6 M HCl se chromatogram začíná rozmývat a při 10 μl 6 M HCl už je toto rozmytí tak velké, že jde na tenké vrstvě vidět bílá skvrna, která připomíná plápolající plameny. To bylo pravděpodobně příčinou toho, proč mi na počátku nevyšla ani jedna přeměna homocysteinu na jeho thiolakton – jednoduše jsem do reakční

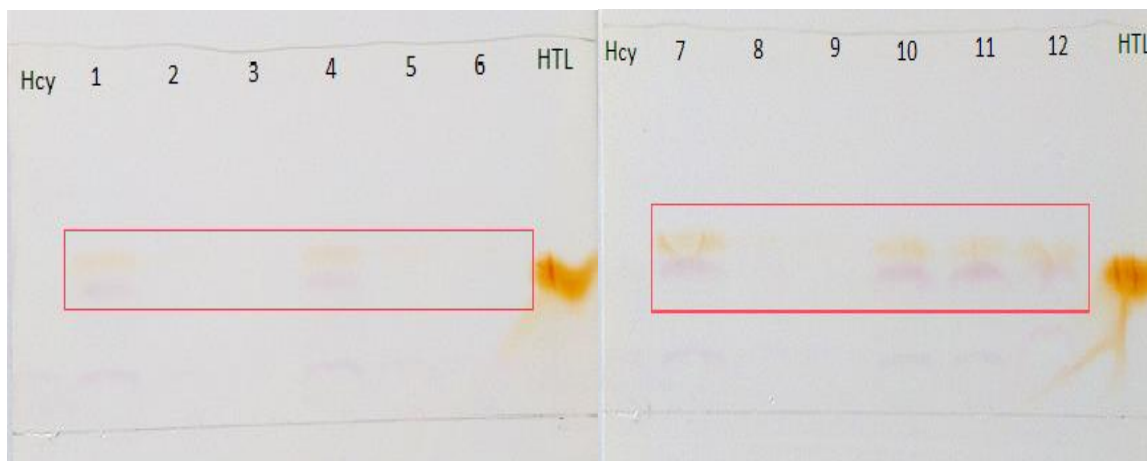
směsi pipetovala příliš velké objemy a chromatogramy byly příliš rozmyté, tudíž se vůbec nedaly vyhodnotit a pokud homocystein thiolakton při některé syntéze vznikl, neviděla jsem jej.



Obrázek18: Fotografie HPTLC destičky s vyvinutými chromatogramy pro optimalizaci objemu HCl, homocystein a homocystein thiolakton jsou standardy s koncentrací $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – v červeném rámečku je označena úspěšná přeměna homocysteinu na thiolakton

1 - 6 – čísla vialek obsahující roztok Hcy, $4 \mu\text{l}$ 6 M HCl , 100 pM DTPA a 1 mM DTT (Tab. VII v experimentální části)

7 – 12 – čísla vialek s odpipetovanými roztoky Hcy, 3 a $5 \mu\text{l}$ 6 M HCl , 100 pM DTPA a 1 mM DTT (Tab. VIII v experimentální části)



Obrázek 19: Fotografie HPTLC destičky s vyvinutými chromatogramy pro optimalizaci objemu DTT, homocystein a homocystein thiolakton jsou standardy s koncentrací $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – v červeném rámečku je označena úspěšná přeměna homocysteinu na thiolakton

1 - 12 – čísla vialek s odpipetovanými roztoky Hcy, 6 M HCl, 100 pM DTPA a 1 mM DTT (Tab. IX v experimentální části)

4.4.3 Pokusy s 2 – merkaptoethanolem

2 – merkaptoethanol jsem použila k přeměně homocysteinu na homocystein thiolakton až tehdy, když už jsem věděla, za jakých podmínek dochází ke konverzi při použití DTT. Jak je vidět z fotografie HPTLC destičky, dá se při konverzi homocysteinu na homocystein thiolakton použít i 2 – merkaptoethanol, i když je mnohem lepší použít DTT, jelikož jeho účinkem je přeměna větší.

Navíc při použití 2 – merkaptoethanolu došlo k přeměně pouze při objemu 1 μl merkaptoethanolu. Na HPTLC destičce (Obr. 20) sice byla žlutě zbarvená skvrna také u objemů 4 a 5 μl , ale vzhledem k tomu, že se trochu rozmyl standard thiolaktonu, tak jsem nemohla určit, zda šlo o přeměněný homocystein nebo pouze o rozmytý standard. Toto rozmytí, které je patrné u vialky č. 6 obsahující 10 μl HCl, bylo pravděpodobně způsobeno příliš vysokým obsahem HCl na destičce.



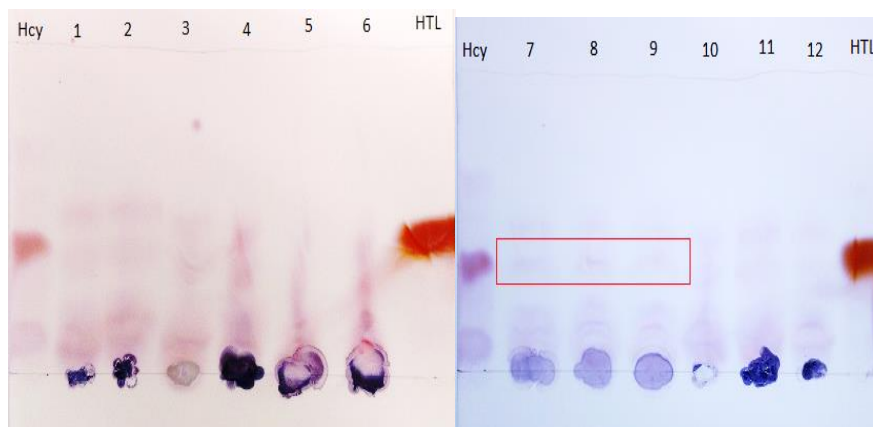
Obrázek 20: Fotografie HPTLC destičky s vyvinutým chromatogramem po konverzi homocysteinu na thiolakton za použití 2 – merkaptoethanolu místo DTT, homocystein a homocystein thiolakton jsou standardy s koncentrací $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$

1 – 6 – čísla vialek obsahujících Hcy, 6 M HCl, 100 pM DTPA a 1 mM 2 - merkaptoethanol (Tab. X v experimentální části)

4.4.4 Pokusy s plazmou

Vzhledem k tomu, že na tenké vrstvě je vidět nejmenší koncentrace homocysteinu kolem $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a ve všech vzorcích plazmy, které jsem měla k dispozici, byl jeho obsah nižší, musela jsem plazmu o homocystein obohatit. To jsem provedla tak, že jsem navázila 0,2 mg homocysteinu, odpipetovala jsem k němu 3 ml plazmy a připravila jsem plazmu s koncentrací $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ přidaného homocysteinu. Ředěním tohoto zásobního roztoku plazmy jsem připravila rovněž roztoky plazmy s koncentracemi přidaného homocysteinu 250 a $100 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a nechala jsem je inkubovat.

Po vyjmutí vzorků z termostatu jsem zjistila, že z nějakého důvodu došlo k denuraci látek z plazmy (příčinou bylo pravděpodobně nízké pH 6 M HCl), jelikož plazma zgelovatěla a špatně se nanášela na HPTLC destičku i poté, co jsem se ji pokusila naředit vodou. Gel se nevytvořil pouze ve vialkách, které obsahovaly plazmu s nejnižším obsahem homocysteinu. Právě u těchto 3 vzorků (vialky č. 7 – 9) došlo k přeměně homocysteinu na homocystein thiolakton, což bohužel není na obrázku (Obr. 21) dobře vidět.

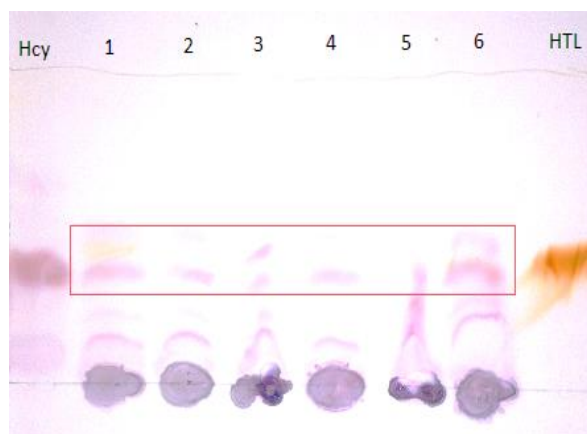


Obrázek 21: Fotografie HPTLC destičky s vyvinutým chromatogramem po inkubaci plazmy s roztoky, které se osvědčily při přeměnách standardu homocysteinu, homocystein a homocystein thiolakton jsou standardy s koncentrací $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$ – v červeném rámečku je označena úspěšná přeměna homocysteinu na thiolakton

1 - 12 – čísla vialek s odpipetovanými plazmy obohacenými Hcy, 6 M HCl, 100 pM DTPA a 1 mM DTT a 1 mM 2 – merkaptoethanol (Tab. XI v experimentální části)

Další pokus už jsem prováděla s plazmou s nižší koncentrací homocysteinu – 100 a 150 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, aby opět nedošlo k vytvoření gelu. Navíc jsem místo DTT použila EDTA v milimolární koncentraci, abych zjistila, zda je při použití v plazmě lepší, když už ji autoři patentu používali. U pokusů s EDTA byla konverze na thiolakton větší, než při použití DTT, jak je vidět na Obr. 22. Proto je vhodnější při práci s plazmou používat EDTA místo DTT.

Největší přeměna byla ve vialkách č. 1, 4 a 6 – koncentrace plazmy s Hcy a objemy činidel jsou uvedeny v Tab. XII v experimentální části.



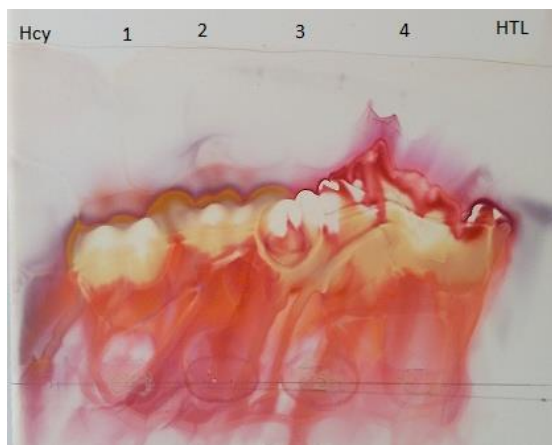
Obrázek 22: Fotografie HPTLC destičky s vyvinutým chromatogramem po inkubaci plazmy s reakční směsí, v níž byl v některých případech DTT zaměněn za EDTA, homocystein a homocystein thiolakton jsou standardy s koncentrací $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$) – v červeném rámečku je opět označena úspěšná přeměna homocysteinu na thiolakton

1 - 6 – čísla vialek obsahujících plazmu obohacenou Hcy, 6 M HCl, 100 pM DTPA, 1 mM EDTA a 1 mM DTT (Tab. XII v experimentální části)

4.5 Syntéza homocystein thiolaktonu za účasti platiny jako katalyzátoru

Tato syntéza byla popsána už na počátku 30. let 20. století přímo objevitelem homocysteinu i jeho thiolaktonu – Vincentem du Vigneaudem. Já jsem ji musela trochu upravit, jelikož jsem neměla tolik standardu a také proto, že jsem pro své pokusy nepotřebovala čistý, vykrystalizovaný homocystein thiolakton hydrochlorid, jehož syntézu nalezený návod popisoval.

Pro moji potřebu byl tento postup nevyhovující z toho důvodu, že na chromatogramu nebylo vidět nic jiného, než barevné rozmyté skvrny. Nebyl tam vidět ani standard homocysteinu, který jsem se chtěla pokusit převést na jeho thiolakton, ani případný thiolakton, pokud touto cestou vznikl.



Obrázek 23: Fotografie HPTLC destičky s vyvinutým chromatogramem, ke zviditelnění aminokyselin byl použit ninhydrin, homocystein a homocystein thiolakton jsou standardy rozpuštěné v 1 ml destilované vody

1 - 4 – čísla vialek obsahujících Hcy, 6 M HCl, cín a katalyzátory obsahující platinu (Tab. XIII v experimentální části)

Díky rozmytým skvrnám nešel chromatogram vyhodnotit (Obr. 23). Toto rozmytí mohlo být způsobeno tím, že byl v reakční směsi příliš velký obsah platiny, nebo tím, že jsem homocystein rozpouštěla ve 100 μl 6 M HCl, což je na tenkou vrstvu moc velký objem kyseliny, vzhledem k tomu, že se na ní nepatrně rozmývaly i vzorky obsahující 5 μl této kyseliny naředěné vodou. Rozmytí způsobené touto kyselinou už bylo dobře viditelné při objemu 10 μl 6 M HCl.

4.6 Vyhodnocování a interpretace infračervených spekter v NIR

4.6.1 Spektra standardů

V oblasti NIR jsem proměřovala spektra standardů homocysteinu, homocystein thiolaktonu, cysteinu a methioninu. Všechny standardy jsem rozpustila v destilované vodě a ředěním jsem připravila kalibrační řady, které jsem následně proměřila. Všechna spektra vypadala stejně při různých koncentracích, i když šlo o rozdílné látky. To bylo zapříčiněno

vodou, která v této oblasti absorbuje a vzhledem k tomu, že koncentrace roztoků aminokyselin byly v rozsahu $\mu\text{mol.l}^{-1}$ – mmol.l^{-1} , byla navíc v nadbytku.

Z tohoto důvodu jsem od sebe odečetla spektra standardů o koncentracích rozpuštěné látky 1 mmol.l^{-1} a vody (viz spektra 14 - 17), abych zjistila, jak vypadají spektra čistých látek v NIR. Tato spektra už jsem označila vlnočty pomocí tlačítka Find peaks a vyhodnotila jsem je.

Signály aminokyselin jsou ovšem velmi slabé a změna absorbance je malá. Navíc po odečtení nejsou vlnočty u příslušných absorpčních pásů podobné, jak jde vidět ve spektru 18, kde jsou dvě odečtená spektra homocystein thiolaktonu v plazmě o různých koncentracích a vlnočty jsou odlišné – vzhledem k tomu, že jde o jednu látku, bych očekávala, že budou rozdíly mezi vlnočty malé a že si spektra budou podobná. To je pravděpodobně zapříčiněno tím, že je IČ na tak malé koncentrace málo citlivá metoda.

Ve spektrech se nedaly určit ani vlnočty jednotlivých absorpčních pásů, jelikož vůbec neodpovídaly vlnočtům příslušných skupin uvedených v tabulkách spekter. Příčinou tohoto je pravděpodobně nedostatečná citlivost IČ spektrometru.

4.6.2 Spektra plazmy

V NIR jsem proměřovala spektra 2 vzorků plazmy s přídavkem homocystein thiolaktonu, které jsem připravila naředěním zásobního roztoku plazmy o koncentraci thiolaktonu $500 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Ten jsem tam přidávala proto, abych jej mohla v plazmě kvantifikovat po jeho syntéze z homocysteinu, který je v lidské plazmě obsažen.

Spektra jednotlivých vzorků jsem získala jejich odečtením od vody, porovnávala jsem je nejen mezi sebou navzájem, ale také se spektrem standardu homocystein thiolaktonu (viz spektrum 18 v příloze). Jak je ve spektru vidět, jde opět hlavně o spektrum vody.

4.7 Kvantifikace homocystein thiolaktonu v programu TQ Analyst

Kvantifikace pomocí infračervené spektroskopie v programu TQ Analyst není možná, jak je vidět z tabulek (Tab. XV a XVI). Program vypočítal několikanásobně vyšší koncentrace homocystein thiolaktonu jak ve vzorcích standardu rozpuštěného ve vodě, tak v naředěných vzorcích plazmy.

Tabulka XV: Roztoky homocystein thiolaktonu proměřené v NIR a kvantifikované programem TQ Analyst

Vzorek	Koncentrace [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Koncentrace dle TQ Analystu [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]
1	80	367,01
2	300	1082,64

Tabulka XVI: Vzorky plazmy obohacené o homocystein thiolaktonproměřené v NIR a kvantifikované programem TQ Analyst

Plazma	Koncentrace [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]	Koncentrace dle TQ Analystu [$\mu\text{mol.l}^{-1}$]
1	60	3300,05
2	100	4795,11

Z tabulky je patrné, že tato technika je pro měření a následnou kvantifikaci vzorků o takto nízkých koncentracích nevhodná. Jednak na tyto koncentrace není dostatečně citlivá, jednak při měření vadí to, že jak voda, tak plazma v oblasti NIR silně absorbují IČ záření, tudíž jsou výsledná spektra spíše spektra vody a ne spektra vzorků, což je patrné i na naměřených spektrech standardů i plazmy. Spektra se od sebe příliš neliší i přes to, že vzorky standardů i plazmy mají různé koncentrace.

5. Závěr

Infračervená spektroskopie není vhodná metoda pro stanovení homocysteinu v lidské plazmě z několika důvodů, jak jsem zjistila z měření a pokusů, které jsem v rámci své diplomové práce provedla.

Jedním z těchto důvodů je její nízká citlivost. Homocystein je v plazmě obsažen v mikromolární koncentraci a homocystein thiolakton dokonce v pikomolární koncentraci. Samotný plazmatický homocystein v IČ není vidět vůbec, homocystein thiolakton v ní sice lze vidět, ve střední oblasti jej lze prokázat díky vlnočtu s hodnotou kolem 1995 cm^{-1} , ale k tomu by jeho koncentrace musela být v rozmezí $50 - 75\text{ mmol.l}^{-1}$ – tedy o 3 řády větší, než je koncentrace homocysteinu v plazmě.

Dalším problémem je převedení homocysteinu na homocystein thiolakton a také jeho následná kvantifikace v blízké infračervené oblasti. Ačkoliv jsem se snažila o co největší přeměnu homocysteinu na jeho thiolakton, nikdy jsem neměla 100 % konverzi. Na tenké vrstvě se sice nedala provést kvantifikace, ale dle mého názoru proběhla přeměna homocysteinu na thiolakton asi z 50 %.

Problematická byla také kvantifikace v NIR vzhledem k tomu, že voda, která je základem plazmy, v této oblasti silně absorbuje. I po jejím odečtení od výsledného spektra byly signály aminokyselin velmi slabé.

Při stanovení v NIR vadilo také žluté zbarvení plazmy, které stanovení rušilo.

6. Literatura

1. Taraba B.: *Struktura pevných látek*. Ostravská univerzita v Ostravě, Ostrava 2008.
2. Novotná R, Šilha T., Trávníček Z.: *Spektrální metody studia chemických látek*. Přírodovědecká fakulta Univerzity Palackého v Olomouci, Olomouc 2011.
3. Muselík J.: Chem. Listy 106, 10 (2012).
4. [http://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infračervená +spektrometrie.pdf](http://www.vscht.cz/files/uzel/0005766/Infračervená%20spektrometrie.pdf), přečteno dne 18. 11. 2015 ve 21:53.
5. <http://old.vscht.cz/anl/lach2/NIR.pdf>, přečteno dne 21. 11. 2015 v 19:25.
6. Radotínský D, Vopička O., Hynek V., Izák P., Friess K.: Chem. Listy 109, 619 (2015).
7. Machovič V., Novák F.: Chem. Listy 92, 151 (1998).
8. Dorling K. M., Baker M. J.: Trends Biotechnol. 31, 327 (2013).
9. Glassford S. E., Byrne B., Kazarian S. G.: BBA Proteins and Proteomics 1834, 2849 (2013).
10. Jandera P.: *Atomová a molekulová spektroskopie se zaměřením na stopovou analýzu kontaminantů*. Vyd. 3. Pardubice: Univerzita Pardubice 2011. ISBN 978-80-7395-392-8.
11. Stuart B.: *Infrared spectroscopy: fundamentals and applications*. Hoboken, NJ: J. Wiley 2004. Analytical techniques in the sciences. ISBN 0-470-85427-8 (0-470-85428-6).
12. Wartewig S. *IR and Raman spectroscopy: fundamental processing*. Weinheim: Wiley-VCH 2003. Analytical techniques in the sciences. ISBN 3-527-30245-X.
13. Griffiths P. R., De Haseth J. A.: *Fourier transform infrared spectrometry*. 2nd ed. Hoboken, N.J.: Wiley-interscience 2007. Chemical analysis. ISBN 978-0-471-19404-0.
14. http://www.nicoletcz.cz/userfiles/file/Aplikace/TN50674_E%200215M_FT-IR%20Advantages.pdf, přečteno dne 11. 1. 2016 ve 20:34
15. <http://mmrc.caltech.edu/FTIR/FTIRintro.pdf>, přečteno dne 21. 2. 2016 v 19:41

16. <http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/ftir.pdf>, přečteno dne 10. 2. 2016 v 16:39
17. <http://www.nicoletcz.cz/userfiles/file/Aplikace/D21089.pdf>, přečteno dne 10. 2. 2016 v 16:48
18. http://www.nicoletcz.cz/plynove_cely/, přečteno dne 10. 2. 2016 v 17:12
19. Zima, T.: *Laboratorní diagnostika*. 1. vyd. Praha: Galén 2002. ISBN 80-726-2201-3.
20. Ueland P. M., Refsum H., Stabler S. P., Malinow M. R., Andersson A., Allen R. H.: *Clin. Chem.* 39, 1764 (1993).
21. Přistoupil T. I., Přistoupilová K.: *Vesmír* 81, 624 (2002).
22. Přistoupilová K., Přistoupil T. I., M.: *Chem. Listy* 93, 365 (1999).
23. Erben K.: *Vesmír* 83, 433 (2004).
24. Hyánek J., Dubská L., Pejznochová H., Pehal F., Vaingátová S., Martiníková V.: *Klin. Biochem. Metab.* 17 (38), 83 (2009).
25. Nygard O., Vollset S. E., Refsum H., Brattstrom L., Ueland P. M.: *Journal of Internal Medicine* 246, 425 (1999).
26. Medina M. Á., Urdiales J. L., Amores-Sánchez M. I.: *Eur. J. Biochem.* 268, 3871 (2001).
27. Finkelstein J. D.: *European Journal of Pediatrics* 157, S40 (1998).
28. Vlachová I.: *Klin. Farmakol. Farm.* 18, 26 (2004).
29. Schneiderka P.: *Klin. Biochem. Metab.* 16 (37), 228 (2008).
30. Koucký M.: *Prakt. lékařn.* 7, 166 (2011).
31. Pokorný M.: *New EU Magazine of Medicine* 1–4, 46 (2015).
32. Herrmann W., Schorr H., Obeid R., Makowski J., Fowler B., Kuhlmann M. K.: *Clin. Chem.* 51, 891 (2005).
33. Jacobsen D. W.: *Clin. Chem.* 44, 1833 (1998).

34. Haarbarger D., Renison R., Meldau S., Eastman R., Watt G. V. D.: *Clin. Chem.* 59, 1160 (2013).
35. Refsum H., Grindflek A. W., Ueland P. M., Fredriksen Å., Meyer K., Ulvik A., Guttormsen A. B., Iversen O. E., Schneede J., Kase B. F.: *Clin. Chem.* 50, 1769 (2004).
36. Jakubowski H., Goldman E.: *FEBS Letters* 317, 237 (1993).
37. Jakubowski H.: *J. Biol. Chem.* 272, 1935 (1997).
38. Uji Y., Motomiya Y., Hanyu N., Ukaji F., Okabe H.: *Clin. Chem.* 48, 941 (2002).
39. Zinellu A., Zinellu E., Sotgia S., Formato M., Cherchi G. M., Deiana L., Carru C.: *Clin. Chem.* 52, 2054 (2006).
40. Racek, J.: *Klinická biochemie*. 2., přeprac. vyd. Praha: Galén, 2006. ISBN 80-726-2324-9.
41. Dubská L., Hyánek J.: *Klin. Biochem. Metab.* 17 (38), 93 (2009).
42. Refsum H., Smith A. D., Ueland P. M., Nexø E., Clarke R., McPartlin J., Johnston C., Engbaek F., Schneede J., McPartlin C., Scott J. M.: *Clin. Chem.* 50, 3 (2004).
43. Blandini F., Fancellu R., Martignoni E., Mangiagalli A., Pacchetti C., Samuele A., Nappi G.: *Clin. Chem.* 47, 1102 (2001).
44. Fiskerstrand T., Refsum H., Kvalheim G., Ueland, P. M.: *Clin. Chem.* 39, 263 (1993).
45. Jessen T. E., Höskuldsson A. T., Bjerrum P. J., Verder H., Sørensen L., Bratholm P. S., Christensen B., Jensen L. S., Jensen M. A.: *Clin. Biochem.* 47, 1306 (2014).
46. Lai Y. J., Tseng W. L.: *Talanta* 91, 103 (2012).
47. Bramanti E., Vecoli C., Neglia D., Pellegrini M. P., Raspi G., Barsacchi R.: *Clin. Chem.* 51, 1007 (2005).
48. Zhang D., Zhang M., Liu Z., Yu M., Li F., Yi T., Huang Ch.: *Tetrahedron Lett.* 47, 7093 (2006).
49. Jiang Z., Liu Y., Hu X., Li Y.: *Anal. Methods* 6, 5647 (2014).
50. Ubbink J. B., Delport R., Riezler R., Vermaak W. J. H.: *Clin. Chem.* 45, 670 (1999).

51. Chwatko G., Jakubowski H.: Clin. Chem. 51, 408 (2005).
52. Martin S. C., Tsakas-Ampatzis I., Bartlett W. A., Jones A. F.: Clin. Chem. 45, 150 (1999).
53. Melnyk S., Pogribna M., Pogribny I. P., Yi P., James S. J.: Clinical Chemistry 46, 265 (2000).
54. Turgeon C. T., Magera M. J., Cuthbert C. D., Loken P. R., Gavrilov D. K., Tortorelli S., Raymond K. M., Oglesbee D., Rinaldo P., Matern D.: Clin. Chem. 56, 1686 (2010).
55. Arora B., Narayanasamy A., Nirmal J., Halder N., Patnaik S., Ravi A. K., Velpandian T.: J. Chromatogr. B 944, 49 (2014).
56. Švábiková L.: *Porovnání stanovení homocysteinu dvěma enzymatickými metodami na biochemickém analyzátoru AU 680*. Bakalářská práce, Ostravská univerzita v Ostravě, Ostrava 2014
57. Windelberg A., Årseth O., Kvalheim G., Ueland P. M.: Clin. Chem. 51, 2103 (2005).
58. Caussé E., Siri N., Bellet H., Champagne S., Bayle Ch., Valdiguié P., Salvayre R., Couderc F.: Clin. Chem. 45, 412 (1999).
59. Zhang J. Z., Chen D. Y., Wu S., Harke H. R., Dovichi N. J.: Clin. Chem. 37, 1492 (1991).
60. Zhang L. Y., Tu F. Q., Guo X. F., Wang H., Wang P., Zhang H. S.: Electrophoresis 35, 2951 (2014).
61. Kang S. H., Wei W., Yeung E. S.: J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl. 744, 149 (2000).
62. Tan Y., Tang L., Sun X., Zhang N., Han Q., Xu M., Baranov E., Tan X., Tan X., Rashidi B., An Z., Perry A. W., Hoffman R. M.: Clin. Chem. 46, 1686 (2000).
63. Dou Ch., Xia D., Zhang L., Chen X., Flores P., Datta A., Yuan Ch.: Clin. Chem. 51, 1987 (2005).
64. Frantzen F., Faaren A. L., Alfheim I., Nordhei A. K.: Clin. Chem. 44, 311 (1998).
65. Bartoš V., Šafarčík K., Karlíková M., Lochmanová A., Zeman D., Švagera Z., Vrzalová J.: *Imunoanalytické metody*. 1. vyd. Ostrava: Ostravská univerzita v Ostravě, 2013. CZ.1.07/2.2.00/15.0046

66. Bright A., Renuga Devi T. S., Gunasekaran S.: *Asian J. Chem.* 22, 5107 (2010).
67. Materiály pro stanovení homocysteinu Laboratoře dědičných metabolických poruch FNOL z roku 2016.
68. <https://www.google.com/patents/US6589751>, přečteno dne 12. 4. 2016 v 18:43
69. Riegel B., du Vigneaud V.: *J. Biol. Chem.* 112, 149 (1935)

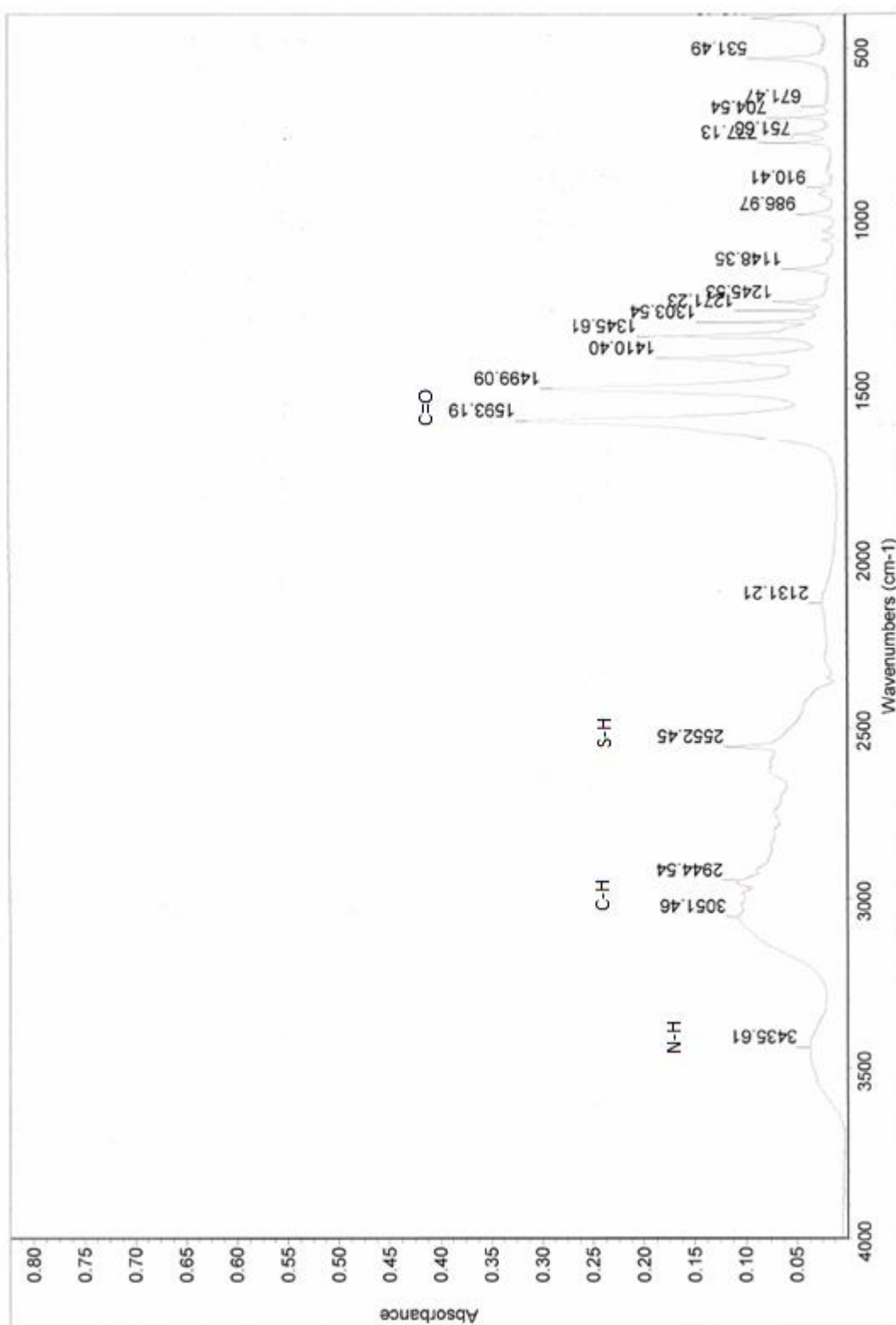
7. Seznam použitých zkratk

ABD-F	4-aminosulfonyl-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazol
AMP	Adenosinmonofosfát
ATP	Adenosintrifosfát
ATR	Metoda zeslabené úplné reflexe
CBS	Cystathionin- β -synthasa (EC 4.2.1.22)
CE	Kapilární elektroforéza
CE-LIF	Kapilární elektroforéza s laserově indukovanou fluorescencí
CLIA	Chemiluminiscenční imunoanalýza
Cys	Cystein
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DP	D-penicilamin
DRIFT, DRIFTS	Metoda difúzní reflexe
DTPA	Diethylentriaminpentaoctová kyselina
DTT	Dithiothreitol
ED	Elektrochemická detekce
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EIA	Enzymová imunoanalýza
FIR	Vzdálená infračervená oblast
FPIA	Imunoanalýza s polarizovanou fluorescencí
FT-IR	Infračervený spektrometr s Fourierovou transformací
GC	Plynová chromatografie
GNMT	Glycin-N-methyltransferasa (EC 2.1.1.20)
Hcy	Homocystein

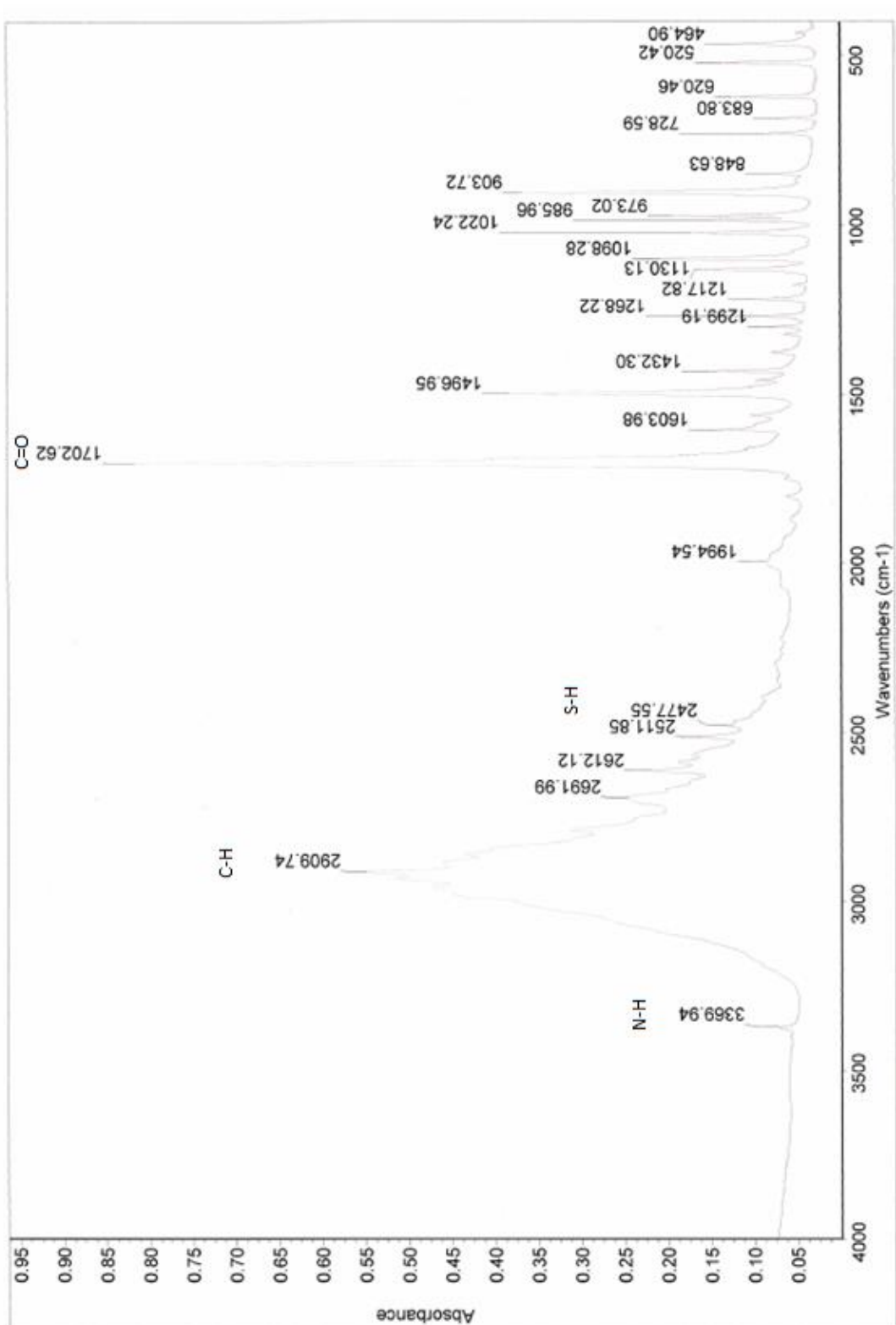
HILIC	Hydrofilní interakční chromatografie
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HPTLC	Vysokoúčinná tenkovrstvá chromatografie
HTL	Homocystein thiolakton
ICL	Chemiluminiscenční imunoanalýza
IČ	Infračervený (á)
KRS-5	Krystal z jodidu a bromidu thallného
LDL	Lipoprotein s nízkou hustotou
L-DOPA	L-dopamin
mBrB	Monobromobiman
Met	Methionin
MIR	Střední infračervená oblast
MS	Hmotnostní spektrometrie
MS	Methioninsynthasa (EC 2.1.1.13)
MTHFR	Methylentetrahydrofolátreduktasa (EC 1.5.1.20)
NIR	Blízká infračervená oblast
OPA	o-ftalaldehyd
PCA	Analýza hlavních komponent
PCR	Metoda regrese hlavních komponent
PLP	Pyridoxal-5'-fosfát
PLS	Metoda nejmenších čtverců
PP _i	Anorganický fosfát
RNA	Ribonukleová kyselina
SAH	S-adenosylhomocystein
SAM	S-adenosylmethionin
SBD-F	7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazol-4-sulfonát amonný

TCA	Trichloroctová kyselina
TCEP	tris-(2-karboxyethyl)-fosfin
TGS	Triglycinsulfátový pyroelektrický detektor
THF	Tetrahydrofolát
UV	Ultrafialový (á)

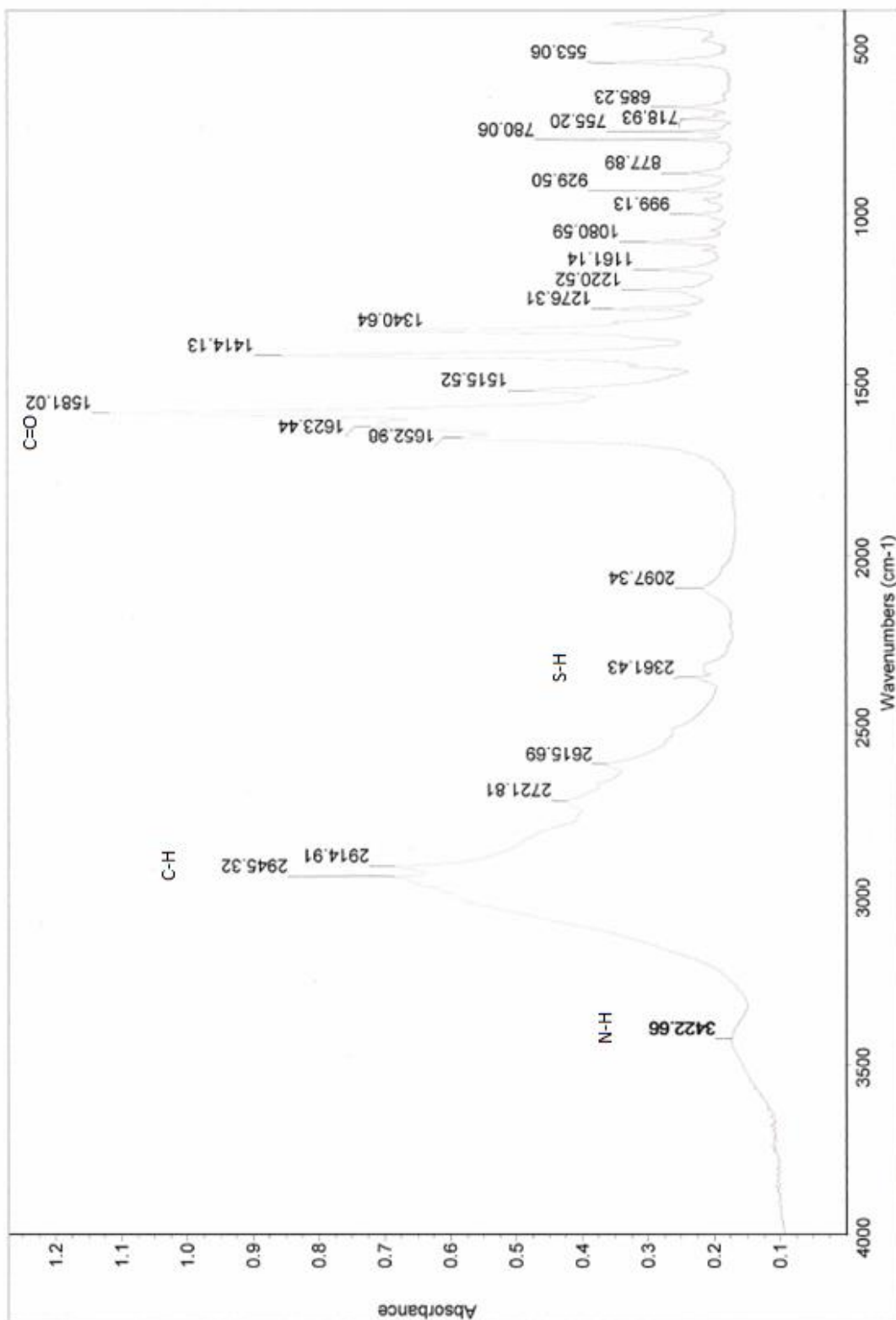
8. Přílohy



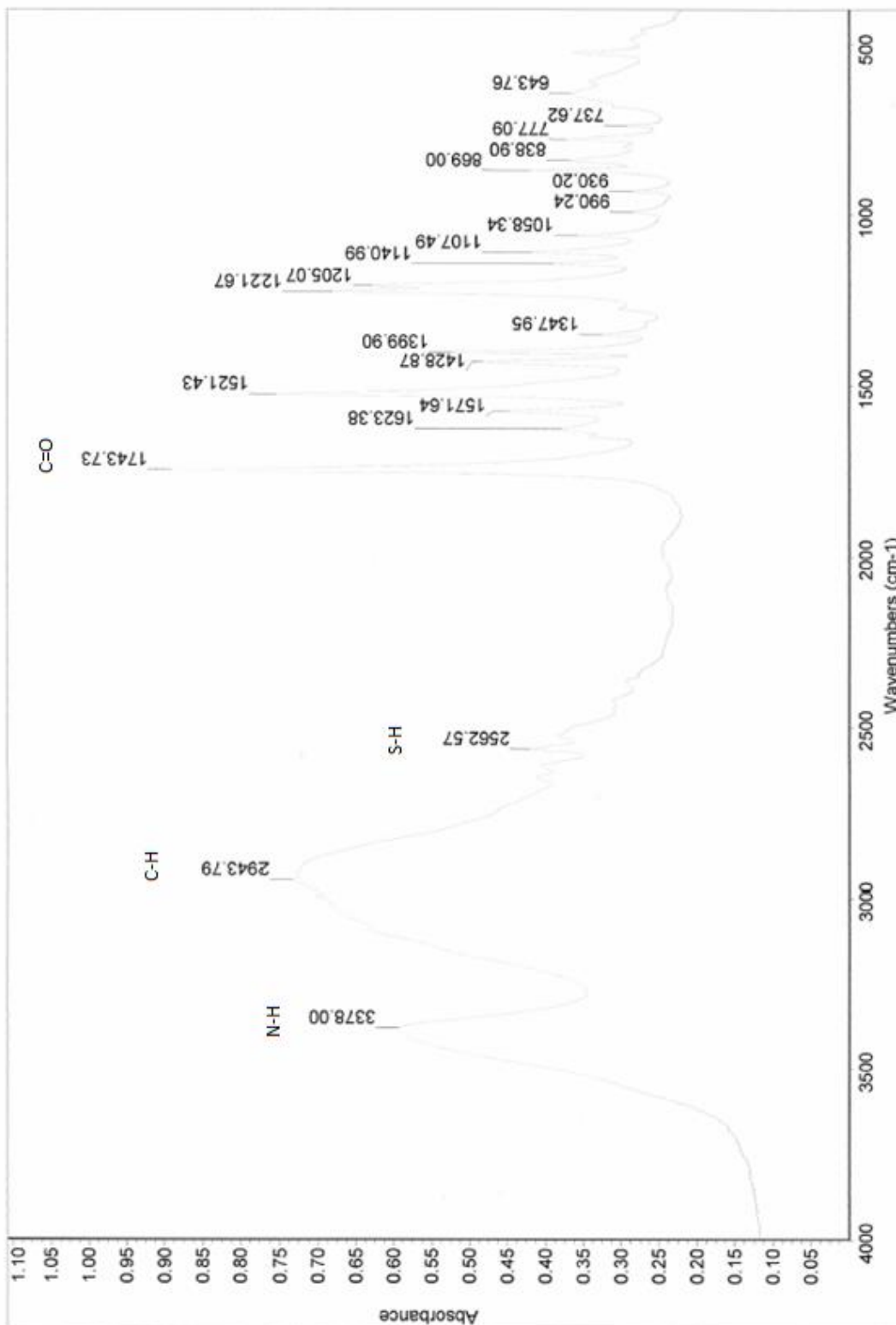
Spektrum 1: Homocystein, KBr tableta (autogain (2), optická rychlost 0,4747)



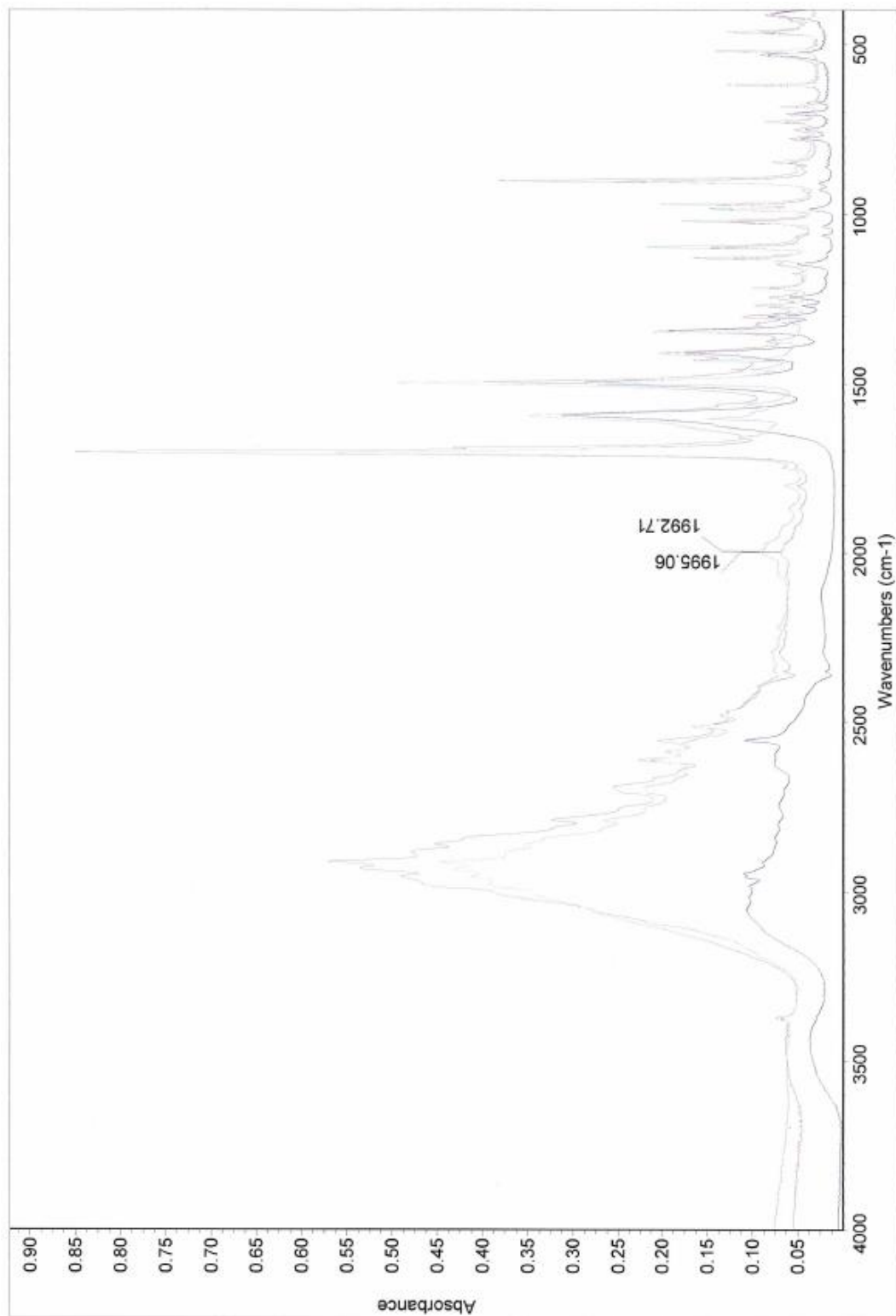
Spektrum 2: Homocystein thiolakton, KBr tableta (autogain (2), optická rychlost 0,4747)



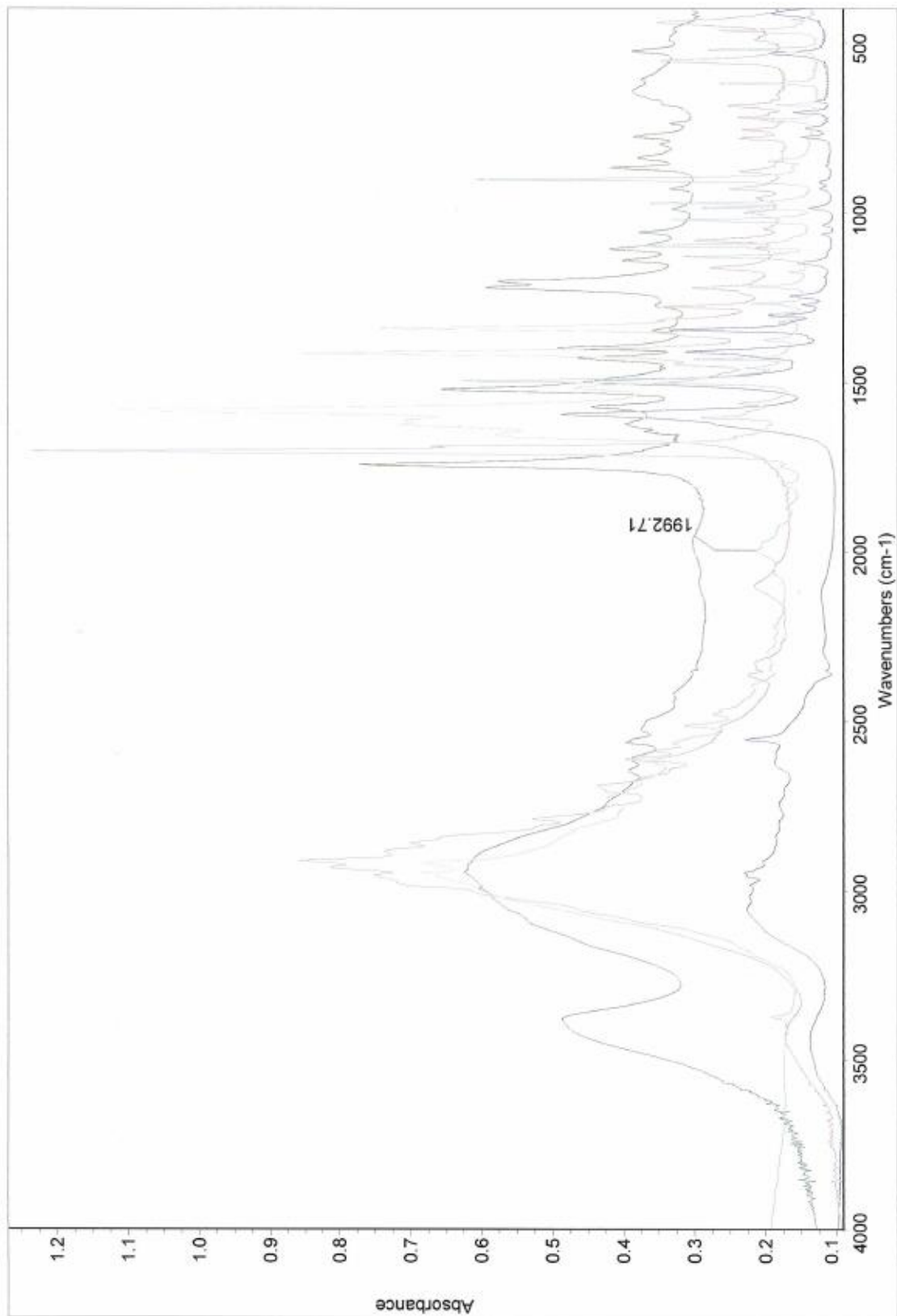
Spektrum 3: Methionin, KBr tableta (autogain (2), optická rychlost 0,4747)



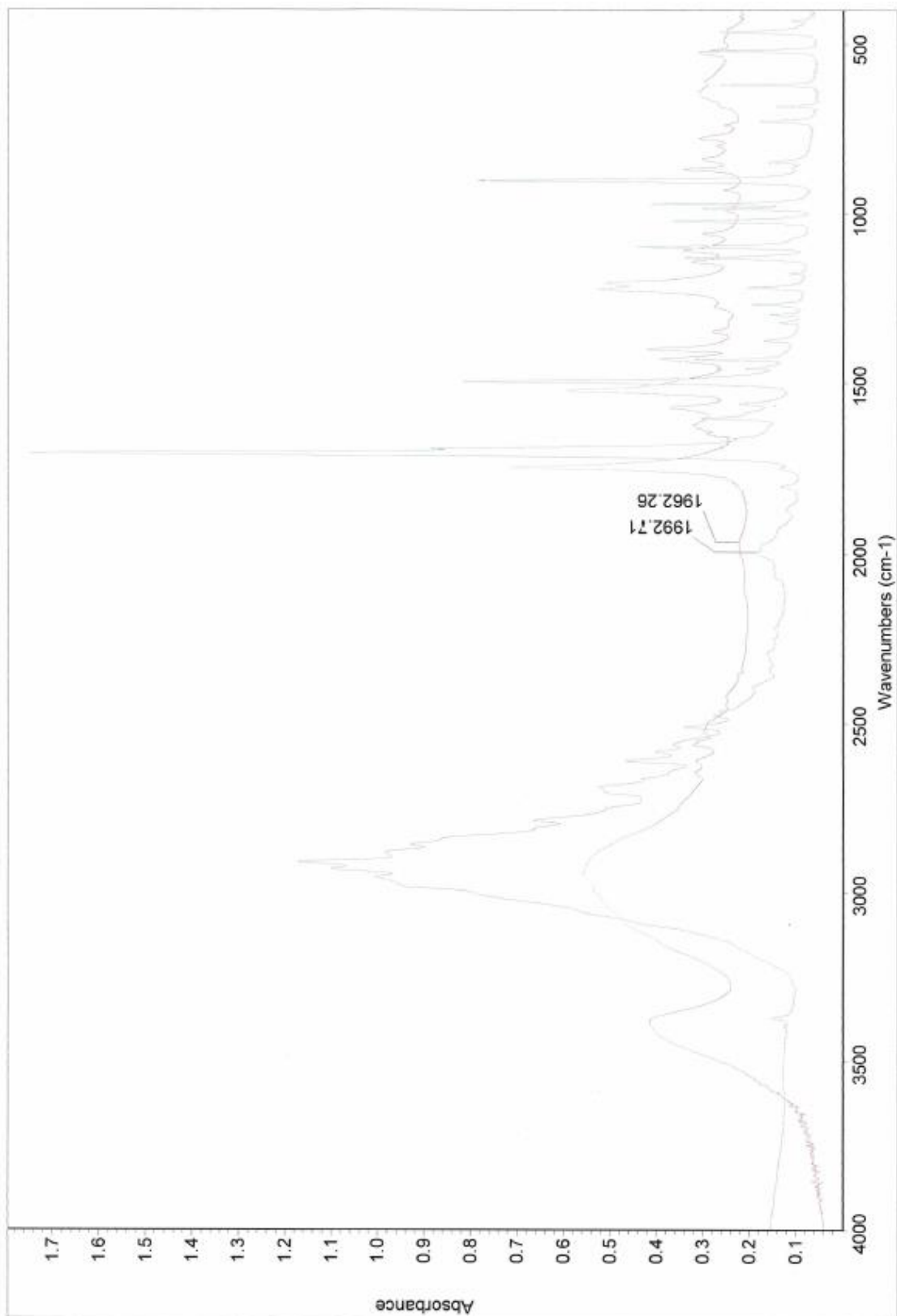
Spektrum 4: Cystein, KBr tableta (autogain (2), optická rychlost 0,4747)



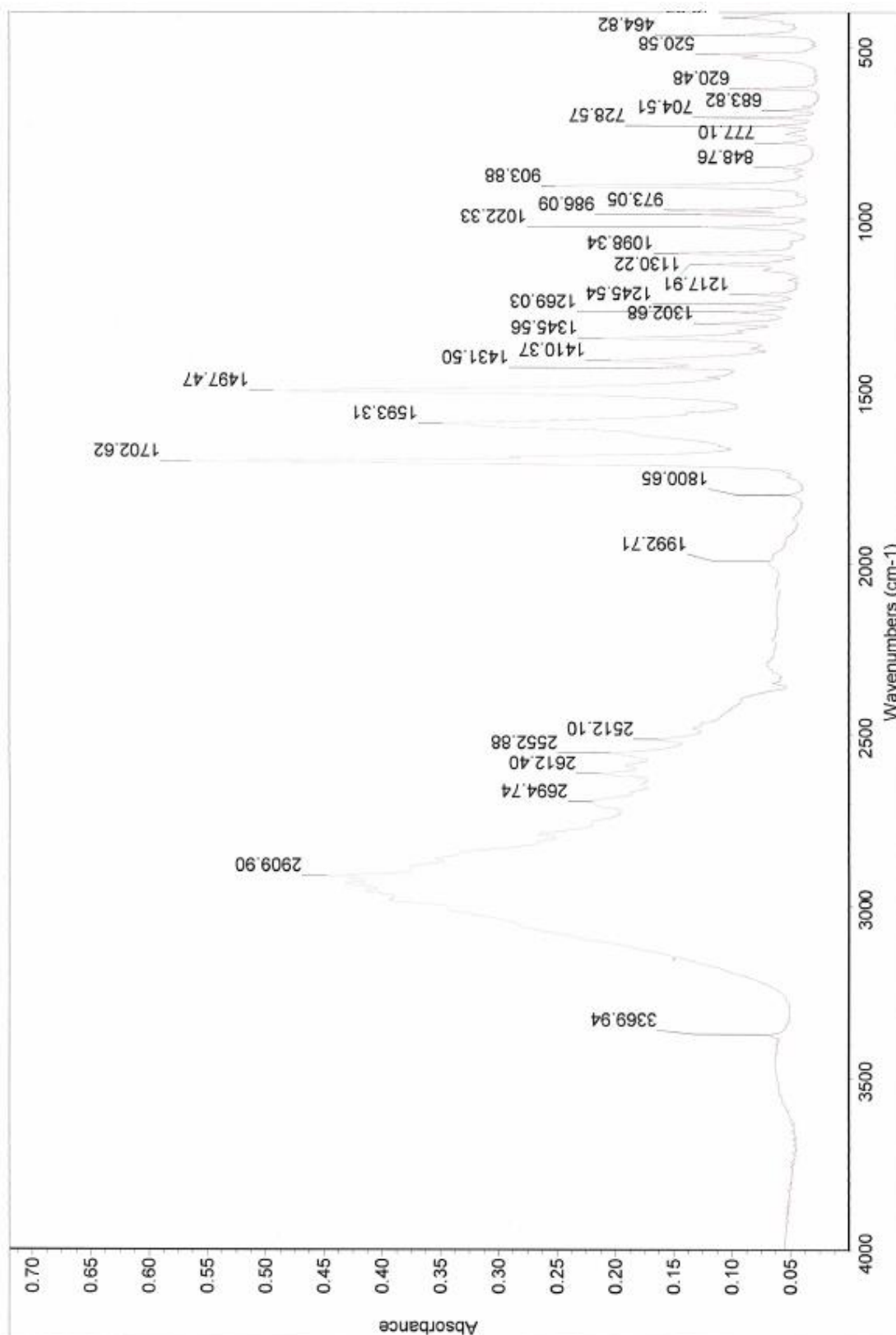
Spektrum 5: Porovnání směsné KBr tablety homocysteinu a homocystein thiolaktonu (červená křivka) se spektry homocysteinu (tmavě modrá křivka) a homocystein thiolaktonu (světle modrá křivka), vlnočty 1995,06 a 1992,71 cm^{-1} patří HTL



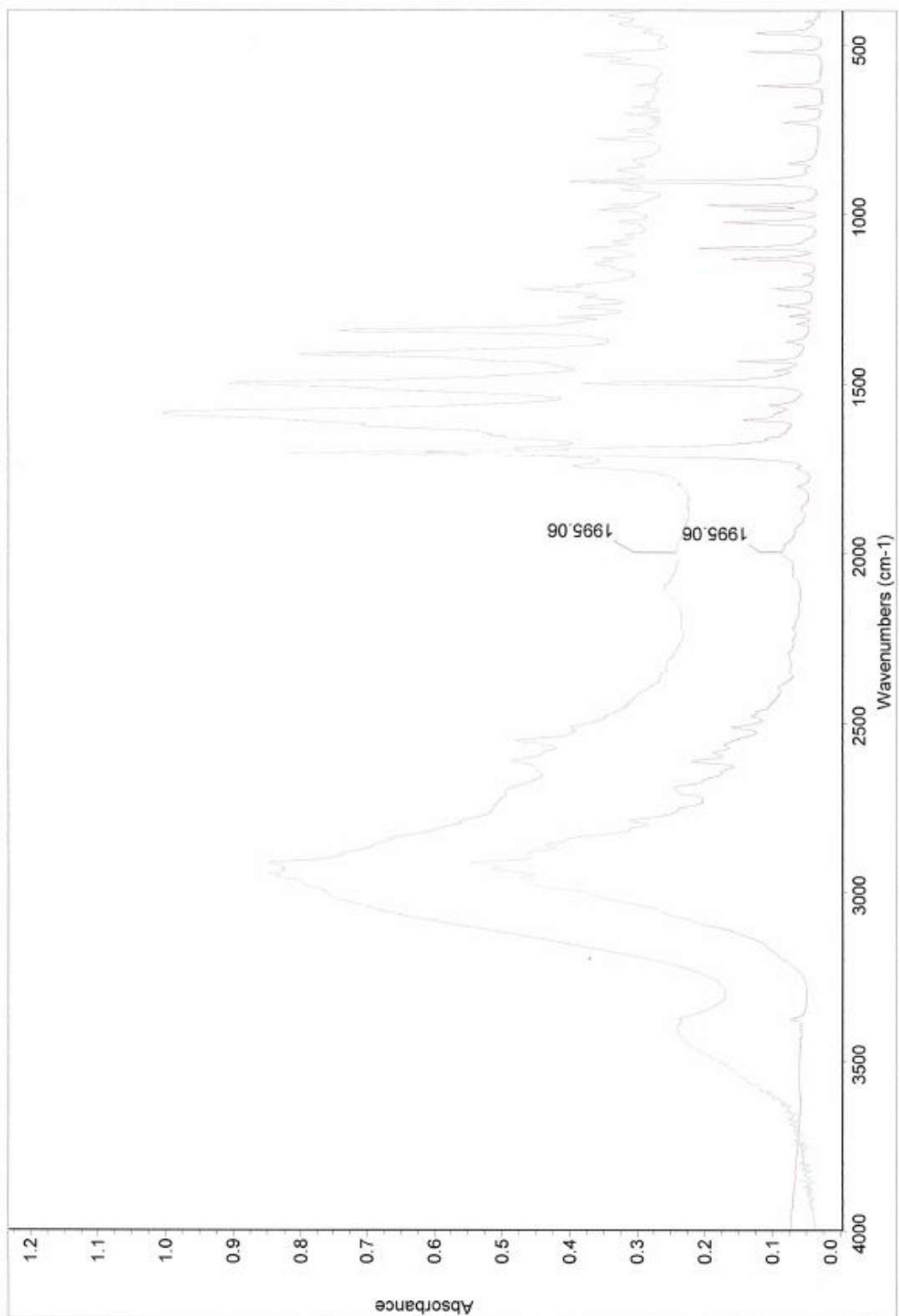
Spektrum 6: Porovnání všech standardů – methionin (červená křivka), homocystein (tmavě modrá křivka), homocystein thiolakton (světle modrá křivka) a cystein (zelená křivka), vlnočet 1992,71 cm^{-1} patří HTL



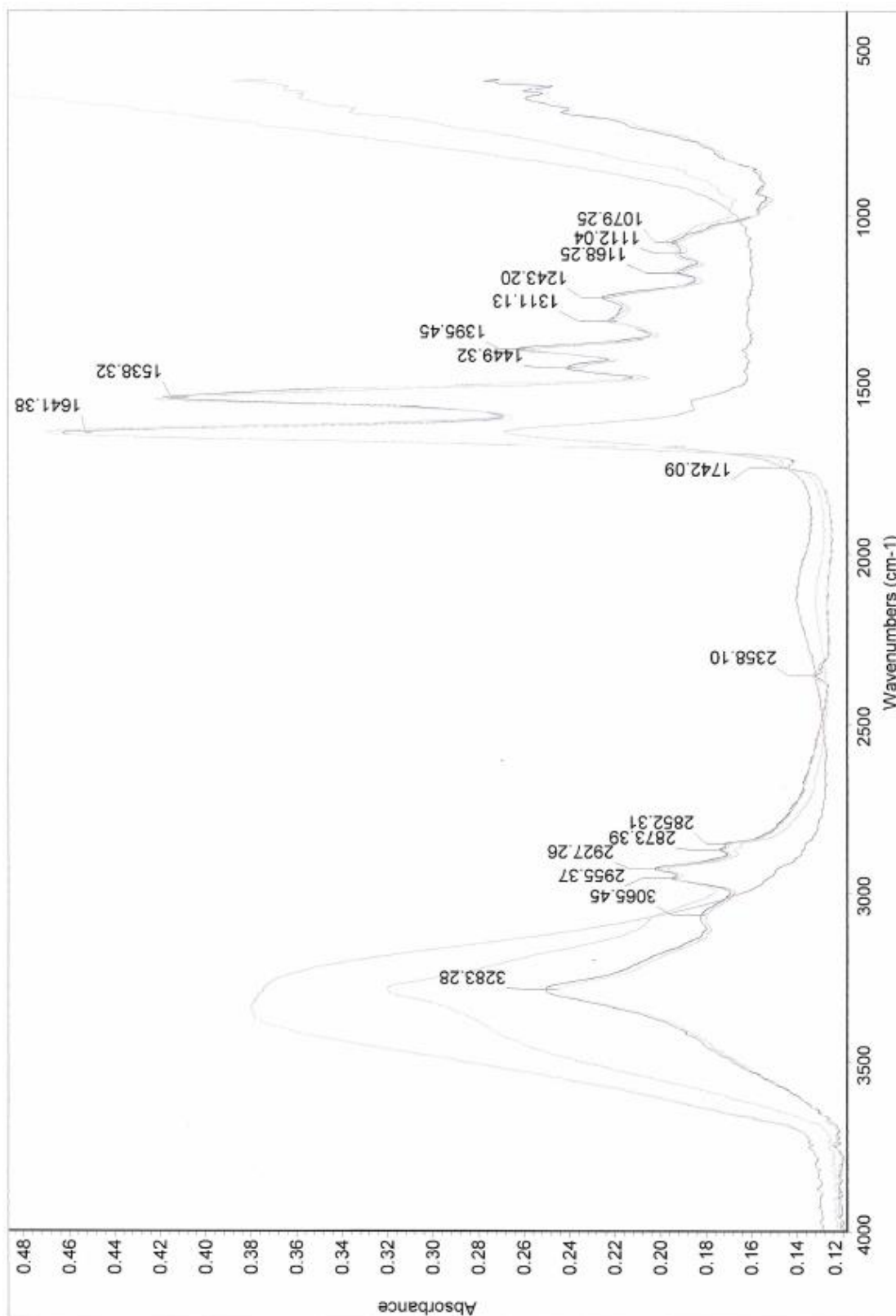
Spektrum 7: Porovnání standardů homocystein thiolaktonu (světle modrá křivka) a cysteinu (červená křivka), vlnočet 1992,71 cm^{-1} patří HTL, zatímco vlnočet 1962,26 cm^{-1} přísluší Cys



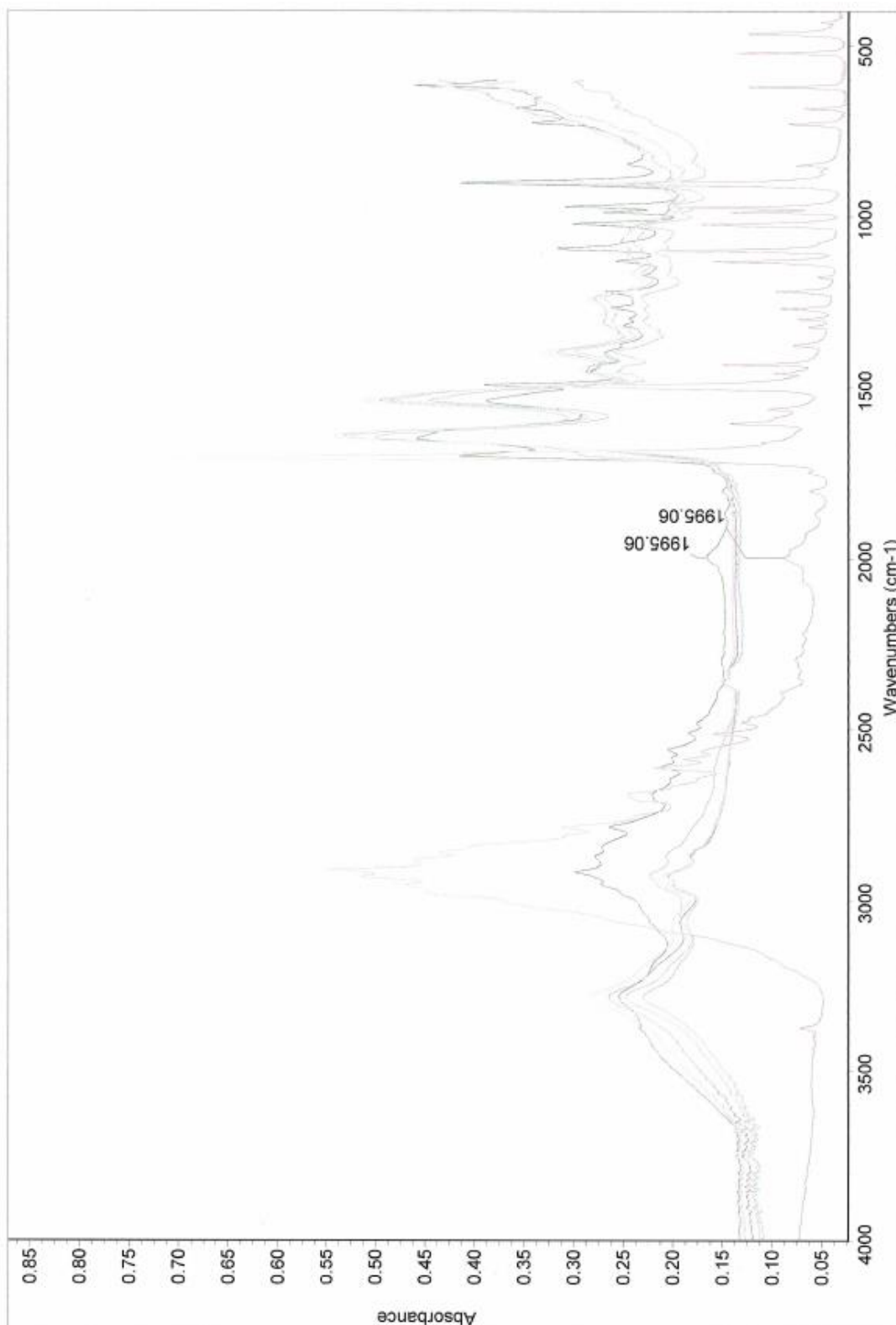
Spektrum 8: Směsná KBr tableta homocysteinu a homocystein thiolaktonu (autogain (2), optická rychlost 0,4747), vlnočet 1992,71 cm⁻¹ přísluší HTL



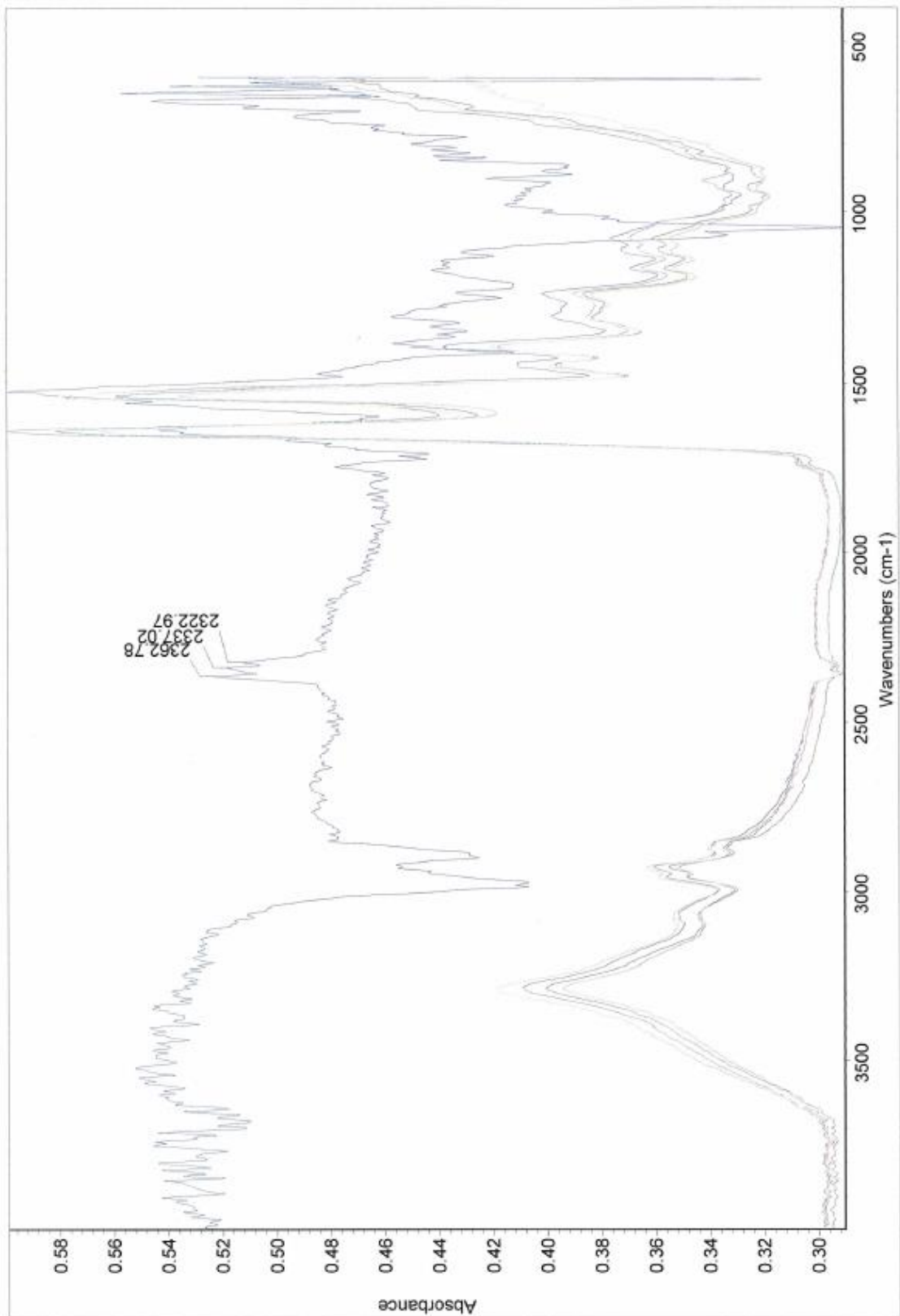
Spektrum 9: Srovnání směsné KBr tablety homocysteinu, homocystein thiolaktonu, methioninu a cysteinu (zelená křivka) se spektrem homocystein thiolaktonu (červená křivka), vlnočty 1995,06 cm⁻¹ přísluší HTL



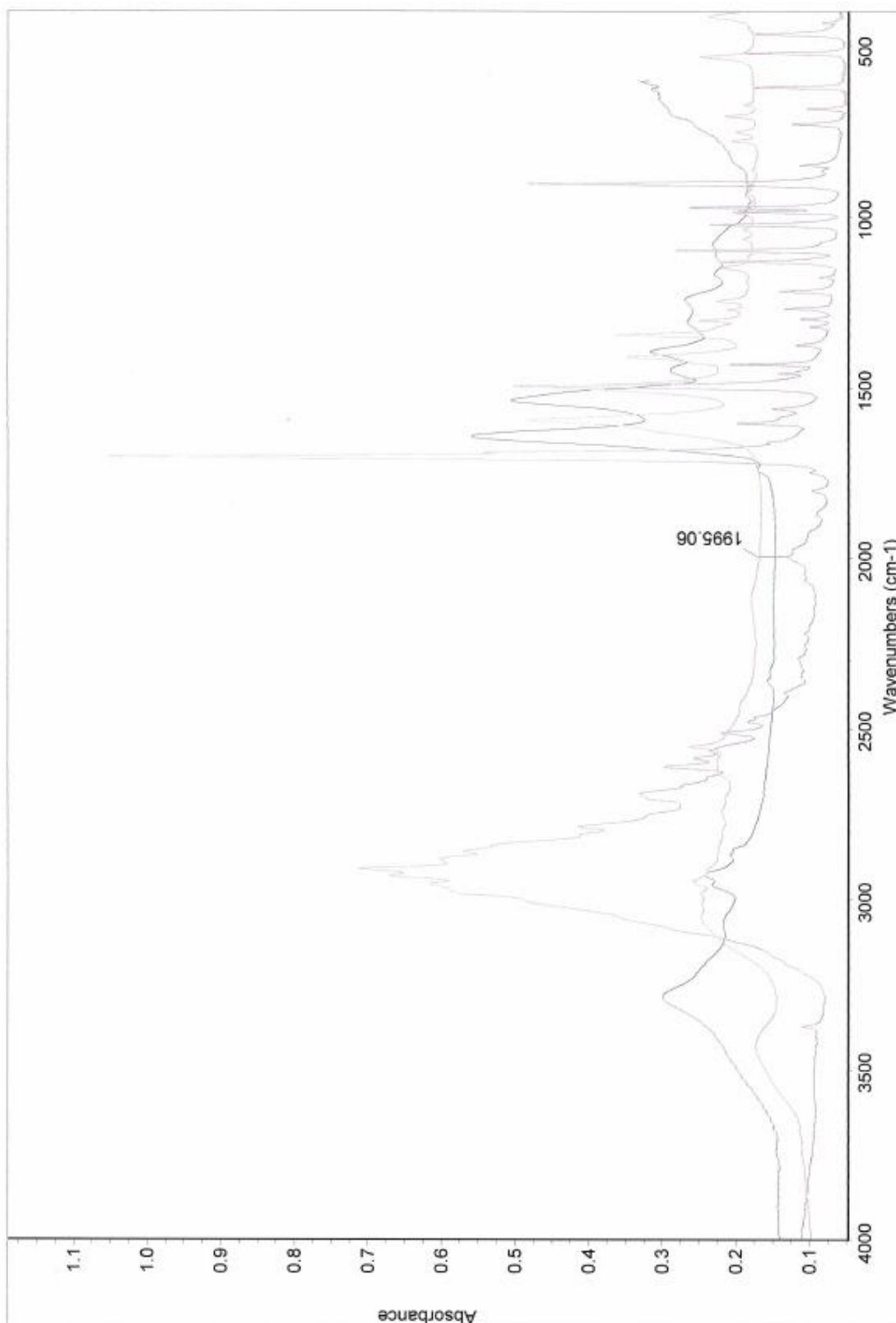
Spektrum 10: Sledování změny IČ spektra během zasychání plazmy na ATR krystalu – po nanesení (fialová křivka), po 10 minutách (zelená křivka), po 40 minutách (tmavě modrá křivka) a po 1 hodině (červená křivka) od nanesení



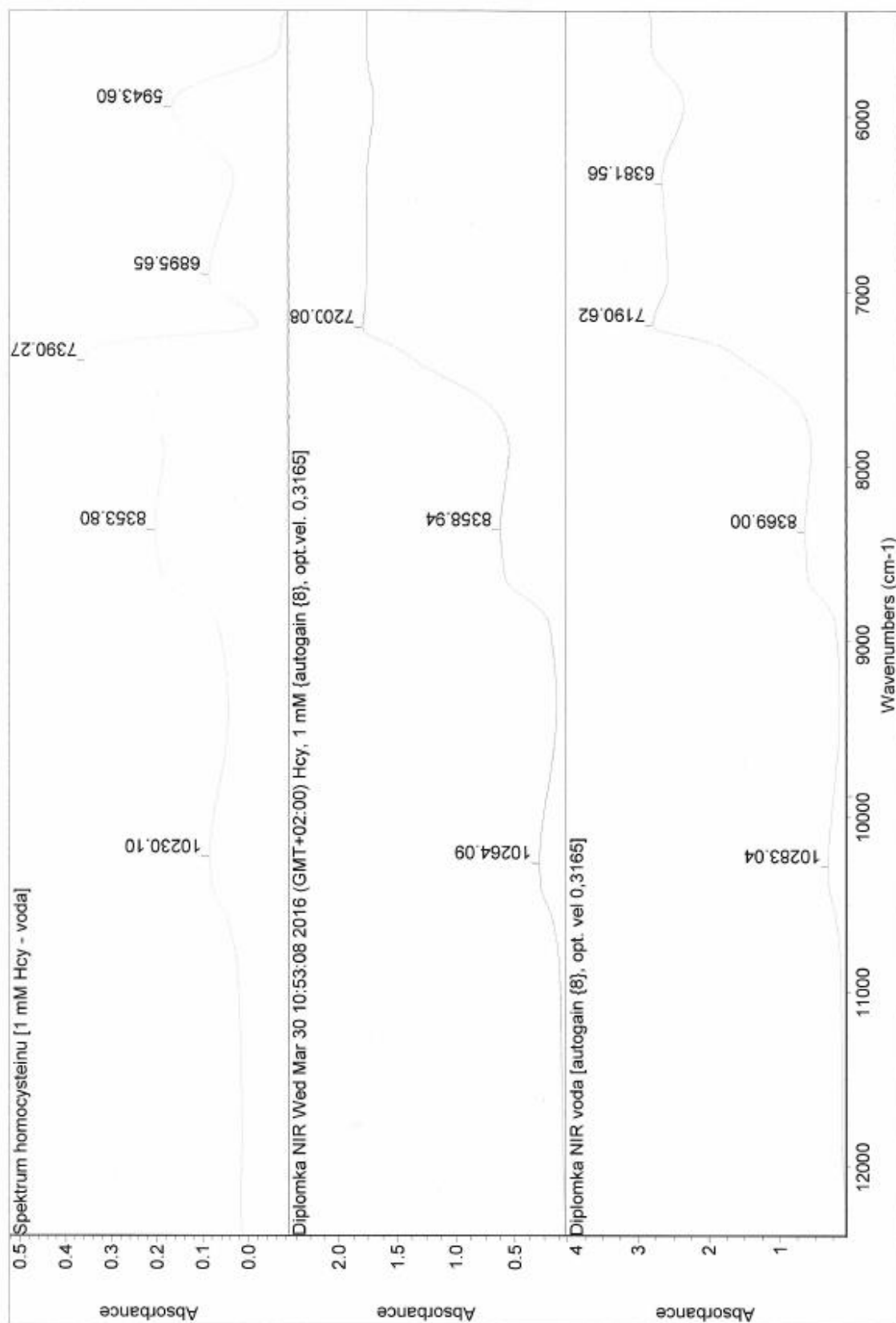
Spektrum 11: Porovnání spekter postupných přidavků homocystein thiolaktonu do plazmy (1. přidavek – růžová křivka, 2. přidavek – fialová křivka, 3. přidavek – světle zelená křivka, 4. přidavek – světle modrá křivka, 5. přidavek – tmavě zelená křivka) se spektrem standardu homocystein thiolaktonu (červená křivka), vlnočty 1995,06 cm^{-1} přísluší HTL



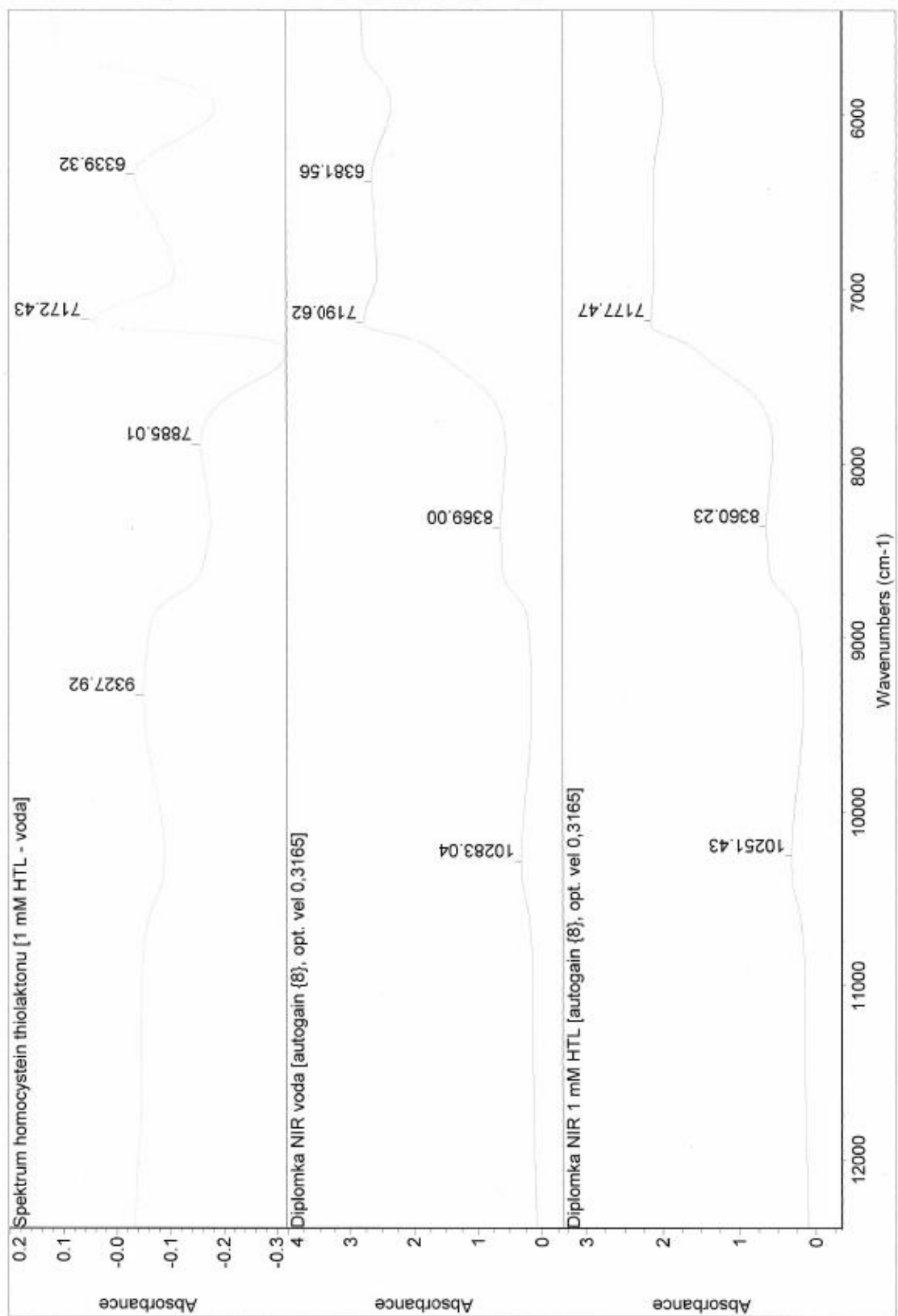
Spektrum 12: Příklad přidání homocystein thiolaktonu do plazmy – plazma s obsahem 100 μM HTL (tmavě zelená křivka), 500 μM HTL (červená křivka), 1 mM HTL (tmavě modrá křivka), 50 mM HTL (fialová křivka) a 75 mM HTL (světle modrá křivka)



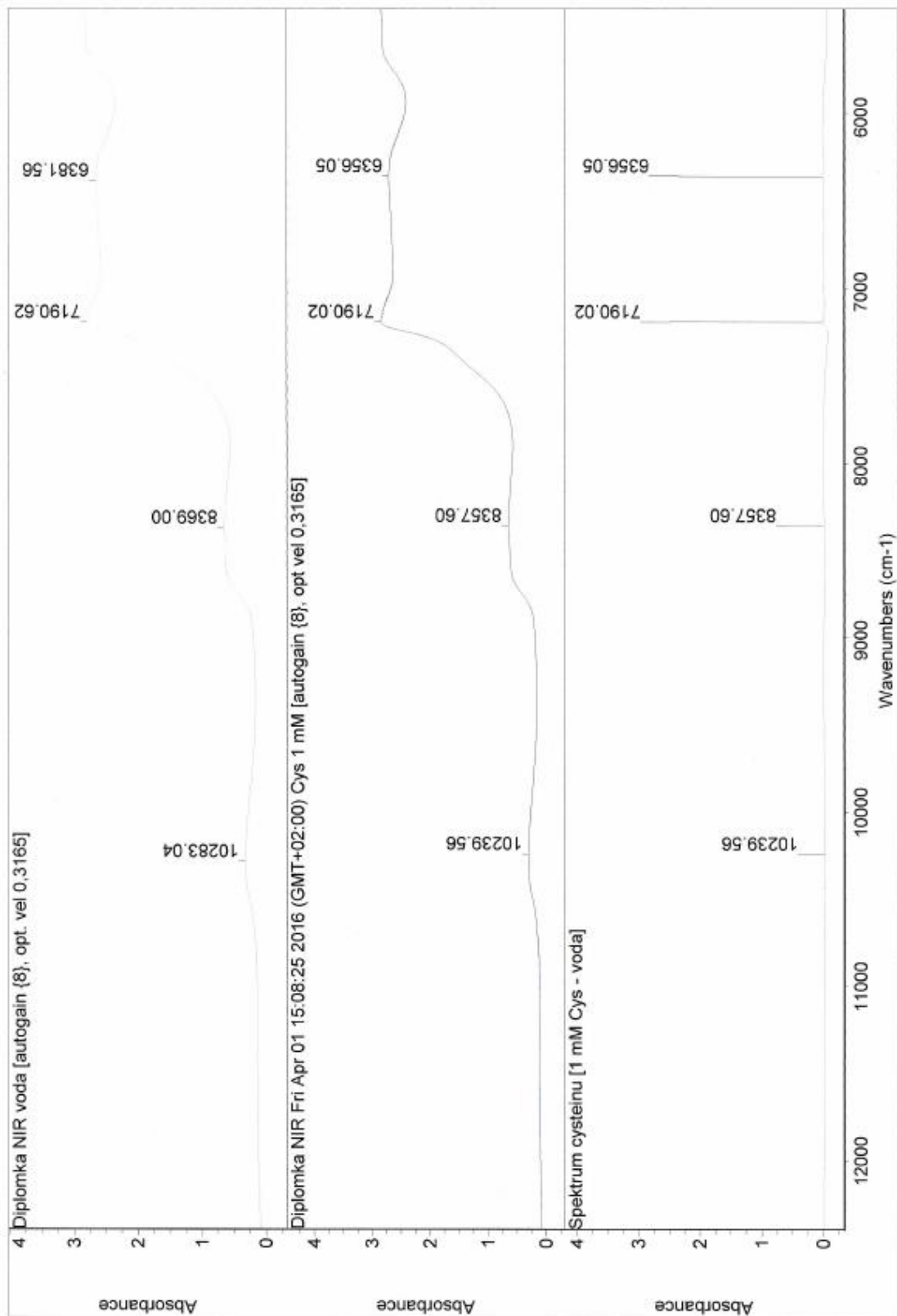
Spektrum 13: Porovnání spekter plazmy (modrá křivka) se spektry homocysteinu (červená křivka) a homocystein thiolaktonu (fialová křivka) – vlnočet 1995,06 cm⁻¹ patří HTL, plazma v této oblasti neabsorbuje



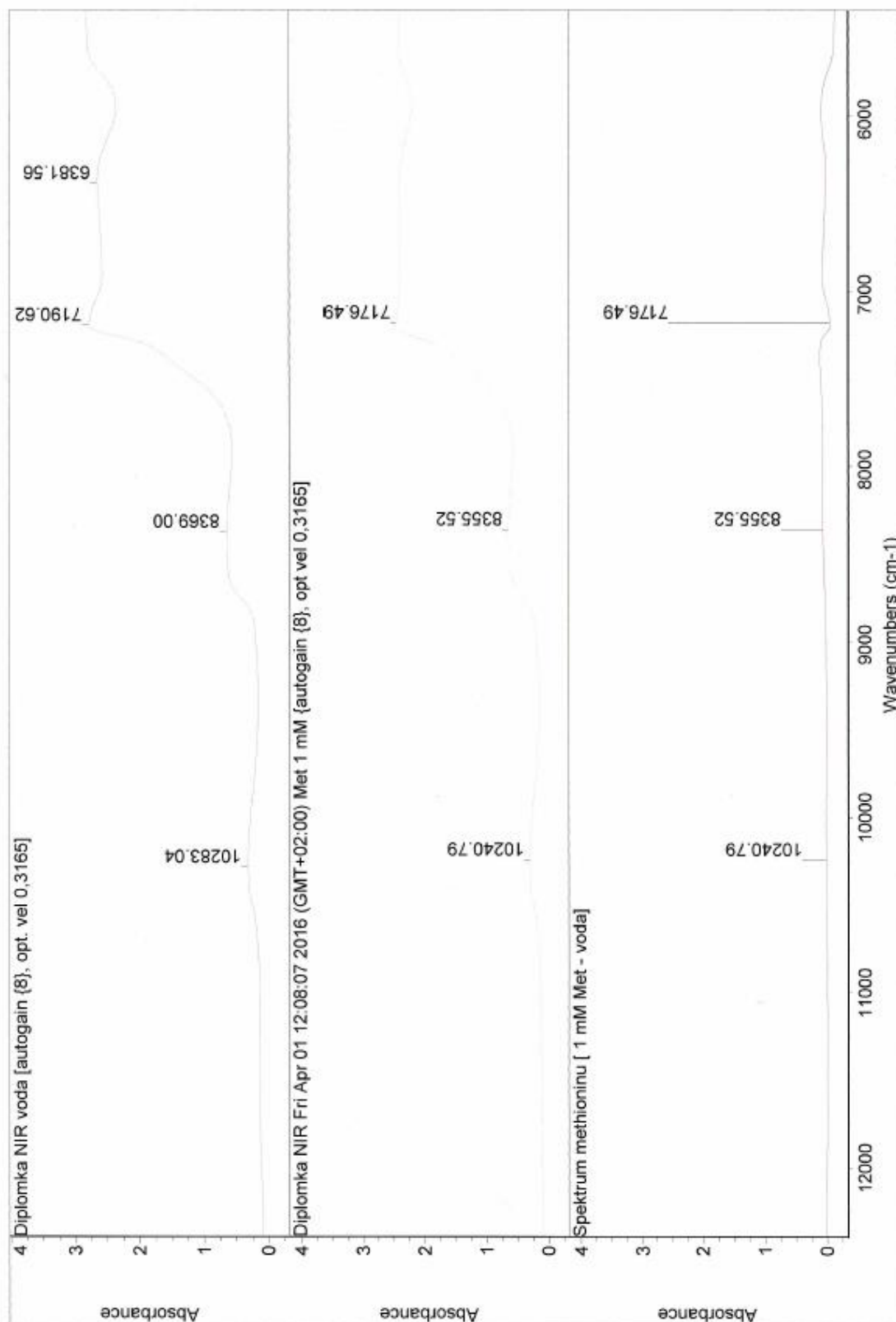
Spektrum 14: Spektrum homocysteinu v NIR (získáno odečtením spekter 1 mM roztoku Hcy a destilované vody)



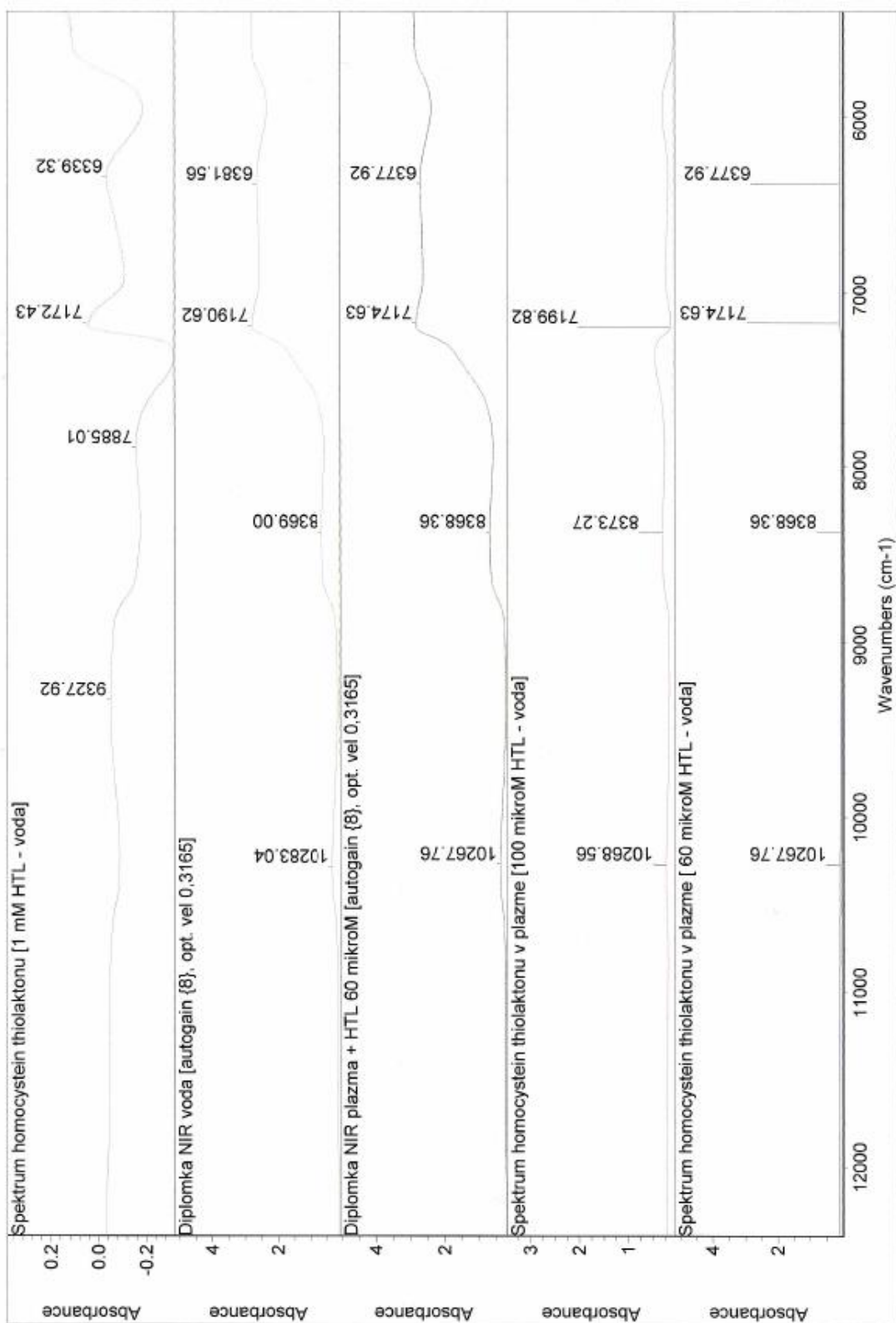
Spektrum 15: Spektrum homocystein thiolaktonu v NIR (získáno odečtením spekter 1 mM roztoku HTL a destilované vody)



Spektrum 16: Spektrum cysteinu v NIR (získáno odečtením spekter 1 mM roztoku Cys a destilované vody)



Spektrum 17: Spektrum methioninu v NIR (získáno odečtením spekter 1 mM roztoku Met a destilované vody)



Spektrum 18: Spektrum homocystein thiolaktonu ve vzorcích plazmy v NIR porovnané se spektrem standardu HTL naměřeným v NIR