

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

Přírodovědecká fakulta  
Laboratoř růstových regulátorů



**Diagnostika dědičných metabolických poruch  
pomocí vysokorozlišující hmotnostní  
spektrometrie**

**Bakalářská práce**

Autor:	<b>Nela Svobodová</b>
Studijní program:	B1501
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Hana Janečková
Konzultant práce:	RNDr. David Friedecký, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	27. 4. 2013

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 27. 4. 2013

.....

Ráda bych poděkovala paní Mgr. Haně Janečkové, která mi po celou dobu pomáhala a věnovala spoustu času, za odborné vedení mé práce a poskytnutí cenných informací. Poděkování patří také RNDr. Davidu Friedeckému, PhD. za realizaci experimentální části a cenné rady.

Tato práce vznikla za podpory projektu, jehož infrastrukturní část (Ústav molekulární a translační medicíny) byla podpořena Operačním programem Výzkum a vývoj pro inovace (projekt CZ.1.05/2.1.00/01.0030).

## **Bibliografická identifikace:**

Jméno a příjmení autora	Nela Svobodová
Název práce	Diagnostika dědičných metabolických poruch pomocí vysokorozlišující hmotnostní spektrometrie
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Hana Janečková
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	Dědičné metabolické poruchy (DMP) jsou genetická onemocnění mající za následek především tvorbu dysfunkčního enzymu. Dochází k poruše přeměny substrátu na produkt a tím k hromadění metabolitů v buňkách a jejich následné vyloučení do tělních tekutin. Cílem této práce bylo uplatnit hmotnostní spektrometrii s vysokým rozlišením pro diagnostiku DMP. Vzorky moči od pacientů s vybranými DMP byly analyzovány pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s Orbitrapem. Známé markery jednotlivých DMP byly potvrzeny na základě jejich přesné hmoty a hmotnostních spekter, která byla srovnávána s databází METLIN.
Klíčová slova	Dědičné metabolické poruchy, vysoce účinná kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením, Orbitrap
Počet stran	60
Počet příloh	0
Jazyk	Český

**Bibliographical identification:**

Autor's first name and surname	Nela Svobodová
Title	Diagnosis of inherited metabolic disorders using high resolution mass spectrometry
Type of thesis	Bachelor
Department	Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University Olomouc
Supervisor	Mgr. Hana Janečková
The year of presentation	2013
Abstrakt	Inborn errors of metabolism (IEMs) are genetic diseases, which are mainly caused by formation of dysfunctional enzyme. Conversion of substrate to product is reduced, this results in the accumulation of metabolites in cells and subsequent excretion into the body fluids. The aim of this study was to apply high resolution mass spectrometry for diagnosis of IEMs. Urine samples from patients with chosen IEMs were analyzed by high performance liquid chromatography coupled with Orbitrap. Known markers of IEMs were confirmed on the basis of their accurate mass and fragmentation spectra, which were compared with METLIN database.
Keywords	Inborn errors of metabolism, high performance liquid chromatography, high-resolution mass spectrometry, Orbitrap
Number of pages	60
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

OBSAH.....	6
SEZNAM OBRÁZKŮ .....	8
SEZNAM TABULEK .....	9
CÍLE PRÁCE .....	10
1 METABOLOMIKA .....	11
1.1 Metabolismus .....	11
1.2 Primární a sekundární metabolismus .....	11
1.3 Katabolismus a anabolismus.....	12
1.4 Metabolomika .....	13
1.5 Metody studia metabolomu.....	14
2 DĚDIČNÉ METABOLICKÉ PORUCHY .....	15
2.1 Klinické projevy .....	16
2.2 Laboratorní diagnostika .....	17
2.3 Analýza moči.....	18
2.3.1 Odběr a skladování moči .....	19
2.4 Charakteristika vybraných poruch .....	20
2.4.1 Homocystinurie.....	20
2.4.2 Deficit ornithintranskarbamoylasy .....	21
2.4.3 Deficit adenylosukcinátlyasy .....	22
2.4.4 Deficit guanidinacetátmethyltransferasy .....	23
2.4.5 Hyperlysinemie/saccharopinurie .....	24
2.4.6 Deficit aminoacylasy I.....	25
3 ANALYTICKÉ METODY .....	26
3.1 Kapalinová chromatografie .....	26
3.2 LTQ Orbitrap .....	27
3.2.1 Ionizace elektrosprejem.....	27
3.2.2 Iontová past.....	29
3.2.3 C-trap .....	29
3.2.4 Orbitrap .....	30
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	33
4 MATERIÁL.....	33
4.1 Chemikálie .....	33
4.2 Přístrojové vybavení.....	33
4.3 Biologický materiál .....	33
4.4 Příprava vzorků .....	33

5	METODY .....	34
5.1	Vysokoučinná kapalinová chromatografie.....	34
5.2	Orbitrap ELITE .....	35
6	VÝSLEDKY A DISKUSE .....	37
6.1	Detekce markerů na základě přesné hmoty.....	37
6.2	Fragmentační spektra markerů.....	43
7	ZÁVĚR.....	54
8	LITERATURA.....	55
9	POUŽITÉ ZKRATKY .....	60

# SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Metabolismus ATP a NADPH	12
Obrázek 2 Přehled "omických" vědních disciplín	13
Obrázek 3 Schéma různých možných mutací spojených s transportem	16
Obrázek 4 Biosyntéza kreatinu	24
Obrázek 5 LTQ Orbitrap	27
Obrázek 6 Zjednodušené schéma tvorby mnohonásobně nabitých kapiček	28
Obrázek 7 Kingdom trap	31
Obrázek 8 Spirálovitý pohyb iontů ve směru osy z v Orbitrapu	32
Obrázek 9 Průběh gradientové eluce	34
Obrázek 10 Chromatogram lysinu a sacharopinu	37
Obrázek 11 Chromatogram kyseliny orotové a uracilu	38
Obrázek 12 Chromatogram guanidinoacetátu a kreatinu	39
Obrázek 13 Chromatogram hymocysteinu a mohocystinu	40
Obrázek 14 Chromatogram acetylovaných aminokyselin	41
Obrázek 15 Chromatogram S-Ado a SAICAr	42
Obrázek 16 Fragmentační spektrum lysinu	44
Obrázek 17 Fragmentační spektrum sacharopinu	45
Obrázek 18 Fragmentační spektrum N-acetylglutaminu	46
Obrázek 19 Fragmentační spektrum N-acetylmethioninu	47
Obrázek 20 Fragmentační spektrum N-acetylglutamátu	48
Obrázek 21 Fragmentační spektrum uracilu	50
Obrázek 22 Fragmentační spektrum kreatinu	51
Obrázek 23 Fragmentační spektrum guanidinoacetátu	52
Obrázek 24 Fragmentační spektrum N-acetylserinu a homocystinu	53



## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Biochemické symptomy u DMP	17
Tabulka 2 Přehled zápachů moči pro jednotlivé DMP	18
Tabulka 3 Příklady barev moči pro různé poruchy metabolismu	19
Tabulka 4 Objemy nastříkovaných vzorků	35
Tabulka 5 Parametry iontového zdroje	35
Tabulka 6 Souhrn markerů pro jednotlivé DMP	36

## **CÍLE PRÁCE**

1. Zpracování literární rešerše na téma metabolomika, hmotnostní spektrometrie - Orbitrap, dědičné metabolické poruchy
2. Získání laboratorních dovedností a jejich uplatnění v praxi
3. Diagnostika dědičných metabolických poruch pomocí vysokorozlišujícího hmotnostního spektrometru
4. Zpracování a interpretace naměřených výsledků

# 1 METABOLOMIKA

## 1.1 Metabolismus

Základní podmínkou pro život organismu je zisk energie a její využití. Každý organismus se skládá z buněk, které jsou schopné získávat energii ze stavebních a zásobních látek jejich vzájemnou chemickou přeměnou. Chemická přeměna látek se děje pomocí systému reakcí, kterým se říká metabolické dráhy (Musilová & Glatz, 2011). Tyto metabolické dráhy se skládají z reakčních složek, meziproductů a produktů, jejichž počet je neomezený (Voet & Voetová, 1995). Těmto složkám se říká souhrnným názvem metabolity. Soubor všech metabolitů se označuje jako metabolom neboli souhrn všech nízkomolekulárních extra- i intracelulárních molekul (Oliver et al., 1998).

Všechny metabolické dráhy jsou katalyzovány specifickými enzymy, tudíž jsou regulovatelné a podle průběhu a tvorby či využití energie se dělí na degradační (katabolismus) a biosyntetické (anabolismus) dráhy, které jsou vzájemně protichůdné. Metabolismus zahrnující tyto látkové přeměny není ve všech organismech ani tkáních stejný. Jeho rozmanitost spočívá taky v jeho stáří, kdy v období maximálního růstu je nejrychlejší a největší (Vodrážka, 1996).

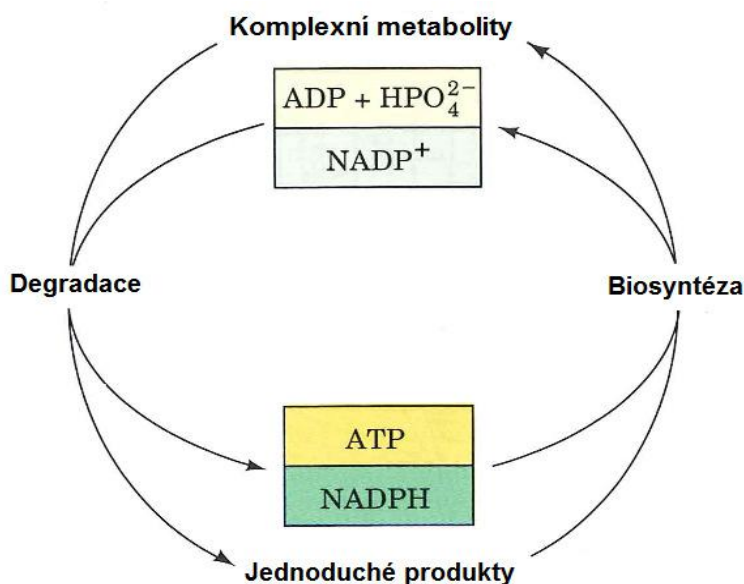
## 1.2 Primární a sekundární metabolismus

Kromě rozdělování metabolismu z energetického hlediska lze metabolismus dělit také na základní (primární) a sekundární. Primární metabolismus je společný v hlavních drahách buněk všech organismů a slouží především k zajištění energie, přísunu stavebního materiálu, růstu a syntéze základních stavebních složek metabolismu. Produkty primárního metabolismu jsou označovány jako primární metabolity a jsou pro všechny organismy skoro stejné. Dále jsou dráhy, které jsou typické jen pro určité druhy, vývojové fáze, tkáň nebo skupiny buněk, v tomto případě se hovoří o metabolismu sekundárním. Produkty tohoto metabolismu jsou sekundární metabolity. Tyto metabolity nemusejí mít významnou funkci v organismu, ale mohou mu poskytovat selektivní výhody (Vodrážka, 1996).

### 1.3 Katabolismus a anabolismus

Katabolické a anabolické dráhy mají společného přenašeče a skladovatele energie ve formě adenosintrifosfátu (ATP) (Voet & Voetová, 1995). ATP se skládá z purinové báze, cukru ribosy a kyseliny trihydrogenfosforečné s dvěma fosfoanhydridovými vazbami. Při katabolismu (rozkladu, disimilaci) dochází k exergonickému rozkladu složitých metabolitů na jednodušší produkty a uvolněná energie je ukládána ve formě ATP, který se v metabolismu syntetizuje z adenosindifosfátu (ADP) a fosfátu, nebo v nikotinamidadeninukleotidfosfátu (NADPH) vzniklého redukcí  $\text{NADP}^+$  (Obr. 1). Energie uložená v molekulách ATP a NADPH slouží jako zdroj energie pro anabolické dráhy (Voet & Voetová, 1995; Vodrážka, 1996).

Biosyntetické (anabolické, asimilační) reakce naopak využívají jednodušší látky ke vzniku chemicky složitějších látek za spotřeby energie. Jednodušší látky jsou využívány pro syntézu složitějších molekul a tyto látky označujeme souhrně jako prekurzory. Vedle katabolických a anabolických drah existují také dráhy amfibolické a anaplerotické. Amfibolické dráhy zahrnují jak degradační, tak biosyntetické mechanismy, typickým příkladem je citrátový cyklus, zatímco anaplerotické slouží k doplňování meziproductů jak pro degradační, tak biosyntetické dráhy (Vodrážka, 1996).

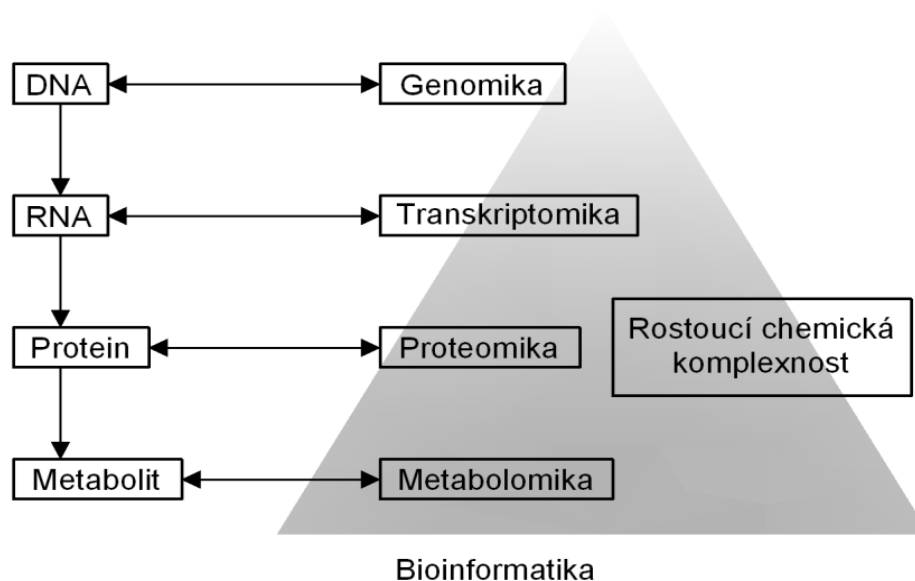


Obr.1: Metabolismus ATP a NADPH (převzato z Voet & Voetová, 1995)

## 1.4 Metabolomika

Metabolomika je vědní disciplína, která se zabývá studiem metabolomu a spadá do "omických" vědních oborů, mezi které se řadí též genomika, transkriptomika a proteomika (Obr. 2). Zatímco genomika se zabývá analýzou celého genomu s cílem porozumět funkci jednotlivých genů, tak transkriptomika se zabývá expresí genů a proteomika komplexní analýzou proteinů. Metabolom je definován jako kvalitativní a kvantitativní sběr metabolitů, které se v buňkách účastní metabolických reakcí nutných pro růst, funkci a udržování aktivity v buňkách. Současně se nedá určit přesný počet metabolitů v organismu, jelikož se počet neustále mění v závislosti na genetických změnách, nemocí a vlivu vnějšího prostředí (Dettmer & Hammock, 2004).

Velikost metabolomu se také liší v závislosti na studovaném organismu, například *Saccharomyces cerevisce* obsahuje kolem 800 metabolitů. Metabolity mají rozmanitou chemickou strukturu oproti transkriptomu a proteomu a to jim poskytuje různé chemické a fyzikální vlastnosti (Dunn & Ellis, 2005).



Obr.2: Přehled "omických" vědních disciplín (převzato z Nishioka & Tomita, 2005)

## 1.5 Metody studia metabolomu

Cílem metabolomiky je studium všech metabolitů v organismu, je to však příliš náročné, proto se zavedla cílená a necílená analýza. U cílené analýzy se výzkum zaměřuje na několik málo metabolitů či metabolickou dráhu, kdežto necílené analýza není zaměřena na určité metabolity.

Před samotnou analýzou je důležitá příprava vzorků a správný výběr analytické techniky. Odběr, příprava i skladování vzorků mají velký vliv na konečné složení, stabilitu vzorku a přesnost výsledků. V přípravě vzorků hraje důležitý krok především zastavení všech biochemických dějů v buňce a inhibice enzymatických procesů, aby nedocházelo ke změnám hladin metabolitů (Dunn & Ellis, 2005). Zastavení metabolismu se provádí pomocí tepelných změn, jako je zmrazení v kapalném dusíku nebo pomocí změny pH použitím kyseliny chloristé či dusičné atd. (Wittmann et al., 2004). Dalším krokem je extrakce pomocí vhodného extrakčního činidla a zakoncentrování, uplatňuje se extrakce na pevné fázi nebo kapalinová extrakce. Vzorky se mohou ředit nebo přímo analyzovat po chemické derivatizaci.

Jednou z metod studia metabolomu je metabolické profilování, které identifikuje a kvantifikuje předem definované metabolity spojené s určitou metabolickou dráhou, např. s citrátovým nebo močovinovým cyklem. Takhle se detekují například léky nebo jejich metabolity (Dunn & Ellis, 2005; Nicholson et al., 2002). Dalším možným přístupem ke studiu metabolomu je metabolický fingerprinting. Metoda je vysoce výkonná a rychlá. Umožňuje nám globální analýzu vzorku, která neposkytuje informace o metabolitech, ale může sloužit ke klasifikaci vzorků nebo jejich porovnání. Příprava vzorků pro fingerprinting je rychlá a postrádá separaci například pomocí chromatografie. Posledním přístupem ke zkoumání metabolismu je metabonomika, která se zabývá hodnocením změn endogenních metabolitů ve tkáních a biologických tekutinách, jež jsou způsobeny nemocemi či léčebnými procedurami (Dunn & Ellis, 2005).

Při výběru analytické techniky je důležité posoudit její vhodnost, přesnost, použitelnost a citlivost pro danou analýzu. Mezi nejpoužívanější se řadí kapalinová a plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií, nukleární magnetická rezonance (NMR) a infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací (FT-IR), (Dunn & Ellis, 2005).

## 2 DĚDIČNÉ METABOLICKÉ PORUCHY

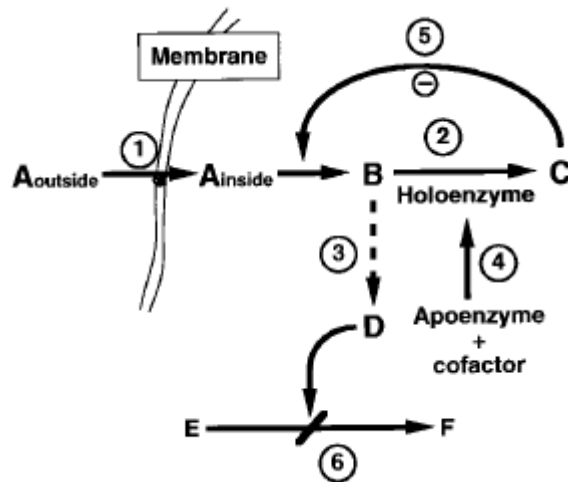
Dědičné metabolické poruchy (DMP) tvoří širokou škálu různých dědičných onemocnění, jejichž výskyt je v populaci vzácný. Nízký výskyt DMP může být v důsledku velkého počtu neobjasněných diagnóz u pacientů. Skutečná četnost DMP může být ve skutečnosti mnohem vyšší než je udávána. DMP tvoří skupinu poruch, které mohou zasáhnout prakticky jakýkoliv orgán nebo tkáň těla, proto je stanovení přesné diagnózy důležité nejen pro správnou léčbu pacienta, ale i pro případnou prevenci (Šťastná, 2008; Clarke, 2002).

DMP jsou způsobeny mutacemi genů, kdy dochází ke změně v nukleotidové sekvenci nebo v uspořádání DNA. Při proteosyntéze pak tyto pozměněné geny slouží jako předloha pro tvorbu proteinů, které mají buď funkci zachovanou anebo v horším případě je jejich funkce pozměněná či nulová (Fryčák et al., 2003).

V metabolismu, při procesu přeměny z jedné látky na druhou, hrají nezastupitelnou roli enzymy. Každý enzym obsahuje fyzikálně-chemické domény, kterými se vážou k substrátu. Při mutaci genů nejsou tyto domény substrátem rozeznány a dochází k akumulaci substrátu či jeho metabolitů a nedostatku produktu, to vše může mít negativní vliv na celý organismus. Pro diagnostiku DMP slouží především stanovení abnormálních hladin metabolitů v moči a plazmě.

Transport metabolitů přes membrány je usnadněný transportními proteiny, jež fungují jako enzymy. Genetické mutace tak mohou výrazně ovlivnit transport metabolitů a tudíž způsobit jejich nedostatek v místech potřeby (Obr. 3), (Clarke, 2002).

Téměř většina DMP je autosomálně recesivní, to znamená, že nemoc se projeví u homozygota, zatímco heterozygoti jsou pouze přenašeči defektního genu. Vzácně se vyskytují i DMP, které mají autosomálně dominantní způsob dědičnosti nebo jsou vázané na chromosom X (Racek et al., 1999).



Obr.3: Schéma různých možných mutací spojených s transportem metabolitu přes membránu (převzato z Clarke, 2004)

## 2.1 Klinické projevy

Hromaděním substrátu, jeho metabolitů nebo nedostatek produktu chemické reakce vede u člověka k lokálním nebo systémovým projevům nemoci. Symptomy jsou různé a nejčastěji se projevují u dětí nízkého věku, méně často u adolescentů a dospělých. Řada symptomů se kombinují s jinými nemocemi, a proto jsou špatně diagnostikovatelné (Šťastná, 2008). Z lékařského hlediska se symptomy dělí na akutní symptomy v novorozeneckém věku a kojeneckém období (věk < 1 rok), pozdější začátek a opakované ataky (batolecí věk a později), celkové chronické a progresivní symptomy a specifické orgánové symptomy (Fernandes et al., 2008).

Klinické příznaky mají tedy průběh buď opakovaný (akutní), vyvolaný intoxikací metabolity, nebo chronický a někdy progresivní



## 2.2 Laboratorní diagnostika

Stanovení správné diagnózy nelze zakládat pouze na symptomech, ale hlavní roli hrají potvrzující a vyšetřovací metody v rutinní biochemické laboratoři (Tab. 1), (Šťastná, 2008). Cílem klinického laboratorního vyšetření je odhalení nemocného jedince. Včasná diagnóza není založena pouze na různých testech, ale i o dostupné informace rodinné anamnézy.

Tab. 1: Biochemické symptomy u DMP (převzato z Šťastná, 2008).

<b>Vyšetření</b>	<b>Nálezy</b>
<b>glukosa</b>	hypoglykemie, hyperglykemie, glykosurie
<b>amoniak</b>	hyperammonemie
<b>laktát</b>	hyperlaktacidemie, hyperlaktacidurie
<b>kyselina močová</b>	hyperurikemie, hypourikemie
<b>ketolátky</b>	hyperketotické stavy, hypoketonemie nalačno
<b>bilirubin</b>	hyperbilirubinemie
<b>cholesterol</b>	hypercholesterolemie, hypocholesterolemie
<b>kreatinin</b>	hypokreatininemie
<b>myoglobin</b>	hyoglobinemie, myoglobinurie
<b>sacharidy</b>	melliturie

Laboratorní diagnostika se provádí na třech úrovních: úroveň nukleové kyseliny (DNA, eventuálně mRNA), proteinu (nejčastěji enzymu) a substrátu.

Detekce na úrovni substrátu bývá nejjednodušší, je založena na detekci hromadícího substrátu nebo chybějícího produktu z důvodu nefunkčního enzymu. Mohou vznikat i alternativní produkty, které u zdravého jedince nenalezneme. Substráty jsou vylučovány z těla a nejlépe jsou analyzovány z krve (sérum) nebo moči. Typickým příkladem je fenylnketonurie, která se projevuje nedostatkem fenylalaninu, který je důležitý pro tvorbu melaninu, pacienti proto trpí nedostatečným pigmentem. Detekce na úrovni proteinu je složitější a dochází zde ke změně náboje proteinu, což se dobře rozpozná u elektromigračních technik. Detekce na úrovni DNA je ze všech těchto úrovní nejspecifičtější a umožňuje také rozpoznat heterozygota pro dané onemocnění. Je založena na úplné znalosti nukleotidové sekvence jak v genu mutovaném, tak normálním (Racek et al., 1999). Pro spolehlivé určení diagnózy je ideální provést detekci na všech těchto úrovních, proto je nezbytné mít laboratorní, technické vybavení a finanční možnosti.

Laboratorní diagnostika DMP probíhá na základě populačního screeningu určité části populace (například novorozenecký screening) nebo selektivní screening u osob, které mají příznaky na DMP nebo mají vysoký předpoklad pro danou chorobu z jejich rodokmenů). V rodinách s výskytem DMP v rodokmenu se provádí speciální prenatální vyšetření v plodu matky nebo postmortální. Postmortální vyšetření se provádějí jen ve výjimečných případech, když se nestihne dokončit stanovení diagnózy u pacienta podezřelého na DMP (Šťastná, 2008).

## 2.3 Analýza moči

Analýza moči přináší důležité informace o tom, co se děje v organismu. K laboratornímu vyšetření moči slouží chemické a fyzikálně-chemické analýzy, vyšetření močového sedimentu a stanovení bílkovin citlivými technikami. U fyzikálního vyšetření se uplatňuje především vizuální hodnocení barvy, zápachu, zákalu, pěny, hustoty a množství moči.

Barva moči se může výrazně lišit od původní jantarové barvy moči, která je způsobená urochromem (Tab. 3). Abnormální zápach moči může indikovat podezření na přítomnost malých těkavých molekul, způsobující různé zápachy, které jsou specifické pro dané DMP (Tab. 2). U dětí, u nichž jsou zpozorovány tyto abnormality, se vyšetření opakuje každých 6 měsíců. (Hoffmann et al., 2006; Pavel Nezbeda, CEVA Kreditní kurz: analýza moči).

Tab.: 2 Přehled zápachů moči pro jednotlivé DMP (převzato z Hoffmann et al., 2006)

<b>Zápach</b>	<b>Sloučenina</b>	<b>Porucha</b>
zvířecí	fenylacetát	fenylketonurie
javorový sirup	sotolon	choroba javorového sirupu
štiplavý	isovalerová kyselina	isovalerová acidurie
zelí	2-hydroxybutyrová kyselina	malá absorpce methioninu
žluklé máslo	2-keto-4-methiolbutyrový kyselina	tyrosinemie
zkažené ryby	trimethylamin, dimethylglycin	trimethylaminurie

Tab.3: Příklady barev moči pro různé poruchy metabolismu (převzato z Hoffmann et al.,2006)

Barva	Podmínky	Potvrzení
<b>Tmavohnědá či černá moč</b>		
alkaptonurie	stání, alkalinizace	homogentisová acidurie, pozitivní Clinitest
melaninurie		diseminovaný melanomický sarkom
<b>Červená moč</b>		
hematurie		mikroskopicky
hemoglobinurie, myoglobinurie		mikroskopicky, guajak, benzidin
červená řepa (antrocyanin)		anamnéza
červené zbarvení (choroba pondělního rána, rhodamin B)		anamnéza
syndrom červených plen	24-36 hod oxidace po vymočení	kultivace, léčba neomycinem
fenolftalein		anamnéza, pH senzitivní
<b>Zelenomodrá moč</b>		
syndrom modrých plen		malá absorpce tryptofanu, indikanurie, indolactová acidurie
biliverdin (obstrukční žloutenka)		bilirubin v séru
methylenová modř (požití, léčba)		anamnéza

### 2.3.1 Odběr a skladování moči

Po fyzikálním vyšetření moči následuje ověření diagnózy na základě laboratorní diagnostiky, základem je správný odběr, uchování, transport a vlastní analýza vzorku. Před odběrem vzorku moči je dobré dodržovat základní hygienu, jako je omytí genitálií, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku mikroorganismy či jinými látkami z okolí. Odběry vzorků pro stanovení metabolitů v moči se mohou podle podmínek a potřeby provádět buď jednorázově, kdy se nejčastěji odebírá ranní moč, nebo sběrově, kdy se moč sbírá po určitých časových intervalech v rozmezí do 24 hodin.

U sběrových odběrů moči je riziko kontaminace podstatně vyšší než u jednorázového odběru. Způsob odběru se také liší, může být odebíraná spontánně vymočená tekutina nebo ze středního proudu. Ze středního proudu se první část moči vypustí do odpadu, střední se zachytí do nádoby a zbytek moči se vypustí také do odpadu.

Vzorky se nejčastěji odebírají do polyethylenovaných nádobek. Aby moč byla užitečná pro analýzu, musí se před transportem uchovávat v chladícím zařízení a konzervovat například zředěnou kyselinou dusičnou, tymolem v izopropanolu, thiomersalem nebo formaldehydem. Doba uchovávání vzorku před analýzou se liší na základě typu analýzy pro jednotlivé analyty (Spěváčková & Knotková, 1998; Pavel Nezbeda, CEVA Kreditní kurz: analýza moči).

## **2.4 Charakteristika vybraných poruch**

V následujících kapitolách jsou popsány vybrané metabolické poruchy, které jsou následně analyzovány v experimentální části této bakalářské práce.

### **2.4.1 Homocystinurie**

Homocystinurie je autosomálně recesivní dědičné onemocnění způsobené nejčastěji nedostatkem nebo absencí enzymu cystathion- $\beta$ -syntasy (CBS, EC 4.2.1.22). V neléčeném organismu se toto onemocnění projevuje především ve spojení s postižením očí, osteoporózou především v obratlové oblasti, mentální retardací a tromboembolickými komplikacemi. Ve vzácných případech se objevuje i pneumotorax a pankreatitida (Fernandes et al., 2008). Z biochemického hlediska jsou významnými identifikačními znaky nemoci zvýšené hladiny cystathioninu, homocysteinu a homocystinu v moči (<http://www.metagene.de>).

U pacientů s homocystinurií je celkem známo již více než 130 mutací v genu pro CBS, který je lokalizovaný na chromosomu 21. Jedná se především o mutace v exonu 3 a 8 (Lucca & Casique, 2004; Fernandes et al., 2008).

Enzym CBS má zjištěnou aktivitu v mnoha tkáních, jako jsou játra, mozek, pankreat a fibroblasty. Uplatňuje se především v methioninovém cyklu, kde zajišťuje především přeměnu homocysteinu na cystein v přítomnosti kofaktoru pyridoxal-5-fosfátu. Kromě tohoto kofaktoru se v tomto ději zvaném remethylace uplatňují ještě kyselina listová a vitamin B12 (Yap, 2005; Fowler, 1985). Deficit CBS vede ke hromadění methioninu, homocysteinu a jejich S-adenosyl derivátů, nedostatku cystathioninu a k nízkým hladinám cysteinu. Homocystein vznikající z methioninu

obsahuje -SH skupiny, které mohou reagovat s ostatními molekulami homocysteinu, vzniká tak homocystin, disulfidická sloučenina. Normální hodnoty homocysteinu v plazmě se pohybují okolo 15  $\mu\text{mol/l}$ , zatímco u nemocných pacientů se hladina homocysteinu dostává nad 200  $\mu\text{mol/l}$  (Fernandes et al., 2008).

Cílem léčby u pacientů s homocystinurií je snížit celkovou hladinu homocysteinu. Existuje několik způsobů jak hladiny homocysteinu snížit, záleží na typu poruchy a sociálních faktorech. Při deficitu CBS se pacientům podává dávka pyridoxinu. U pacientů, u nichž pyridoxin nezabírá, musí být držena celoživotní dieta s nízkým obsahem methioninu a vysokým obsahem cystinu. Dieta se kombinuje i s pyridoxinem pro dosažení adekvátní kompenzace. Dále se doporučuje užívání folátu, vitamínu B12 a doplnění stravy o suplementy vitamínů a minerálních látek (Fernandes et al., 2008).

#### **2.4.2 Deficit ornithintranskarbamoylasy**

Deficit ornithintranskarbamoylasy (OTC, EC 2.1.3.3), je porucha, která se společně s dalšími šesti DMP řadí do poruch v cyklu močoviny. Pro všechny tyto enzymové poruchy včetně OTC nedostatku je příznačné hromadění dusíku ve formě amoniaku, který se v normálním metabolismu vylučuje ve formě močoviny. Enzymové defekty v cyklu močoviny znamenají vznik hyperamonemií a poruch v metabolismu aminokyselin. Klinické příznaky zasahují už do novorozeneckého věku s projevy zvracení, křeče, kómatu, respiračního selhání atd. V kojeneckém období nejsou symptomy tak výrazné a jsou spojené především s opožděným vývojem, poruchami chování apod. V dětském věku a dospělosti nejsou známé spouštěcí mechanismy, ale často jsou nápadnými znaky časté zvracení, bolesti hlavy, neurologické problémy, záchvaty, hepatomegalie apod.

Deficit OTC je X-vázaná porucha na genu Xp21.1 (Fernandes et al., 2008; Anadiotis et al., 2001). U většiny chlapců s touto poruchou nejsou detekovatelné aktivity OTC enzymu, proto mají závažné hyperamonemie končící smrtí už v prvním roce života. U žen heterozygotek jsou příznaky i abnormální nálezy špatně detekovatelné a často se chovají pouze jako přenašečky (Pembrey et al., 1985).

Amoniak v těle pochází především z glutamátu a glutaminu a jejich přeměnou karbamoylfosfátsynthasou (CPS) vzniká karbamoylfosfát. Ve střevech je karbamoylfosfát enzymem OTC přeměněn na citrulin a dále je v ledvinách metabolizován na arginin. Z ledvin si ho převezmou játra, kde je hydrolyzován na ornithin a močovinu. Při snížené aktivitě OTC se v mitochondriích hromadí karbamoylfosfát, který v cytosolu vstupuje opět do pyrimidinového cyklu (Fernandes et

al., 2008). V moči se vyskytují vyšší hladiny kyseliny orotové, uracilu, 5-oxoprolinu, lysinu a glycinu (<http://www.metagene.de>).

Při léčbě pacientů s touto poruchou se zajišťuje příjem dostatečného množství potřebných živin a snížený příjem bílkovin. Nízkobílkovinná dieta záleží na závažnosti poruchy a věku pacienta. Doplnuje se především argininin a citrulin v dávkách 50-150 mg/kg/den. Dále se využívají léky na odstranění nadbytečného dusíku v těle, jako je např. fenylacetát a fenylbutyrát. Důležité je při léčbě udržovat rovnováhu mezi příjmem léků a dietou na bílkoviny. Veškerá léčba se monitoruje a hodnotí se hladiny metabolitů v moči (Fernandes et al., 2008).

### **2.4.3 Deficit adenylosukcinátlyasy**

Deficit enzymu adenylosukcinátlyasy (ADSL, EC 4.3.2.2) je poruchou purinové syntézy. U pacientů se projevuje široká škála neurologických poškození, mentálních retardací, epilepsií a autistické rysy. U autistických projevů jsou příznačné nepřítomnosti očního kontaktu, stereotypie v chování, jako je neklid a záchvaty vzteku (Fernandes et al., 2008; Gitiaux et al., 2009). Pacienti s menší závažností poruchy mají mírnější příznaky retardace, svalovou hypotonii a mírně opožděný motorický vývoj. U vzácných případů se mohou v již prvních dnech narození objevovat také křeče (Fernandes et al. 2008).

Z genetického hlediska se jedná o autosomálně recesivní dědičné onemocnění umístěné na chromosomu 22, genu 22q13.1 (Fernandes et al., 2008; <http://www.metagene.de>).

Enzym ADSL katalyzuje syntézu purinů ve dvou krocích. Syntéza purinů dohromady zahrnuje 13 metabolických kroků začínajících ribosou-5-fosfátem a končícím adenosinmonofosfátem (AMP) nebo guanosinmonofosfátem (GMP). Tyto dva kroky zahrnují především přeměnu sukcinylaminoimidazolkarboxamidribotidu (SAICAR) na aminoimidazolkarboxamidribotidu (AICAR) a přeměnu adenylosukcinátu (S-AMP) na AMP (Spiegel et al., 2006). Snížená aktivita ADSL způsobuje hromadění substrátů SAICAR a S-AMP, které jsou následně defosforylovány za vzniku ribosidů - sukcinylaminoimidazolkarboxamidribosidu (SAICAR) a sukcinyladenosinu (S-Ado) a vylučovány do plazmy, moči a mozkomíšního moku (Gitiaux et al., 2009). Diagnostika je založena na detekci zvýšené hladiny SAICAR a S-Ado v moči a likvoru.

Při léčbě je řada pacientů léčena pomocí suplementů adeninu a alopurinolu, aby se doplnily ADSL deficitní tkáně na správné koncentrace adeninových nukleotidů a u pacientů s projevy křečí se podává ribosa a uridin. Doposud avšak nebyla popsána žádná účinná léčba (Fernandes et al., 2008).

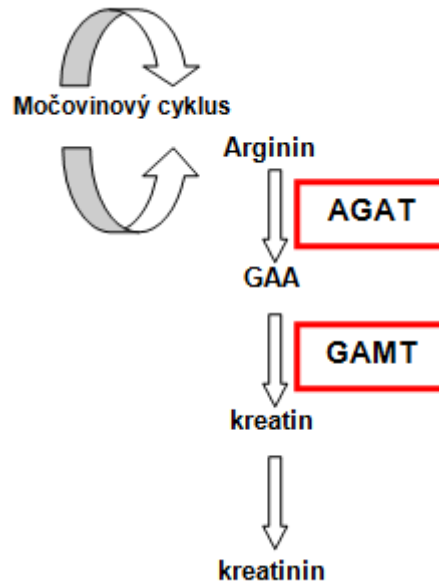
#### 2.4.4 Deficit guanidinacetátmethyltransferasy

Deficit jaterního enzymu guanidinacetátmethyltransferasy (GAMT, EC 2.1.1.2) je způsoben poruchou syntézy kreatinu. Donorem methylové skupiny je S-adenosylmethionin. Nedostatečná tvorba kreatinu vede ke zvýšenému hromadění jeho prekurzoru guanidinoacetátu (GAA) se současným poklesem hladin kreatinu v mozkové tkáni a kosterním svalstvu. Mechanismus syntézy a zachycování kreatinu je v těchto tkání oddělený. Nepatrné snížení aktivity GAMT se u postižených projevuje jako zhoršená vyjadřovací schopnost. Mezi další symptomy patří porucha učení, autistické chování, epilepsie, hyperaktivita a extrapyramidové pohyby. S akumulací guanidinoacetátu souvisí interakce s neuronálními receptory GABA<sub>A</sub>, které jsou zodpovědné za neurologické dysfunkce projevující se u této poruchy (Gordon, 2010).

Gen pro syntézu GAMT je lokalizován na chromosomu 19p13.3. Jedná se o autosomálně recesivní poruchu s vyšší frekvencí u pokrevně příbuzných partnerů (Fernandes et al., 2008).

Diagnóza GAMT je založena na detekci zvýšené hodnotě GAA v moči a snížené hodnoty kreatinu v krevní plazmě. Přítomnost GAA v moči vyvolává změnu zabarvení reagujících látek z oranžové barvy na červenou v tzv. Sakaguchiho reakci. (Verbruggen et al., 2007; Gordon, 2010).

Léčba pacientů je založena na podávání kreatinmonohydrátu v denní dávce 300-400 mg/kg. Cílem je zvýšit hladinu kreatinu v mozku na 70 % a dlouhodobou léčbou odbourat projevy extrapyramidových pohybů. S léčbou souvisí i omezení příjmu argininu s doplněným příjmem vysokých dávek ornithinu, které inhibují syntézu GAA kompetitivní inhibicí aktivity enzymu argininyglycinamidotransferasy (AGAT). Tato kombinovaná léčba výrazně posílila snížení epileptických křečí, mentálních poruch a chování (Fernandes et al., 2008).



Obr.4: Biosyntéza kreatinu (přepřacované dle Engelke et al., 2009).

#### 2.4.5 Hyperlysinemie/saccharopinurie

Hyperlysinemie/saccharopinurie je méně častá DMP, která se uvádí spíše jako vzácná odchylka metabolismu. Symptomy u pacientů diagnostikovaných na tuto odchylku zahrnují malý vzrůst, psychomotorickou retardaci, epilepsii a ataxii. Vzácně se objevuje i kloubní laxicita a sférofykie.

Z hlediska genetiky se jedná o autosomálně recesivní dědičné onemocnění. Porucha byla zaznamenána mutací v genu 7q31.3. Porucha v tomto genu způsobuje nedostatek enzymu v degradační dráze lysinu. Lysin je esenciální aminokyselina, která se degraduje lysin-2-oxoglutarátreduktasou na saccharopin a saccharopin je následně saccharopindehydrogenasou odbourán na  $\alpha$ -aminoadipát semialdehyd a glutamát. Pokud jsou sníženy obě aktivity těchto enzymů vlivem mutací v uvedeném genu, tak dochází především k hyperlysinemii provázenou mírnou saccharopinurií. Bylo zjištěno, že tato nemoc je způsobena vadou bifunkčního proteinu 2-aminoadipátsemialdehydsynthasy (AASS) a sníženou aktivitou v enzymech v prvním a druhém kroku této degradace lysinu. U hyperlysinemie/saccharopinurie je dominantní vylučování saccharopinu.

U pacientů dochází převážně k hromadění saccharopinu a lysinu, též homoargininu, kyseliny 2-aminoadipové a pipekolové. Tyto metabolity a jim podobné



mohou být nalezeny v plazmě, likvoru i moči (Fernandes et al., 2008; Sacksteder et al., 2000).

Při léčbě pacientů pro toto onemocnění není nutná celoživotní dieta na lysin, protože se jedná o benigní poruchu, která není spojena se zvýšením morbidity nebo mortality (Fernandes et al., 2008).

#### **2.4.6 Deficit aminoacylasy I**

Deficit aminoacylasy I (ACY I, EC 3.5.1.14) je nedávno popsaná vrozená porucha metabolismu. Dosud není jasné, zda nedostatek nebo vada tohoto enzymu je skutečně metabolická porucha nebo pouze biochemická abnormalita. Pacienti s podezřením na toto onemocnění mají různorodé neurologické příznaky s možným spojením autismu, psychomotorické zpoždění a mentální retardace.

Z hlediska genetického se jedná o autosomálně recesivní dědičné onemocnění v mutaci genu 3q21.1 pro ACY I. ACY I zajišťuje hydrolýzu N-acetylovaných aminokyselin na volné aminokyseliny a kyselinu octovou. Mutace v genu pro ACY I dochází k jeho úplnému nedostatku nebo k vadě, která zapříčiňuje hromadění N-acetylovaných aminokyselin v moči. Tyto látky byly identifikovány analýzou organických kyselin v moči. Mezi zvýšené nálezy v moči patří acetylalanin, acetylmethionin, acetylglutamát, acetylglycin, acetylisoleucin, acetylleucin, acetylserin, acetylthreonin a acetylvalin (Sommer et al., 2011).

## 3 ANALYTICKÉ METODY

V následujících kapitolách jsou podrobněji popsány použité techniky v této práci. Pro separaci látek byla využita vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), k hmotnostní analýze byl použit LTQ Orbitrap ELITE.

### 3.1 Kapalinová chromatografie

Chromatografie je separační metoda, při které se oddělují složky obsažené ve vzorku. Vzorek se vkládá mezi dvě nemísitelné fáze, jež nepohyblivou tvoří stacionární a pohyblivou mobilní fáze.

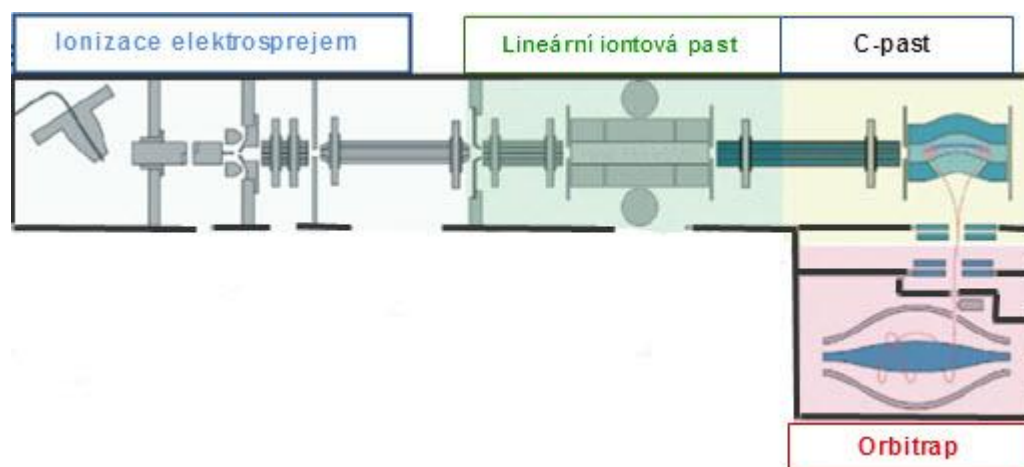
Volba mobilní a stacionární fáze je v HPLC obzvlášť důležitá, neboť eluční pořadí je závislé na polaritě separovaných látek a polaritách těchto fází. Při použití polární mobilní fáze jako je např. voda, jsou zadržovány nejméně látky nepolární. Stejně tak funguje separace látek přes polární stacionární fázi. Za středně polární látky jsou považovány alkoholy a acetonitril a nepolární jsou alkany a cykloalkany.

Kolony v HPLC jsou většinou ocelové nebo tlustostěnné skleněné trubice aby odolávaly vysokému tlaku mobilní fáze. Jsou naplněny stacionární fází s vhodnými funkčními skupinami, které udávají výslednou polaritu stacionární fáze. HPLC má vysokou účinnost separace za použití kolon naplněných stacionární fází s vysokou homogenitou a hustotou malých a dobře velikostně definovaných částic.

Celý systém se ještě skládá z čerpadla, který zajišťuje tok mobilní fáze, dávkovacího zařízení pro vzorek a detektoru (Opekar et al., 2003).

## 3.2 LTQ Orbitrap

LTQ Orbitrap je hybridní hmotnostní spektrometr, který se skládá z následujících částí – lineární iontové pasti, C-trapu a orbitrapu (Obr. 5). K ionizaci molekul se zde používá elektrosprej. Lineární iontová past (IP) ve spojení s Orbitrap slouží jako vysoce účinný systém s vysokou rozlišovací schopností a citlivostí detekce (Scigelova & Makarov, 2006).



Obr.5: LTQ Orbitrap (převzato z Scigelova & Makarov, 2006)

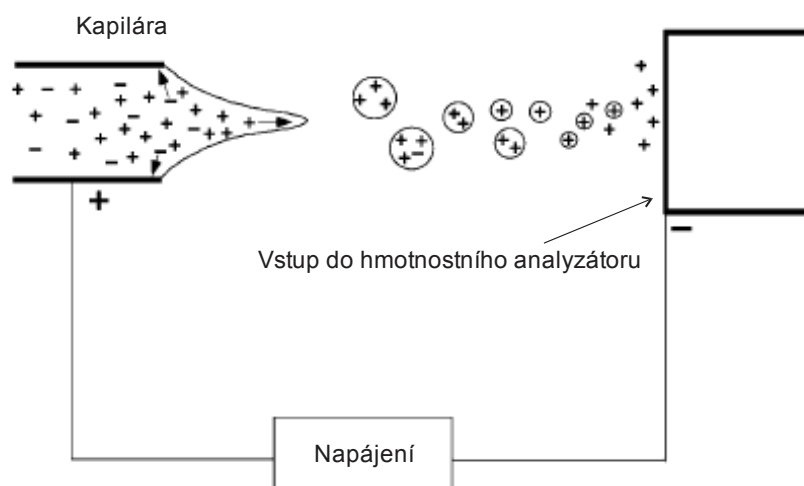
### 3.2.1 Ionizace elektrosprejem

Ionizace elektrosprejem je dnes nejrozšířenější ionizační technika v chemické a v biochemické analýze. Umožňuje ionizaci kapalných vzorků bez omezení hmotnosti molekul. Vysoká účinnost ionizace naprosto změnila biomolekulární vědy, protože molekuly zde mohou být identifikovány a kvantifikovány i ve stopovém množství (Wilm, 2011).

Ionizace elektrosprejem byla popsána již v 60. letech a řadí se mezi jednu z nejslibnějších ionizačních technik molekul analytu (Dole et al., 1968). Při použití elektrospreje (ESI – Elektrospray ionization) je analyzovaná sloučenina rozpuštěna ve vhodném rozpouštědle a přiváděna do iontového zdroje pomocí kovové kapiláry, na kterou je aplikováno vysoké elektrické napětí. Při výstupu roztoku z kovové kapiláry vzniká jemný sprej mnohonásobně nabitých kapiček (Obr. 6), které jsou vlivem elektrického pole unášeny směrem k vakuové části zdroje. Vytvořené kapičky nesou záporný nebo kladný náboj v závislosti na polaritě aplikovaného napětí na kapiláru. Působením zahřátého dusíkového plynu se během cesty do vakuové části vypařuje kapalina (Kearle & Tang, 1993). Vypařováním rozpouštědla z povrchu nabitých

kapiček se zvyšuje hustota povrchového náboje a následně dochází k uvolnění protonovaného molekulárního iontu. Ionty uvolněné z kapiček jsou iontovou optikou vtahovány do hmotnostního analyzátoru (Holčápek & Jandera, 1998).

Tři možné teorie vysvětlují, jak se ionty uvolňují z kapiček. První z nich tvrdí, že se ionty odpařují z kapiček, přičemž odpařování je závislé na jejich velikosti. Druhá teorie zmiňuje, že při odpařování a zároveň zmenšování kapiček dochází ke zvýšení odpudivé síly uvnitř shluku iontů. Tomuto jevu se říká coulombické vypuzování, které zapříčiňuje vypuzení jednotlivých iontů z kapiček. Shrnutím obou jevů dohromady, vznikla třetí teorie založená na vzájemném působení obou těchto jevů (Ubik, 2000).



Obr.6: Zjednodušené schéma tvorby mnohonásobně nabitých kapiček vedoucích k hmotnostnímu analyzátoru (převzato z Han & Gross, 2004)

Výhodou ESI je, že se zdroj skládá ze dvou částí, takže lze provést nezávislé nastavení separačních podmínek i podmínek pro hmotnostní analýzu. Při volném přechodu iontů z atmosférické oblasti zdroje do vakuové části se částice postupně ochlazují, což přispívá ke stabilitě tepelně nestálých látek (Vřešťál et al., 1998). Další významnou vlastností ESI je skutečnost, že může generovat adicí nebo substrakcí protonů vícenásobně nabitě ionty sloučenin. Sloučeniny mohou mít více potenciálních nábojových center. U záporných iontů nebývá úbytek protonů zdaleka tak významný jako u kladných iontů. Adice u kladných iontů jde do desítek. Výsledkem měření jsou spektra kvazimolekulárních iontů s různým počtem nábojů. Dalším vývojem elektrospreje vznikl iontový zdroj, který se liší především ve způsobu toku iontů

z kapiláry. K toku iontů se zde využívá rozprašovač, který umožňuje zvýšit průtok eluátu (Ubik, 2000). ESI je vhodná především pro charakterizaci polárních molekul, také se dá využít pro analýzu syntetických polymerů, biopolymerů a sekvenci bílkovin (Vřešťál et al., 1998).

### 3.2.2 Iontová past

Z elektrospreje jsou ionty vedeny vyhřívanou kapilárou do iontové optiky, na kterou jsou přiváděny různé potenciály. Iontová optika má za úkol urychlovat a selektovat ionty. IP obsahuje prstencovou elektrodu, která se nachází ve středu. Tuto středovou elektrodu obklopují dvě kruhové elektrody, zvané vstupní a výstupní (Obr. 10). Všechny tyto elektrody jsou hyperbolického průřezu. Na středovou elektrodu se přivádí vysokofrekvenční napětí s měnící se amplitudou. Iontová past pracuje na základě injikace elektronů do jedné z kruhových elektrod. Ionty jsou zadržovány uvnitř prstencové elektrody aplikací nízké hodnoty amplitudy. Po zvýšení vysokofrekvenční amplitudy elektrody roste také hmota  $m/z$  iontů, stávají se nestabilní a jsou vypuzeny z pasti. IP slouží k akumulování i slabých signálů, aby se signál stal dostatečně silným. V iontové pasti hraje důležitou roli vnitřní tlak, který se udržuje pomocí tlumícího plynu. Tlak tlumí pohyb iontů v pasti a ionty jsou tímto lépe drženy v jejím středu (Ubik, 2000).

Lineární iontová past společně s Orbitrapem slouží jako dva hmotnostní analyzátoři v LTQ Orbitrapu. V závislosti na požadavcích analýzy mohou být použity samostatně nebo spolu.

Primárně zde lineární iontová past slouží k zachytávání, akumulaci iontů a také jako impulsový iontový zdroj a detektor. Z lineární iontové pasti přecházejí akumulované ionty do C-trapu.

### 3.2.3 C-trap

C-trap má tvar písmena C a ionty se zde nacházejí v radiofrekvenčním poli (RF). C-trapem proletí pouze nabitě ionty, které vyžadujeme k analýze. Ostatní ionty jsou blokovány a neproletí zakřivením v C-trapu. V C-trapu se ionty akumulují před vstupem do Orbitrapu a zároveň zde dochází k fragmentaci iontů vlivem radiofrekvenčního pole (Scigelova & Makarov, 2006). Zároveň je zde plynem dusíku tlumen pohyb iontů a tím i snížena jejich kinetická energie. Následně jsou ionty krátkým pulsem vstříknuty do Orbitrapu, kde se ionty začnou pohybovat kolem centrální elektrody (Olsen et al., 2004).

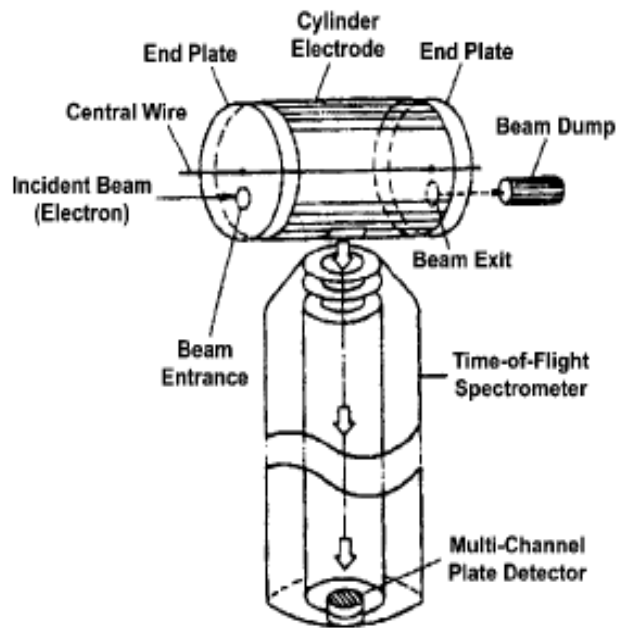
### 3.2.4 Orbitrap

Novým typem hmotnostního analyzátoru je Orbitrap, který se od svého zavedení na trh v roce 2005 stal novou volbou pro hmotnostní analýzu. Jak jeho název napovídá, jedná se o orbitální iontovou past (Scigelova & Makarov, 2006).

Orbitrap byl poprvé popsán v roce 2000 a nyní dosahuje statusu robustního hmotnostního analyzátoru, který může poskytovat vysokou rozlišovací přesnost (Makarov, 2000, Perry et al., 2008). Jedná se o nový přírůstek do rodiny hmotnostních analyzátorů využívajících elektrostatickou iontovou past, který se od starších hmotnostních analyzátorů (např. Paulův a Penningův - kvadrupólová iontová past) liší tím, že nevyužívá magnetického ani dynamického pole, nýbrž elektrostatického (Hu et al., 2005; Volný, 2011).

Předchůdcem Orbitrapu je Kingdom trap, který vynalezl Kingdom v roce 1923. Kingdom pasti se používaly zprvu jako zachycovací zařízení, nikoli jako hmotnostní spektrometry (Olsen et al., 2005; Hu et al., 2005).

Kingdom trap se skládá ze systému elektrod, které jsou přesně vyrobeny pro jeho používání. Střed tvoří tenký vodič (centrální elektroda), umístěné axiálně v dutině analyzátoru. Kolem této vnitřní elektrody se nachází elektricky izolovaná vnější válcová elektroda a celý systém zakončují dvě čelové elektrody (Obr. 8). Mezi systém elektrod je aplikováno stejnosměrné elektrické napětí (DC), které vytváří uvnitř tohoto systému radiální logaritmický potenciál. Ionty zde putují s určitou rychlostí kolmo k tenkému vodiči a vytvářejí tak stabilní oběžné dráhy kolem centrální elektrody (Obr. 8). Poslední úpravy, které vedly k výrobě Orbitrapu, provedl Knight v roce 1923. Upravil vnější elektrody tak, aby byly oddělené a mohly se ionty vstříkovat přímo do pasti. Takto upravené elektrody současně umožnily vznik čistého kvadrupólového potenciálu (Hu et al., 2005).

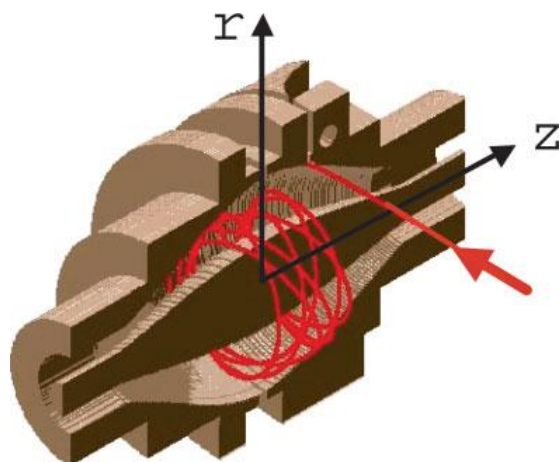


Obr.7: Kingdom trap (převzato z Perry et al., 2008)

Orbitrap vynalezený Alexandrem Makarovem převzal z Kingdom trapu vnitřní a vnější elektrody, které jsou speciálně tvarované. Největší průměr vnitřní elektrody je 8 mm a vnější elektrody 20 mm. Kolem speciálně tvarované centrální elektrody se nachází elektroda válcová, která je rozdělena na dvě poloviny keramickým kroužkem. Válcová elektroda slouží k měření signálu, který je indukován v důsledku axiálního pohybu iontů uvnitř analyzátoru.

Orbitrap může být také považován za modifikovanou formu kvadrupólové iontové pasti až na to, že využívá místo dynamického a elektrického pole elektrostatické potenciály k udržení iontů kolem centrální elektrody. Osově symetrické elektrody vytváří kombinovaný kvadrologaritmický elektrostatický potenciál, (Schwartz et al., 1990), který lze vyjádřit rovnicí 1, kde  $R$  a  $z$  jsou válcové souřadnice,  $k$  je konstanta zakřivení pole a  $R_m$  je charakteristický poloměr (Hu et al., 2005)

$$U(r, z) = \frac{k}{2} \left( z^2 - \frac{r^2}{2} \right) + \frac{k}{2} \cdot (R_m)^2 \cdot \ln \left[ \frac{r}{R_m} \right] + C \quad (1)$$



Obr.8: Spirálovitý pohyb iontů ve směru osy z v Orbitrapu (převzato z Hu et al.,2005)

Pokud se aplikuje napětí mezi vodič (středovou elektrodu) a válcovou elektrodu, dochází k vytvoření silného elektrostatického pole kolem centrální elektrody. Ionty jsou pak tímto silným elektrostatickým polem přitahovány k vnitřní elektrodě (Makarov, 2000). Ionty, které jsou do Orbitrapu vstříknuty v bodě červené šipky (podle Obr. 8), se pohybují podél osy z s kolmou rychlostí. Potenciální energie elektrostatického pole, která na ionty mezitím působí, je kompenzována odstředivou silou, která vzniká z počáteční tečné rychlosti iontů. Na ionty tedy působí různé síly, které je nutí pohybovat se po dráze kolem vnitřní elektrody spirálovitým kmitem. Tato trajektorie iontů ve směru osy z kolem centrální elektrody připomíná šroubovici a vzhledem k vlastnostem kvadrologaritmického potenciálu, který tam postupně vzniká, je pohyb iontů harmonický. Toto kmitání iontů není závislé na počáteční rychlosti, úhlu a pozici iontů. Ionty oscilující kolem centrální elektrody jsou zachyceny radiálně jako proudový obraz na obou polovinách vnější elektrody v dutině analyzátoru a je zpracován pomocí Fourierovy transformace (Scigelova & Makarov, 2006; Verner, 2005).



# EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

## 4 MATERIÁL

### 4.1 Chemikálie

Acetonitril LC-MS (AcCN,  $\geq 99,9\%$ ), hydroxid amonný (25%) a voda LC-MS byly zakoupeny u firmy Sigma Aldrich (St. Louis, USA).

### 4.2 Přístrojové vybavení

Vzorky močí byly analyzovány pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie Dionex Ultimate 3000 RS (Sunnyvale, CA, USA) ve spojení s hybridním hmotnostním spektrometrem Orbitrap Elite. Dále byl použit vortex (IKA Works, USA) a centrifuga (Micro 120, Hettich, Německo).

### 4.3 Biologický materiál

K analýze byly použity dva vzorky močí od pacientů s prokázanou dědičnou metabolickou poruchou (deficit ADSL a OTC) a čtyři vzorky močí z externí kontroly kvality Proficiency testing, u nichž byla též předem zjištěna diagnóza (deficit CBS, GAMT, ACY I a AASS). Pro srovnání bylo použito pět kontrolních vzorků močí od dětí, které byly odeslány do Laboratoře dědičných metabolických (Fakultní nemocnice, Olomouc) s podezřením na DMP, ale u nichž byla DMP vyloučena.

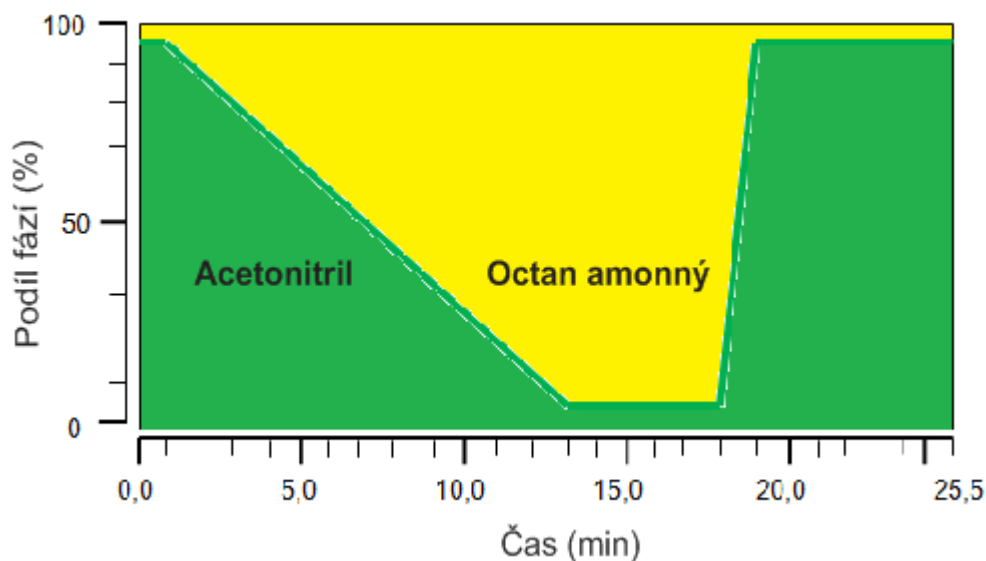
### 4.4 Příprava vzorků

Ve všech vzorcích močí byla předem na Oddělení klinické biochemie (Fakultní nemocnice, Olomouc) stanovena hladina kreatininu, podle kterého byly jednotlivé vzorky naředěny vodou (Tab. 4). Po naředění byl vzorek promíchán a centrifugován (5 min, 14 500 g). Supernatant byl přenesen do vialky a analyzován.

## 5 METODY

### 5.1 Vysokoučinná kapalinová chromatografie

Analýza byla provedena na přístroji UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA). Separace probíhala při teplotě 25 °C pomocí aminopropylové kolony Luna (Phenomenex, CA, USA) o délce 150 mm s průměrem částic 3 μm. Byla aplikována gradientová eluce (Obr. 9) při průtokové rychlosti 0,3 ml/min. Mobilní fáze A obsahovala octan amonný (20 mmol/l, pH 9,45) a mobilní fáze B acetonitril. Na začátku analýzy byl podíl mobilní fáze B 95 %, ten klesal lineárně po dobu 13 min na hodnotu 5% B, tento stav byl konstantní po dobu 5 min. Poté se v průběhu 1 min poměr mobilních fází vrátil k počátečním hodnotám (95 % B). Následně byla kolona ekvilibrována po dobu 6 min. Celková doba analýzy trvala 25,5 min. Objem nastříkovaného vzorku byl korelován s hladinou kreatininu a řaděním vzorku (Tab. 4).



Obr.9: Průběh gradientové eluce

Tab.4: Objemy nastříkovaných vzorků

Zkratka DMP	Kreatinin	Objem nástřiku (μl)	Ředění vzorku (moč:voda)
Deficit AASS	1,1	10	1:0,25
Deficit ACY1	6,7	3	1:2,00
Deficit CBS	6,1	3	1:2,00
Deficit ADSL	0,8	10	1:0,25
Deficit OTC	1,6	10	1:2,00
Deficit GAMT	3,3	6	1:2,00
Kontrola 1	1,8	10	1:2,00
Kontrola 2	3,0	6	1:2,00
Kontrola 3	1,0	10	1:0,25
Kontrola 4	14,8	1	1:2,00
Kontrola 5	23,7	1	1:2,00

## 5.2 Orbitrap ELITE

Hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením byla uskutečněna pomocí Orbitrap Elite (Thermo Scientific GmbH, MA, USA) s použitím vyhřívaného elektrospreje (HESI II). Nastavení iontového zdroje je uvedeno v Tab. 5. Analýzy probíhaly v pozitivním ionizačním módu ve třech různých skenovacích režimech. První režim zahrnoval měření pomocí FTMS v rozsahu m/z 50-400 při nastaveném rozlišení 60 000 FWHM. V druhém módu byl měřen stejný rozsah m/z pomocí iontové pasti. Ve třetím režimu bylo nastaveno automatické MS<sup>2</sup> předem definovaných hmot, které odpovídaly markerům jednotlivých dědičných metabolických poruch (Tab. 6). K fragmentaci byla použita kolizně indukované disociace při hodnotě normalizované kolizní energie 45 V.

Tab. 5: Parametry iontového zdroje

Parametr	Hodnota
Teplota sprejovací kapiláry	300,00 °C
Průtok "sheath" plynu	35 arb
Průtok pomocného plynu	10 arb
Průtok "sweep" plynu	5 arb
Sprejové napětí	3,00 kV
Teplota transferové kapiláry	350 °C

Tab. 6: Souhrn markerů pro jednotlivé DMP s identifikačními čísly v databázi METLIN (MID), sumárními vzorci, monoizotopovými molekulovými hmotnostmi (M) a hmotnostmi odpovídající protonovanému molekulárnímu iontu [M+H]<sup>+</sup>

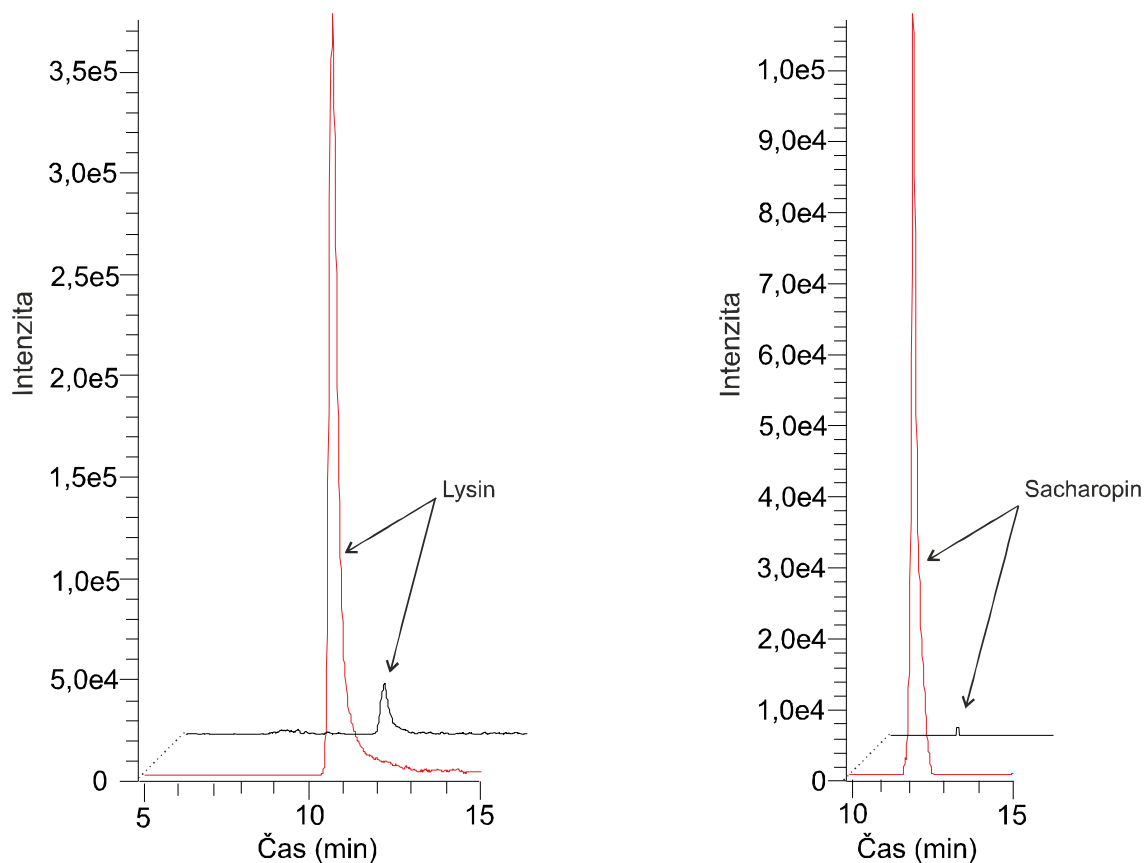
DMP	Marker	MID	Sumární vzorec	M	[M+H] <sup>+</sup>
Deficit	S-Ado	5867	C <sub>14</sub> H <sub>17</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub>	383,1077	384,1150
ADSL	SAICAr	-	C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub>	374,1074	375,1146
Deficit	3-Methylglutakonová k.	6584	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	144,0422	145,0495
GAMT	Kreatin	7	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	131,0694	132,0768
	Kreatinin	8	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O	113,0589	114,0662
	Guanidinacetát	9	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	117,0538	118,0611
Deficit	5-Oxoprolin	63632	C <sub>5</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	129,0425	130,0499
OTC	Glycin	20	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	75,0320	76,0393
	Lysin	25	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	146,1055	147,1128
	Orotová kyselina	318	C <sub>5</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	156,0171	157,0244
	Uracil	258	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	112,0272	113,0346
Deficit	N-acetylalanin	5733	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>3</sub>	131,0582	132,0655
ACY I	N-acetylamethionin	62466	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub> S	191,0616	192,0689
	N-acetylglutamát	3325	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>5</sub>	189,0637	190,0710
	N-acetylglycin	3244	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub>	117,0425	118,0499
	N-acetylisoleucin	43866	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	173,1051	174,1125
	N-acetylleucine	62470	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>3</sub>	173,1051	174,1125
	N-acetylserin	308	C <sub>5</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	147,0531	148,0604
	N-acetylthreonin	-	C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>4</sub>	161,0688	162,0761
	N-acetylvalin	62471	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	159,0895	160,0968
	N-Acetylglutamin	58344	C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	188,0797	189,0870
Deficit	Lysin	25	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	146,1055	147,1128
AASS	Sacharopin	383	C <sub>11</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	276,1321	277,1394
Deficit	Cystathionin	39	C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	222,0674	223,0747
CBS	Homocystein	3256	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>2</sub> S	135,0354	136,0427
	Homocystin	4189	C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>	268,0551	269,0624

## 6 VÝSLEDKY A DISKUSE

### 6.1 Detekce markerů na základě přesné hmoty

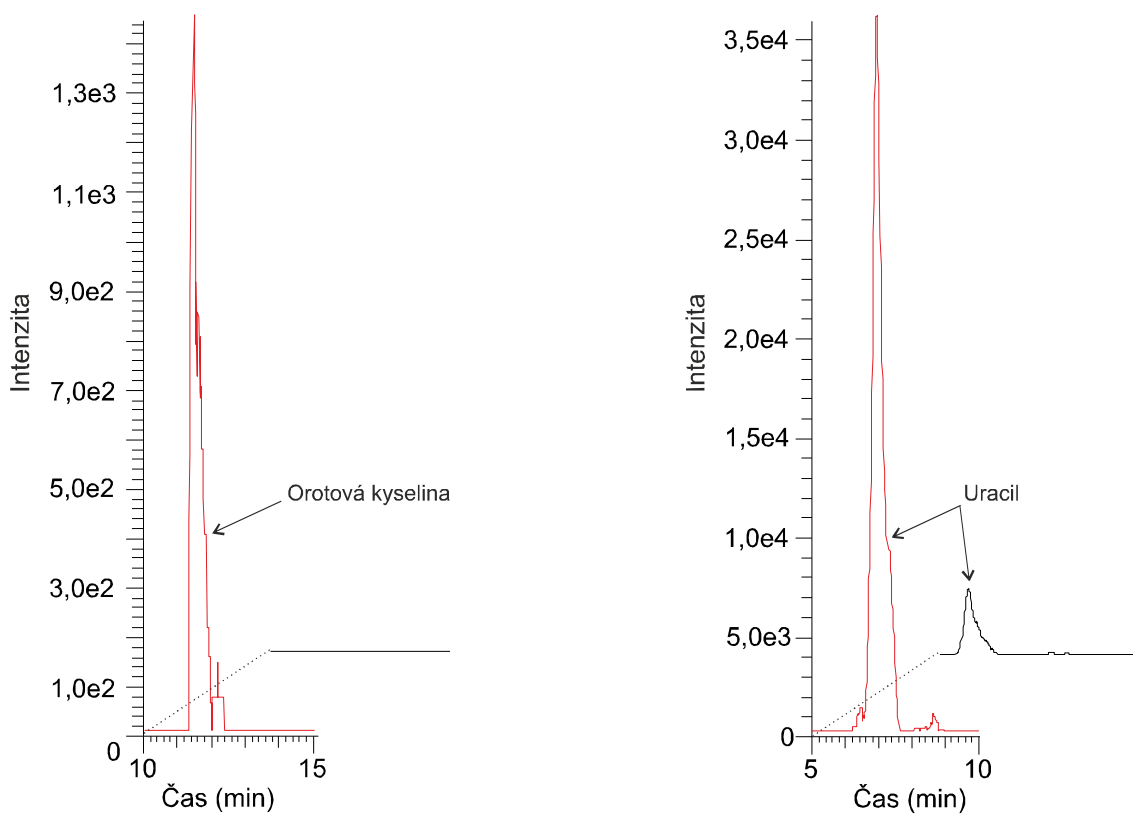
Nejdříve byly porovnávány vzorky s určitou DMP oproti kontrolním vzorkům. Byly extrahovány hmoty odpovídající  $[M+H]^+$  jednotlivých markerů (Tab. 6) při nastavení přesnosti 5 ppm. Intenzity kreatininu se ve všech vzorcích pohybovaly ve stejném řádu ( $10^7$ ).

Jako první je uveden deficit AASS (Obr. 10). Byly potvrzeny oba známé markery. Intenzity lysinu byly u této poruchy desetkrát vyšší ve srovnání s kontrolami, v případě sacharopinu to bylo až stonásobné zvýšení.



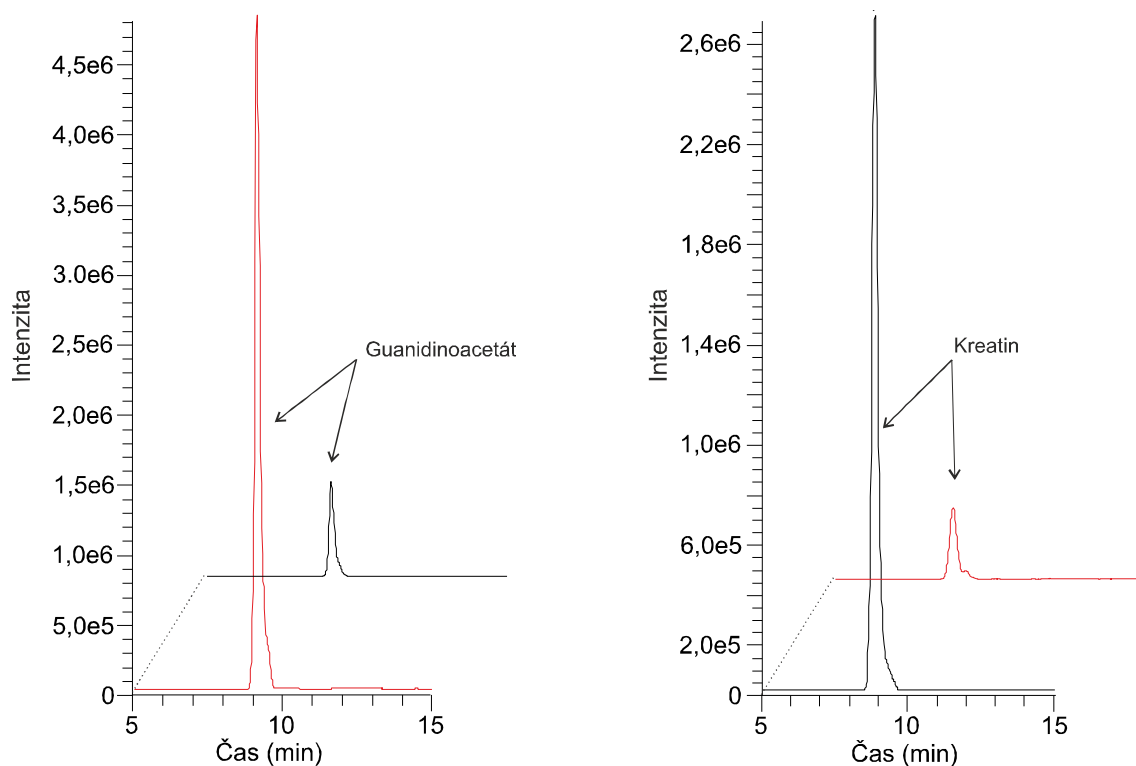
Obr.10: Srovnání vzorku moče od pacienta s deficitem AASS (červená linka) s kontrolním vzorkem 1 (černá linka), v chromatogramu byly extrahovány hmoty odpovídající  $[M+H]^+$  lysinu (vlevo) a sacharopinu (vpravo)

Další poruchou je deficit OTC (Obr. 11). U této poruchy byly potvrzeny dva markery tohoto onemocnění - kyselina orotová a uracil. Kyselina orotová nebyla v kontrolních vzorcích vůbec detekována, intenzita uracilu byla v kontrolách desetkrát nižší než v případě onemocnění. Ostatní markery tohoto onemocnění (Tab. 6) nebyly prokázány, nejspíše z důvodu následků léčby tohoto pacienta.



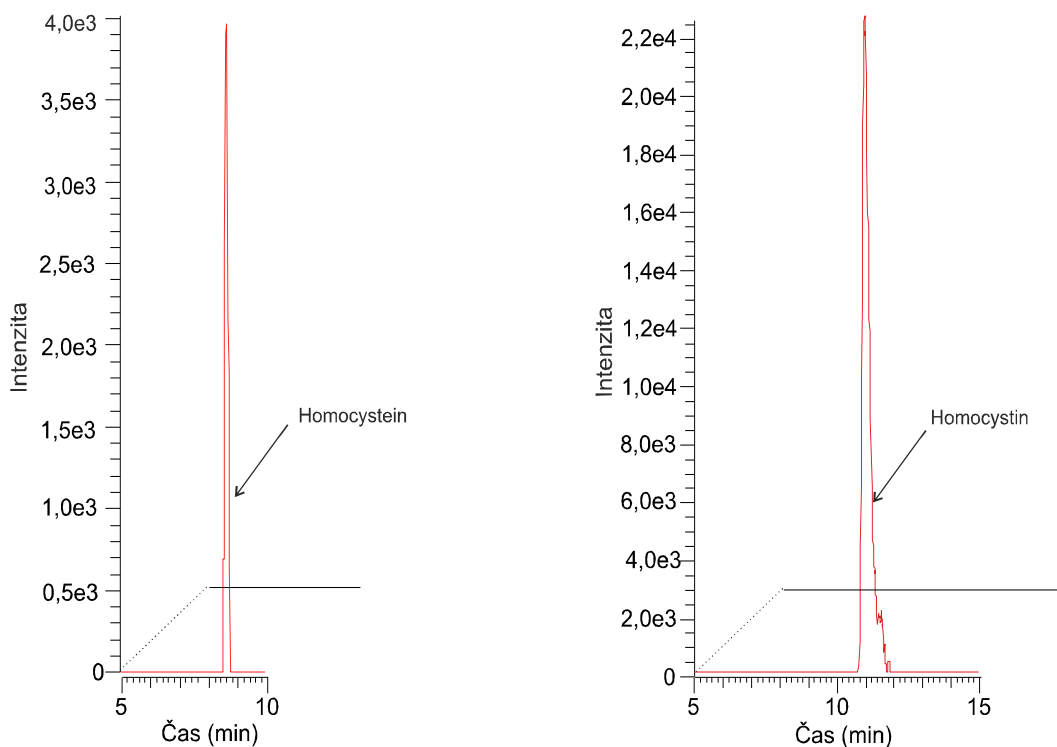
Obr.11: Srovnání vzorku moče od pacienta s deficitem OTC (červená linka) s kontrolním vzorkem 1 (černá linka), v chromatogramu byly extrahovány hmoty odpovídající  $[M+H]^+$  kyseliny orotové (vlevo) a uracilu (vpravo).

V případě deficitu GAMT bylo prokázáno zvýšení hladin guanidinoacetátu a snížení kreatinu (Obr. 12). Guanidinoacetát byl u pacienta přítomen v desetkrát vyšší intenzitě než v případě kontrolních vzorků, intenzita kreatinu byla naopak desetkrát snížena.



Obr. 12: Srovnání vzorku moče od pacienta s deficitem GAMT (červená linka) s kontrolním vzorkem 1 (černá linka), v chromatogramu byly extrahovány hmoty odpovídající  $[M+H]^+$  guanidinoacetátu (vlevo) a kreatinu (vpravo)

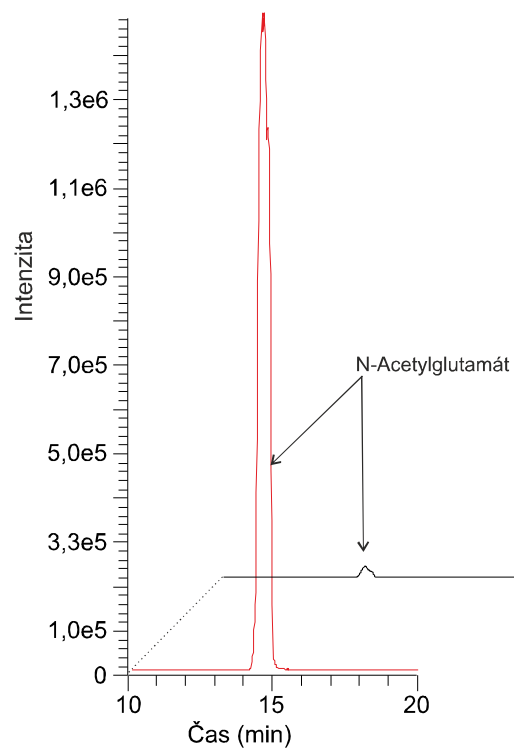
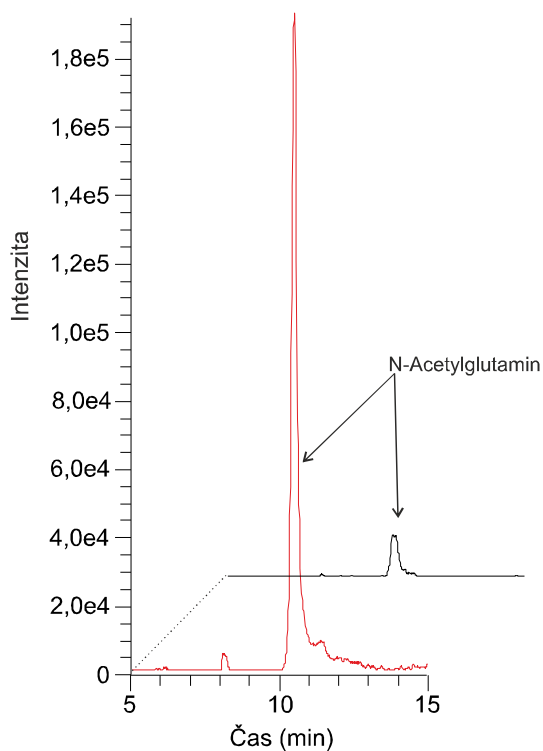
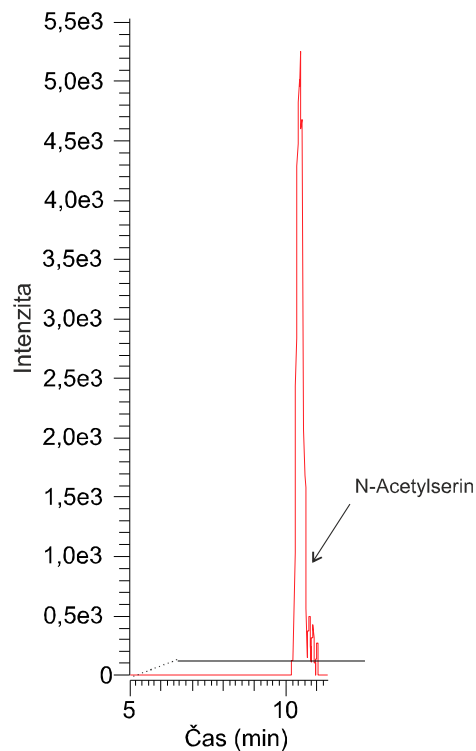
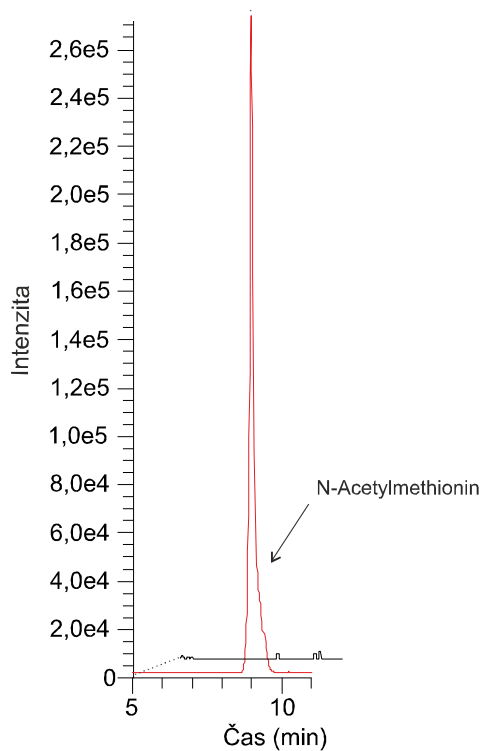
U vzorku moče od pacienta s deficitem CBS byla potvrzena akumulace homocysteinu a homocystinu (Obr. 13). U kontrolních vzorcích nebyly tyto látky vůbec detekovány.



Obr.13: Srovnání vzorku moče od pacienta s deficitem CBS (červená linka) s kontrolním vzorkem 1 (černá linka), v chromatogramu byly extrahovány hmoty odpovídající  $[M+H]^+$  homocysteinu (vlevo) a homocystinu (vpravo)

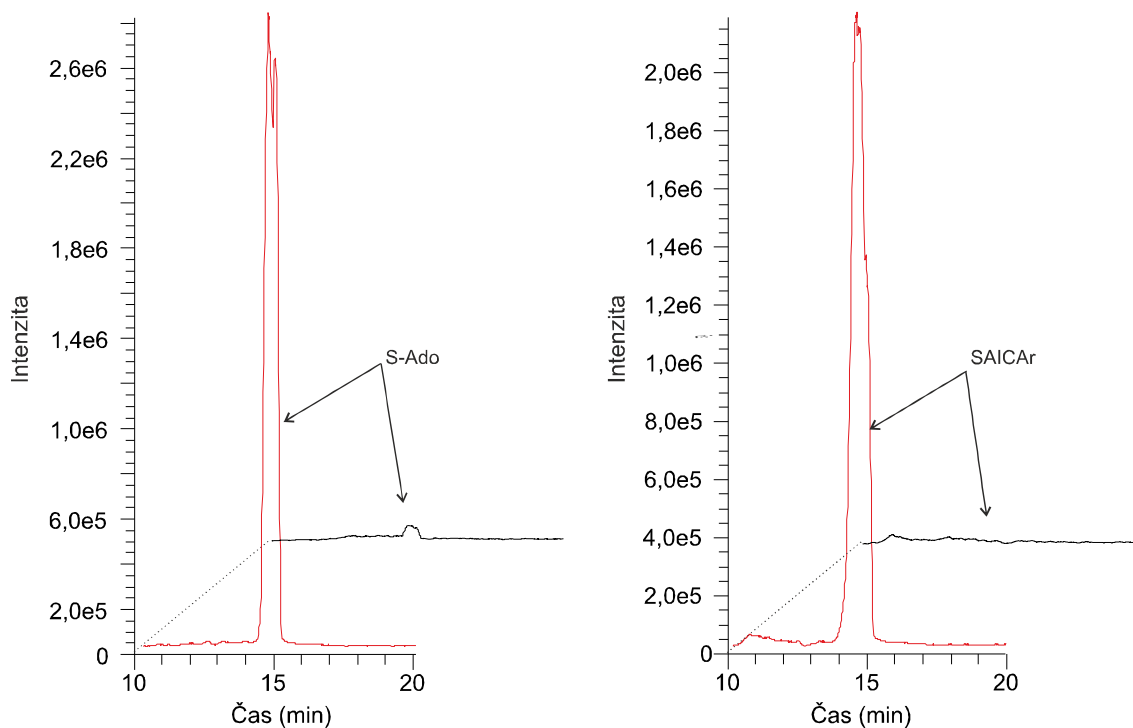
Další zkoumanou poruchou byl deficit ACY I. U tohoto onemocnění byla potvrzena akumulace acetylovaných aminokyselin, konkrétně N-acetylmethioninu, N-acetylserinu, N-acetylglutaminu a N-acetylglutamátu (Obr. 14). Ostatní analyzované acetylované aminokyseliny nebyly ve srovnání s kontrolními vzorkami průkazné.





Obr.14: Srovnání vzorku moče od pacienta s deficitem ACY1 (červená linka) s kontrolním vzorkem 1 (černá linka), v chromatogramu byly extrahovány hmoty odpovídající  $[M+H]^+$  acetylovaným aminokyselinám

Poslední zkoumanou poruchou byl deficit ADSL. Tato porucha je charakterizována akumulací dvou sukcinylpurinů SAICAr a S-Ado. Tyto látky poskytují mnohonásobně zvýšenou odezvu, což je dokumenováno na záznamu z iontové pasti (Obr. 15). Intenzita S-Ado byla stokrát snížena ve srovnání s kontrolami, SAICAr nebyl v kontrolních vzorcích detekován vůbec.



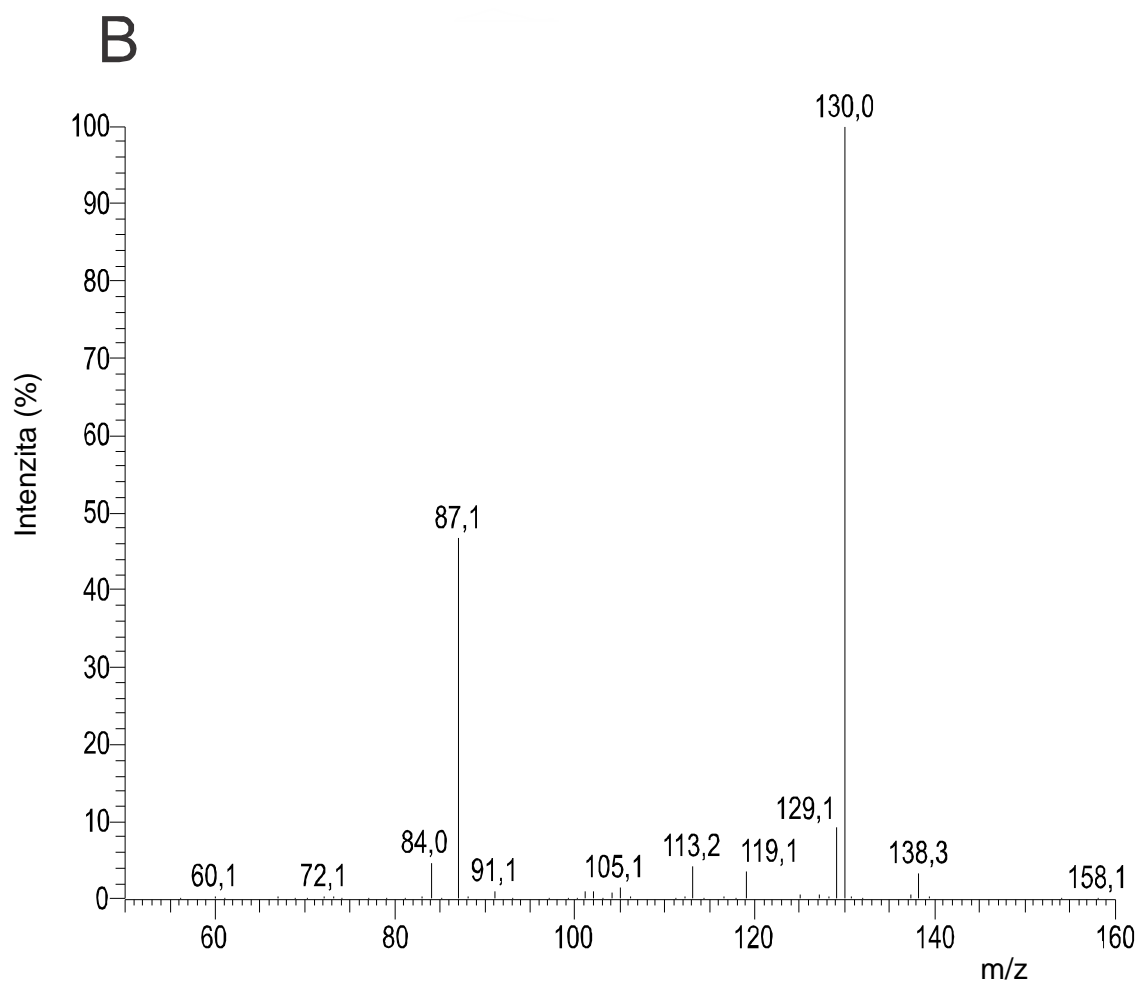
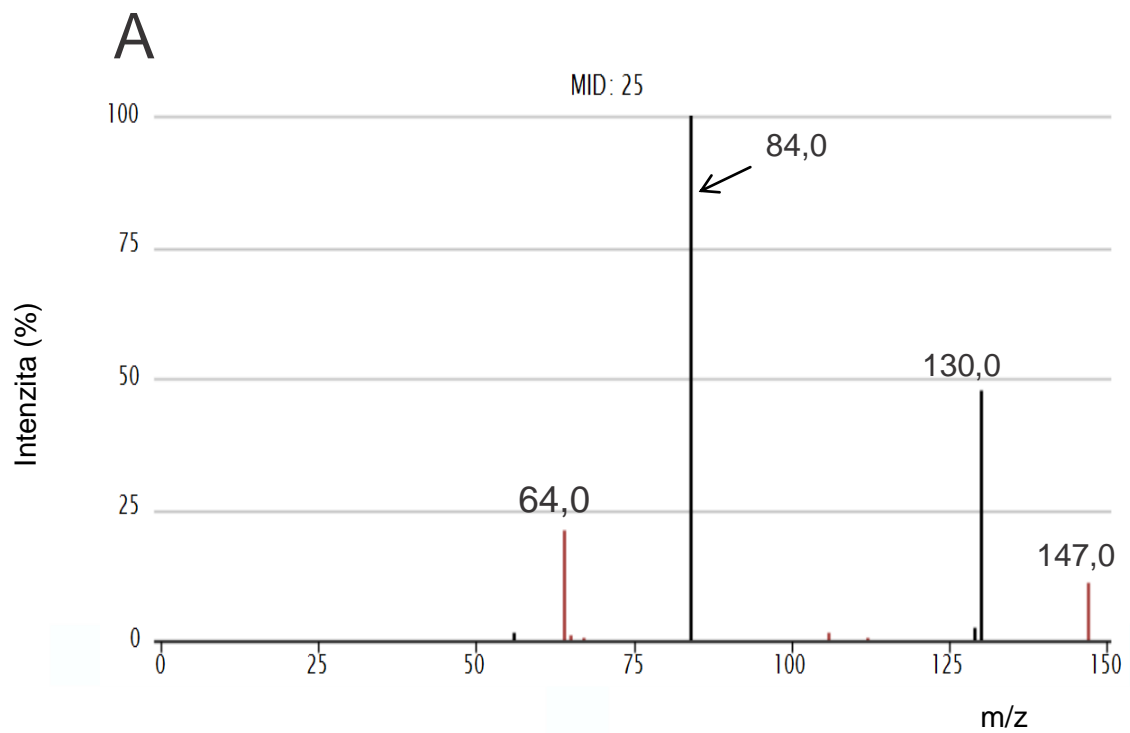
Obr.15: Srovnání vzorku moče od pacienta s deficitem ADSL (červená linka) s kontrolním vzorkem 1 (černá linka), v chromatogramu byly extrahovány hmoty odpovídající  $[M+H]^+$  S-Ado (vlevo) a SAICAr (vpravo)

## 6.2 Fragmentační spektra markerů

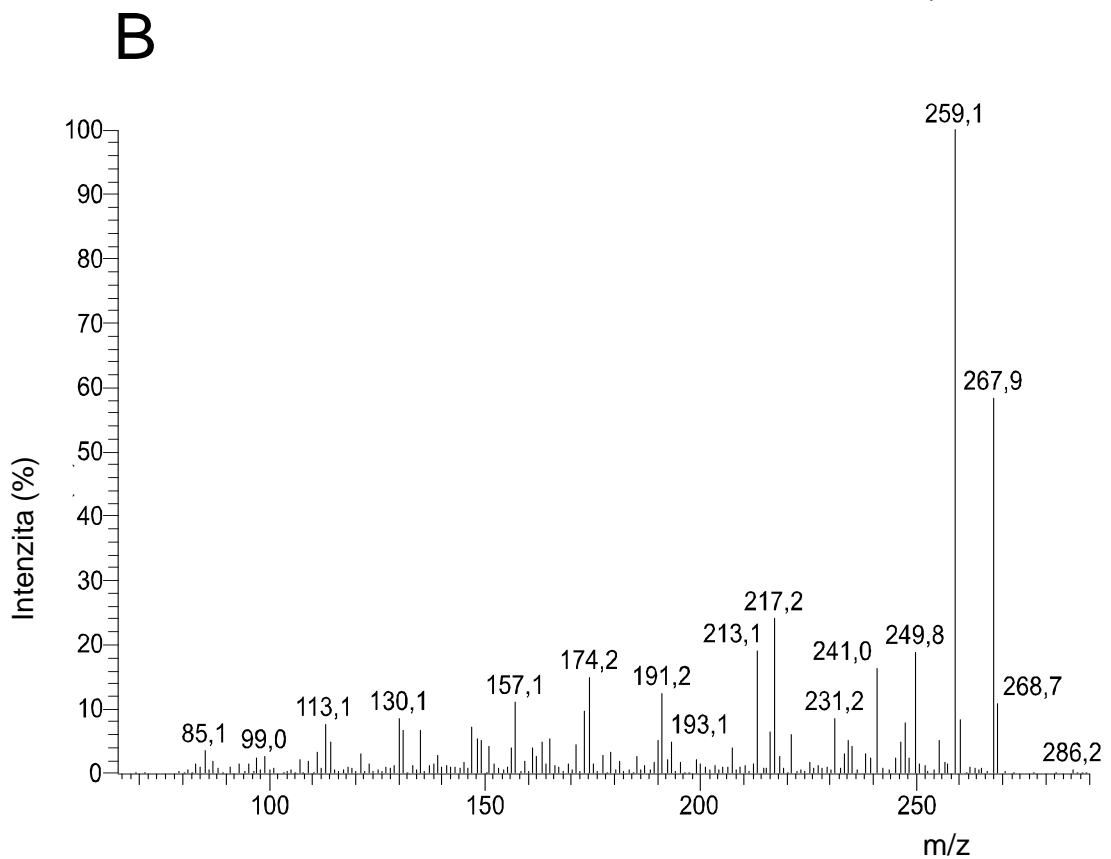
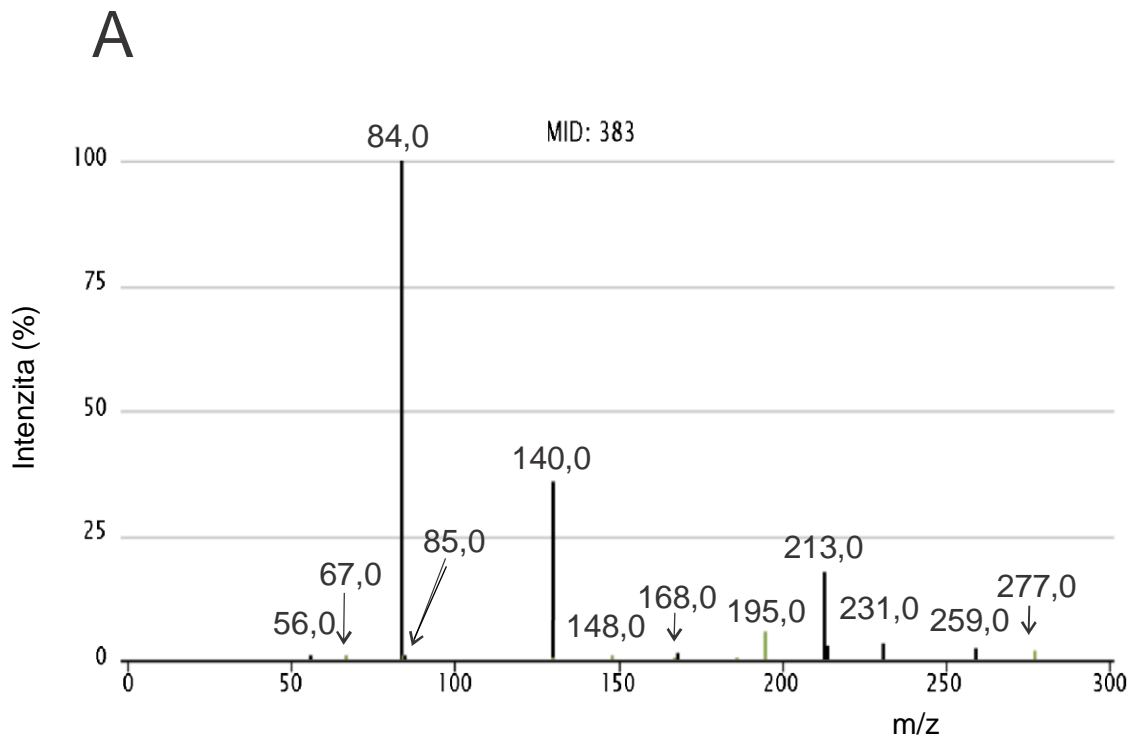
Dalším cílem bylo potvrdit identitu jednotlivých markerů na základě fragmentačního spektra ( $MS^2$ ), porovnat ji s internetovou databází METLIN (<http://metlin.scripps.edu>). Za tímto účelem bylo v metodě nastaveno automatické  $MS^2$  předem definovaných hmot, které odpovídaly markerům jednotlivých dědičných metabolických poruch (Tab. 6). Celkem bylo získáno 10 fragmentačních spekter, z toho 8 z nich mohlo být porovnáno se zmíněnou databází. Protože byla v metodě nastavena minimální intenzita pro provedení  $MS^2$  (hodnota 5000), nebylo provedeno automatické  $MS^2$  kyseliny orotové (intenzita 1450 u deficitu OTC) a homocysteinu (intenzita 4000 u deficitu CBS).

Na Obr. 16 B je ukázáno fragmentační spektrum lysinu, které bylo získáno ze vzorku moče od pacienta s deficitem AASS. Porovnáním s databází METLIN (Obr. 16 A) bylo zjištěno, že společnými fragmenty byly s  $m/z$  84 a 130, látka byla tudíž potvrzena. Ze vzorku moče od pacienta s deficitem AASS bylo též získáno fragmentační spektrum sacharopinu (Obr. 17 B). Spektrum bylo též porovnáváno s databází METLIN (Obr. 17 A). Sacharopin byl potvrzen na základě fragmentů s  $m/z$  85, 213, 231 a 259.

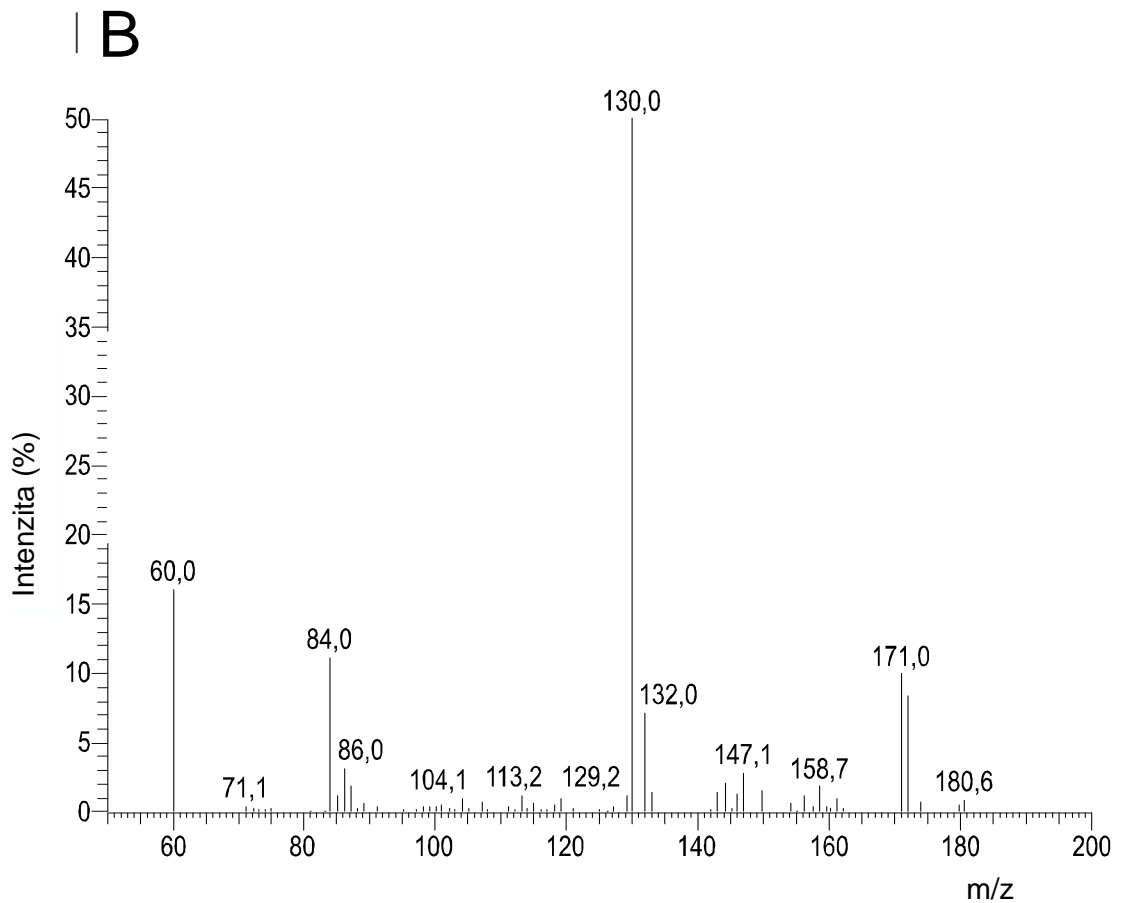
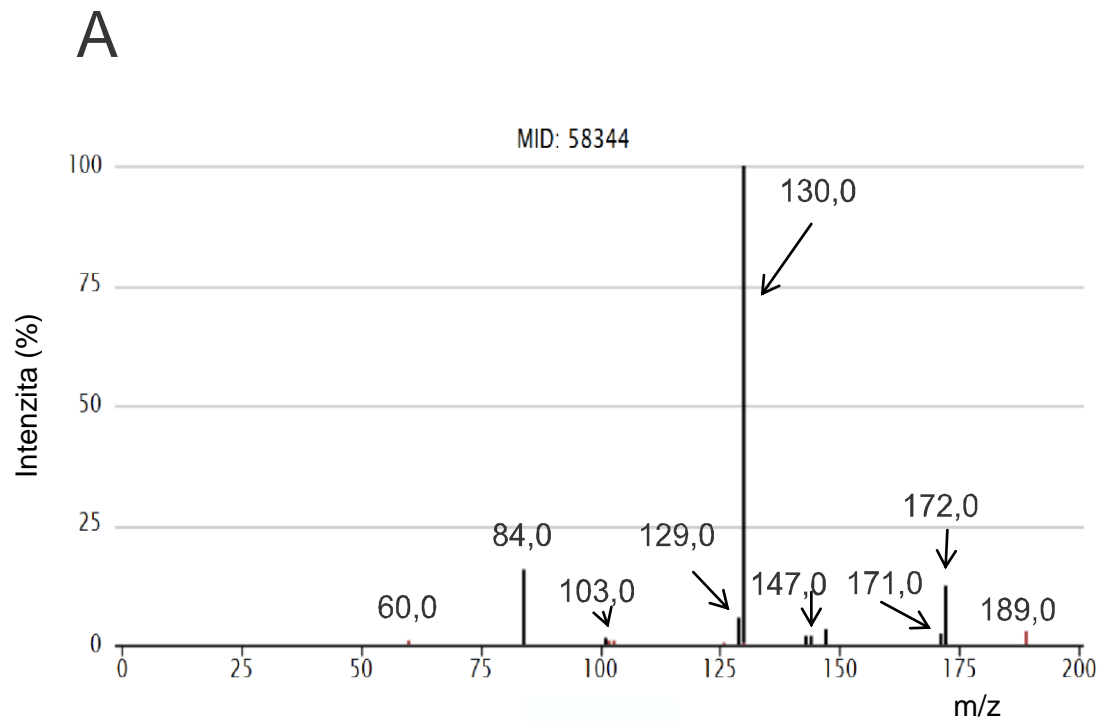
Další skupinou látek byly acetylované aminokyseliny, jejichž fragmentační spektra byla získána ze vzorku moče od pacienta s deficitem ACY I. Jako první je uvedeno fragmentační spektrum N-acetylglutaminu (Obr. 18B). Identita této látky byla opět potvrzena na základě databáze METLIN (Obr. 18 A), společnými fragmenty byly s  $m/z$  60, 84, 129, 130, 147 a 171. Na Obr. 19 B je dále ukázáno fragmentační spektrum N-acetylmethioninu. Společnými fragmenty s databází METLIN (Obr. 19 A) byly fragmenty s  $m/z$  132, 146, 174 a 192. Další látkou byl N-acetylglutamát. Tato látka byla též potvrzena porovnáním fragmentačních spekter (Obr. 20 A a B), společnými fragmenty byly s  $m/z$  130, 148, 172 a 190.



Obr. 16: Fragmentační spektrum lysinu z databáze METLIN (A) a získané měření vzorku moče od pacienta s deficitem AASS (B)

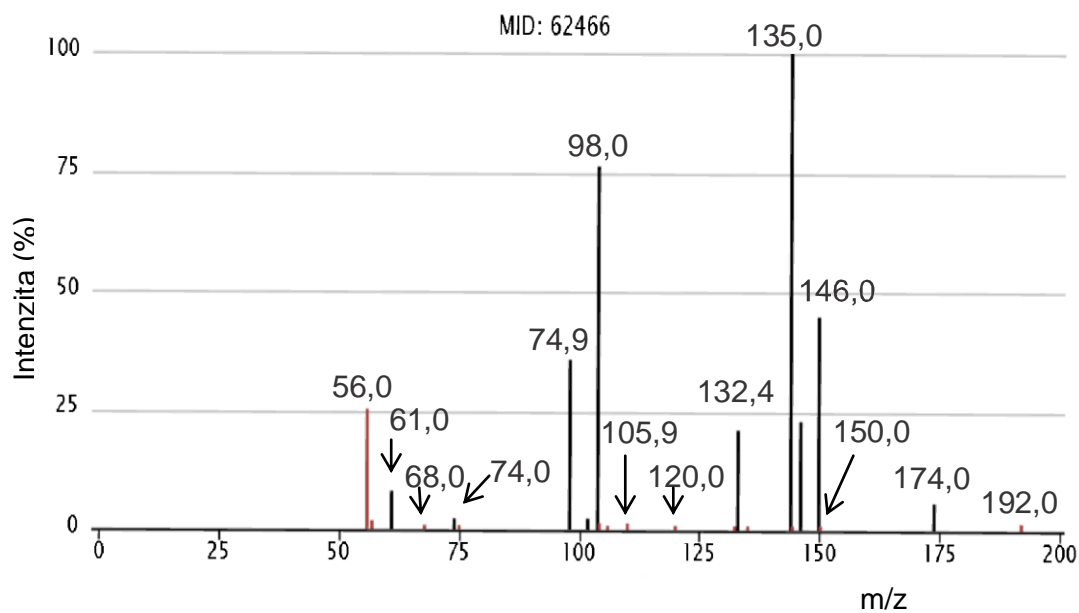


Obr. 17: Fragmentační spektrum sacharopinu z databáze METLIN (A) a získané měření vzorku moče od pacienta s deficitem AASS (B)

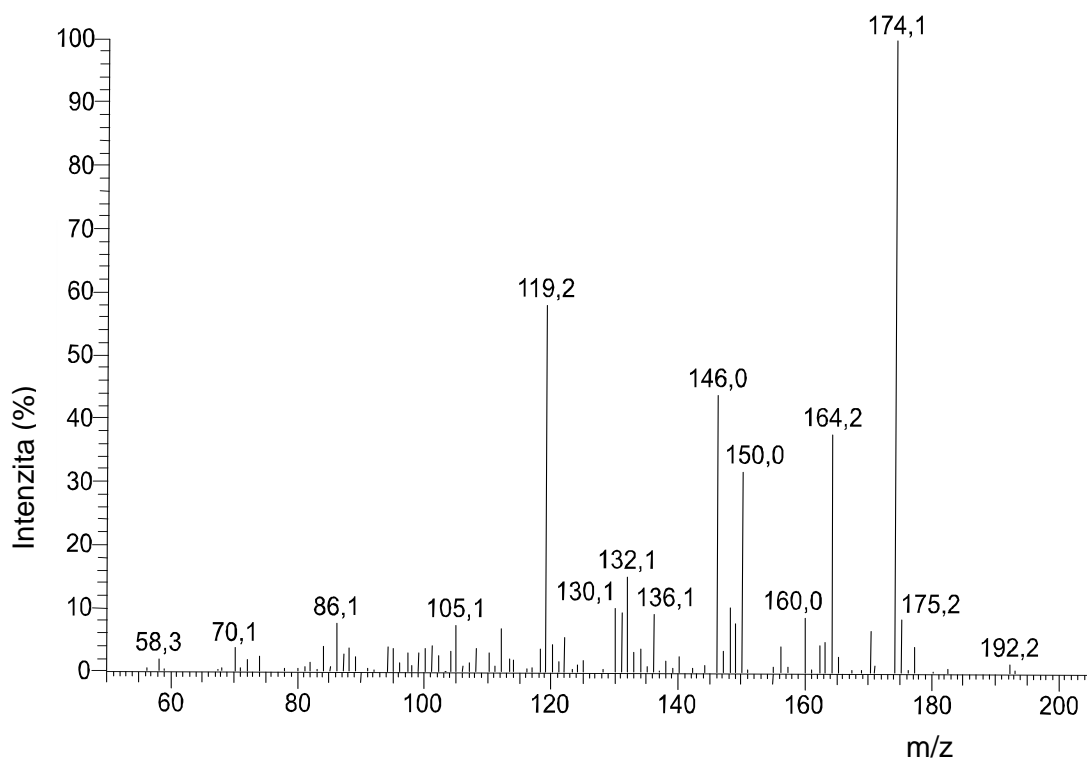


Obr. 18: Fragmentační spektrum N-acetylglutaminu z databáze METLIN (A) a získané měřením vzorku moče od pacienta s deficitem ACY I (B)

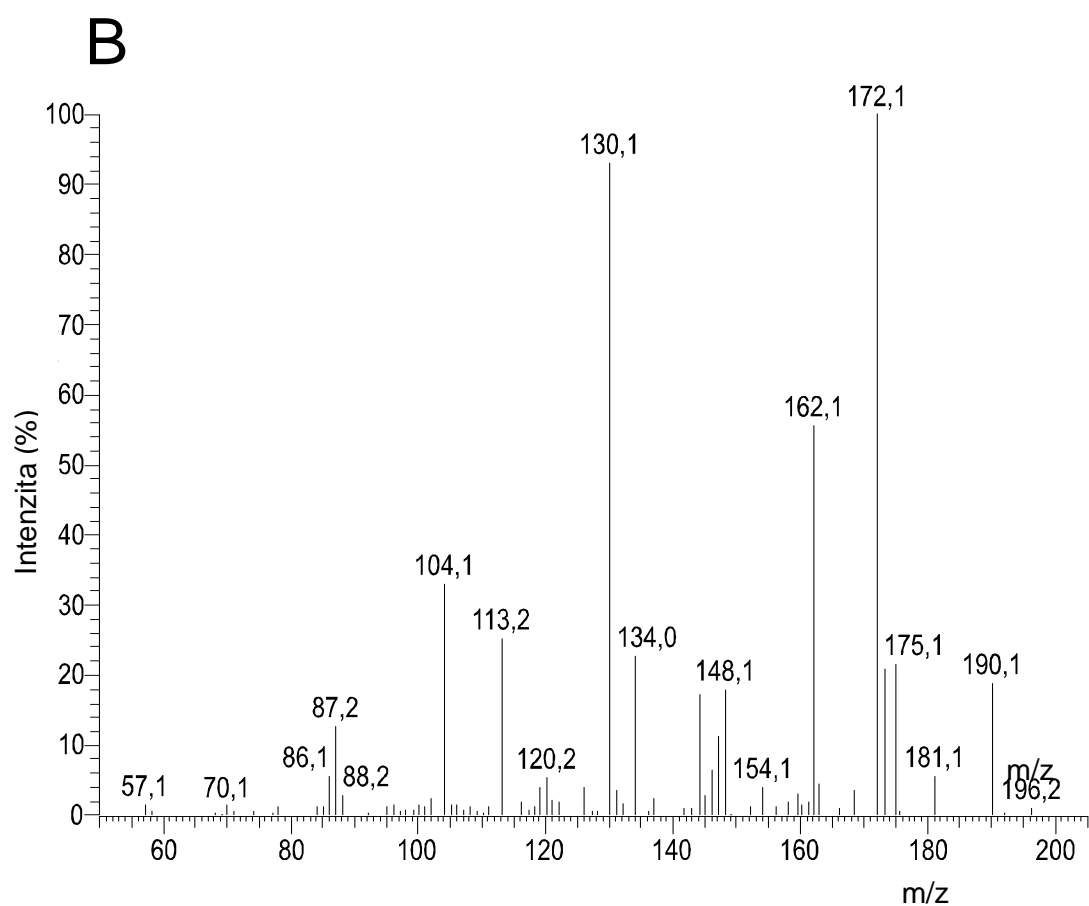
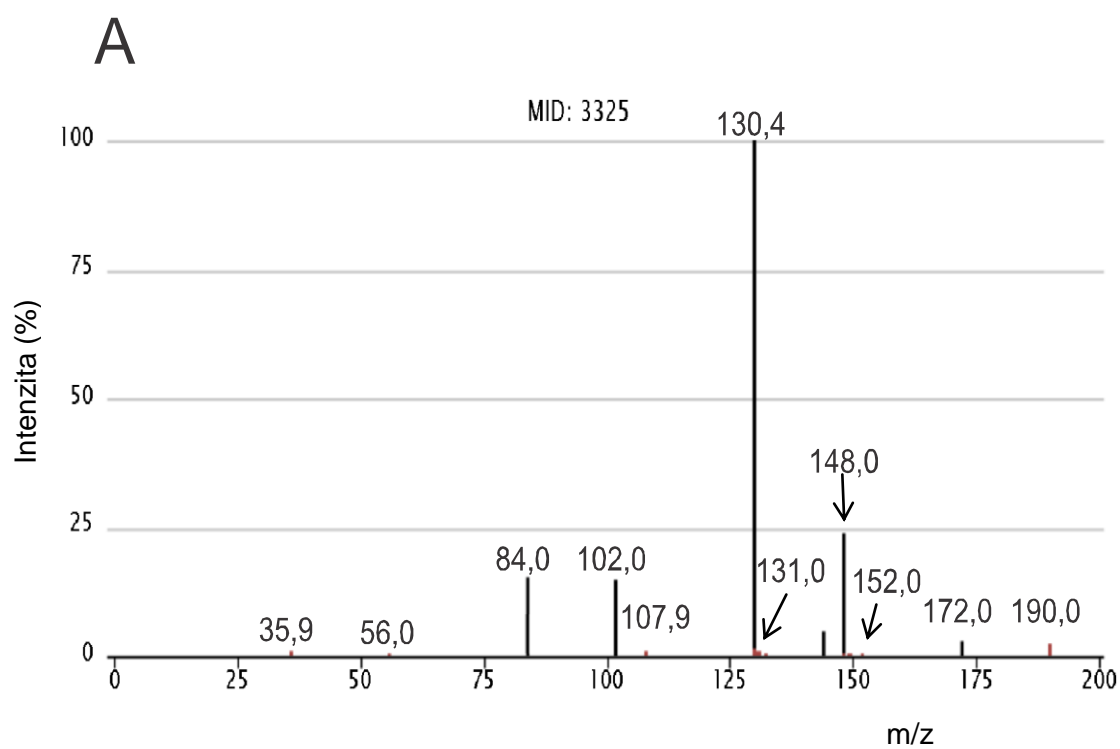
# A



# B



Obr.19: Fragmentační spektrum N-acetylmethioninu z databáze METLIN (A) a získané měření vzorku moče od pacienta s deficitem ACY I (B)



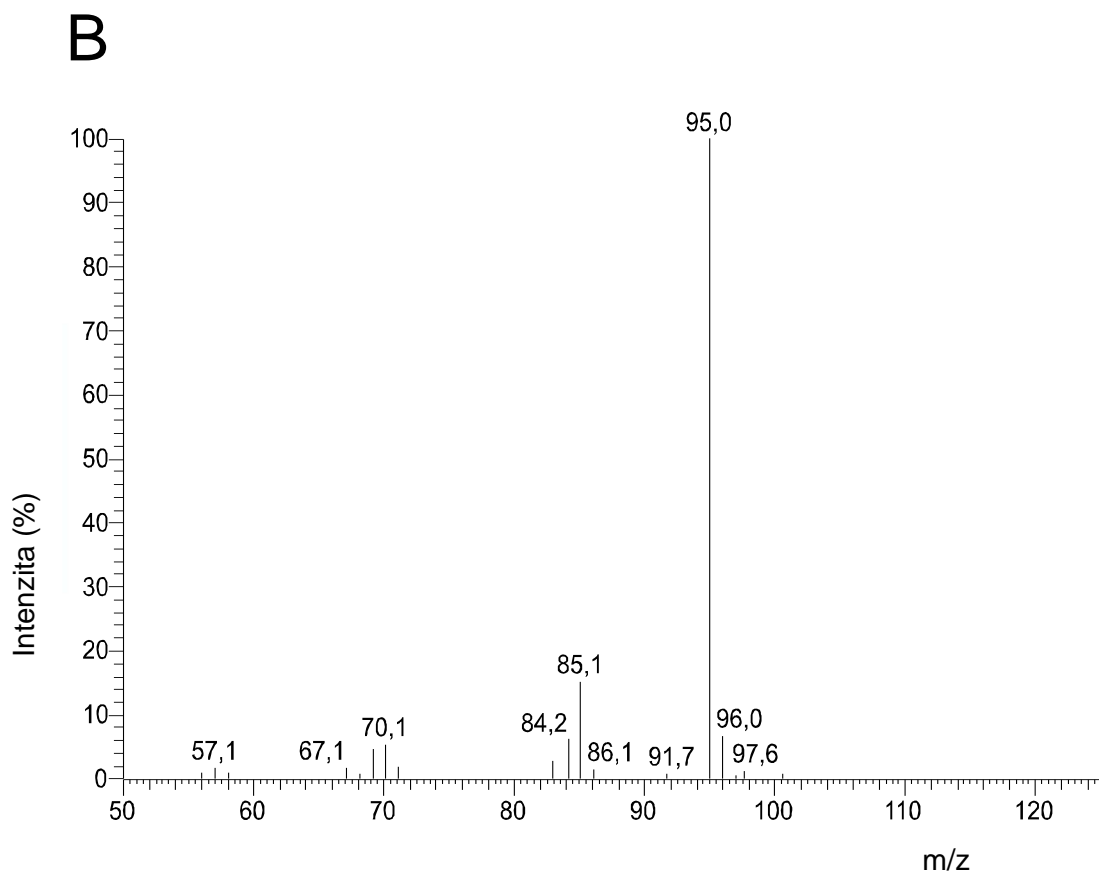
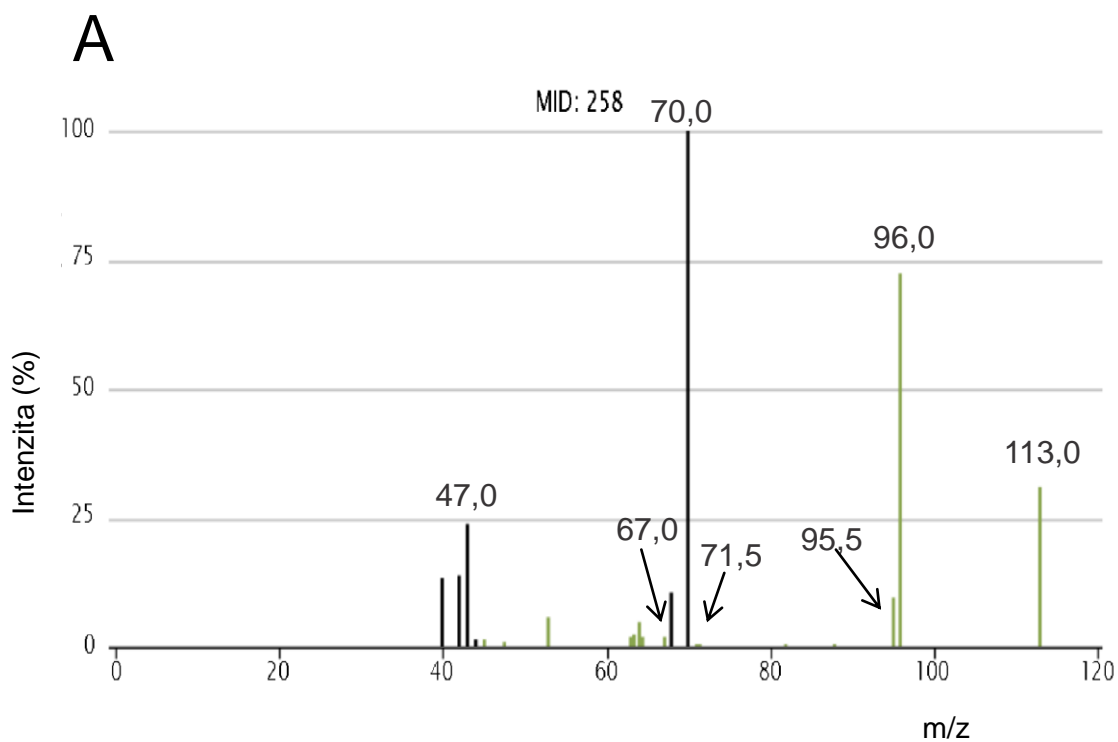
Obr.20: Fragmentační spektrum N-acetylglutamátu z databáze METLIN (A) a získané měření vzorku moče od pacienta s deficitem ACY I (B)



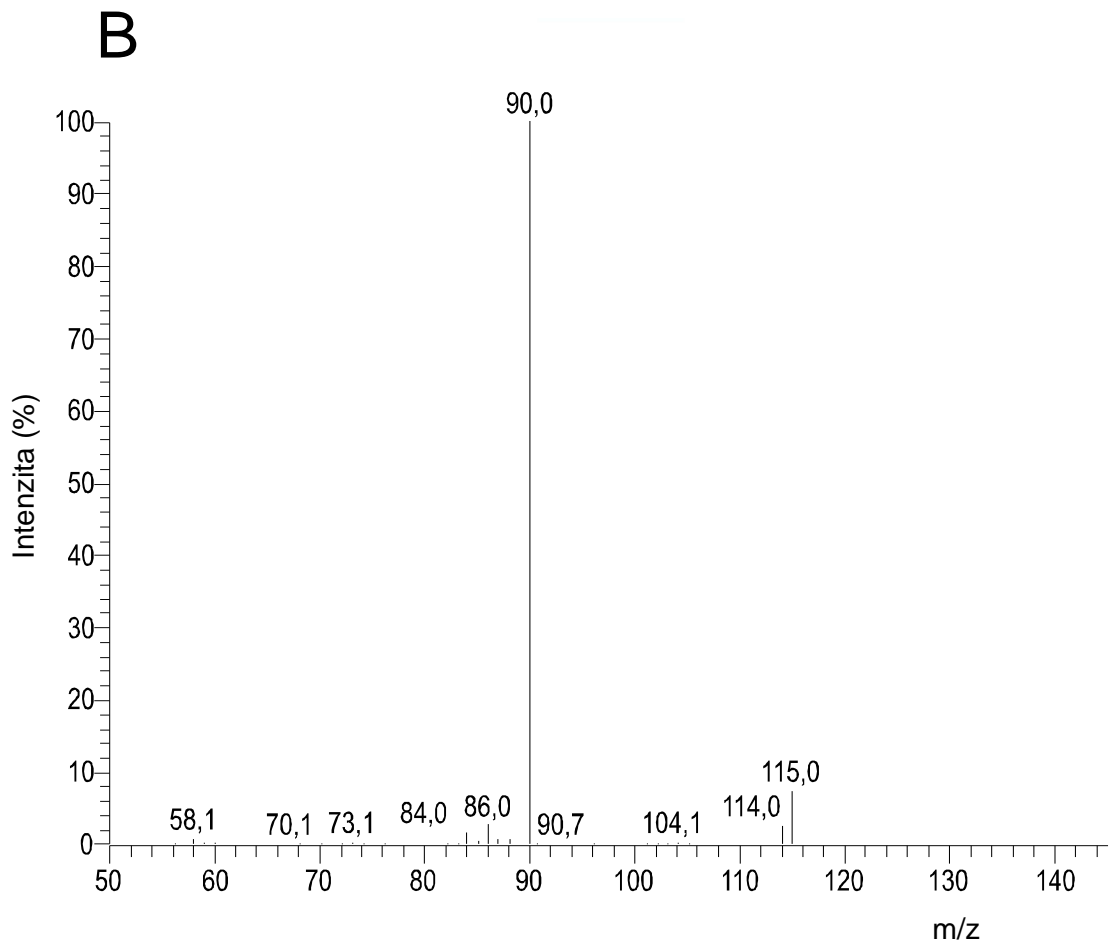
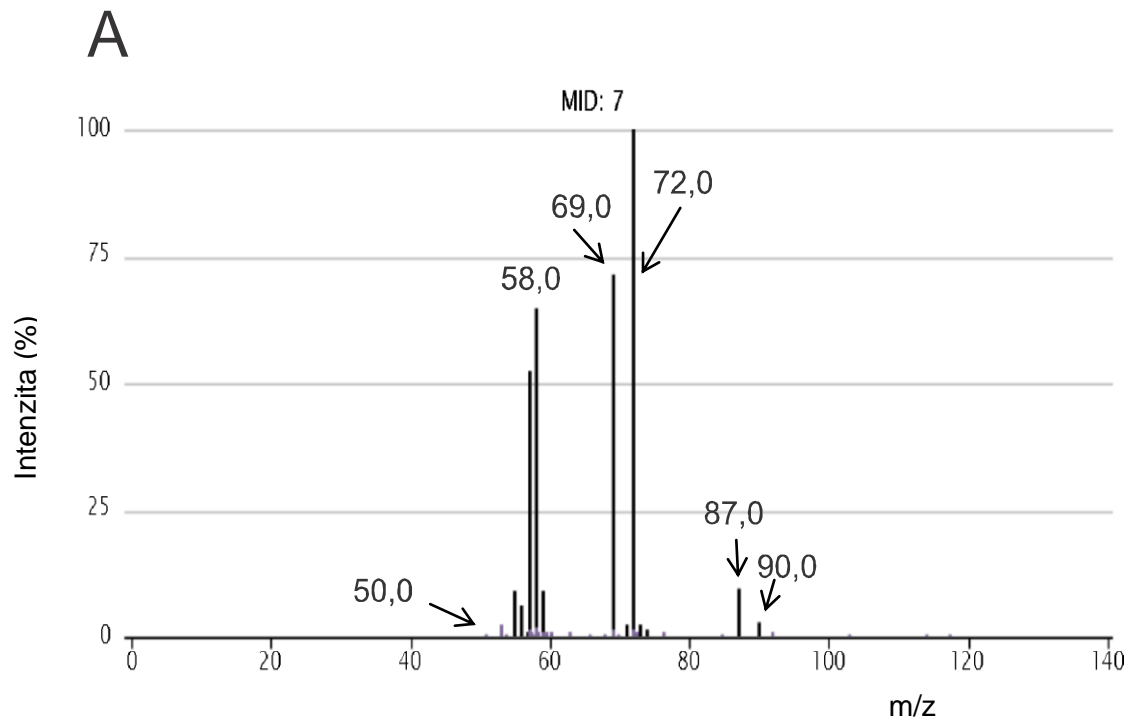
Další zkoumanou poruchou byl deficit OTC, kde byly pozorovány zvýšené hladiny kyseliny orotové a uracilu. Jak bylo zmíněno výše, fragmentační spektrum kyseliny orotové nebylo automaticky provedeno z důvodu nastavení limitu. Na Obr. 22 B je pak ukázáno získané fragmentační spektrum uracilu. Porovnáním s databází METLIN (Obr. 22 A) byly zjištěny společné fragmenty s  $m/z$  67, 95 a 96, identita uracila byla tudíž potvrzena.

Analýzou vzorku moče od pacienta s deficitem GAMT byla získána fragmentační spektra kreatinu (Obr. 23B) a GAA (Obr. 24B), identita obou látek byla opět potvrzena na základě porovnáním s databází METLIN (Obr. 23A a 24A). V případě kreatinu byly zjištěny společné fragmenty s  $m/z$  58 a 90, u GAA to byly fragmenty s  $m/z$  55, 59, 72, 73, 100 a 101.

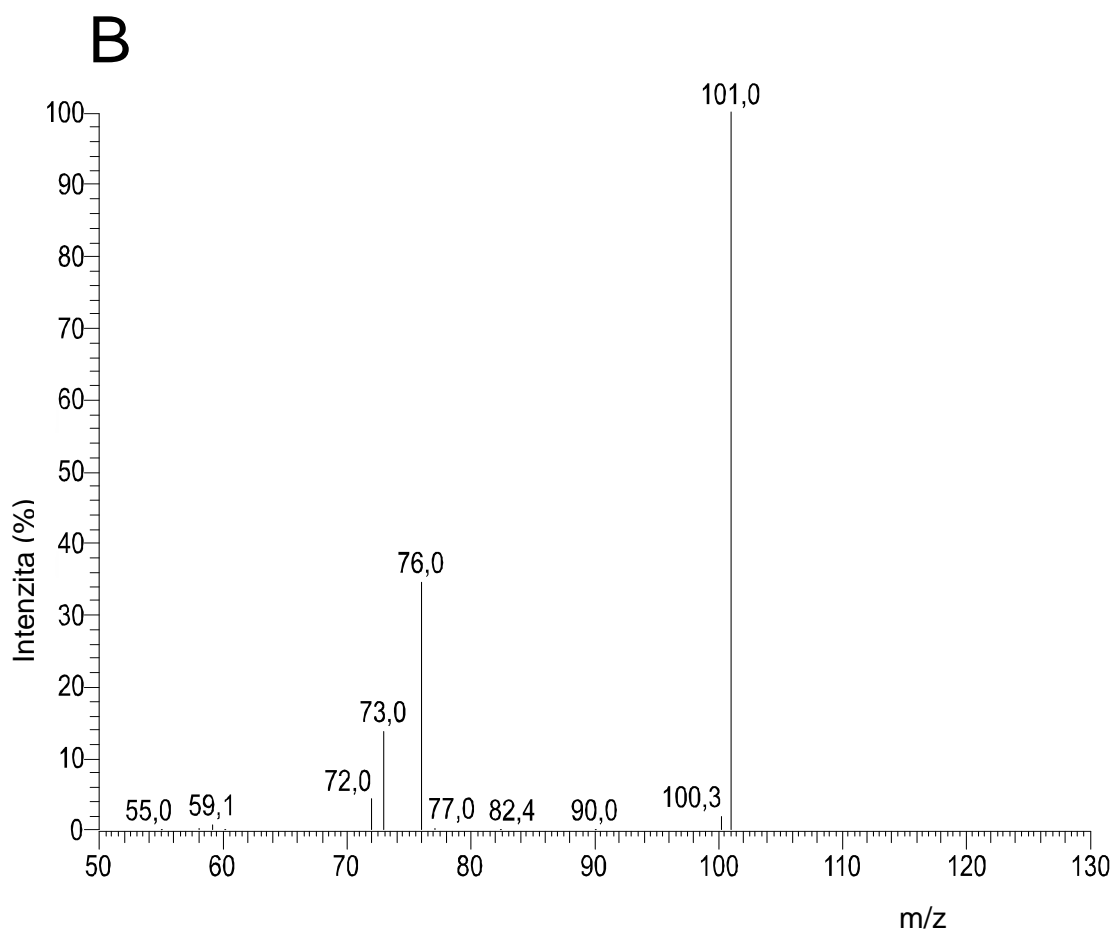
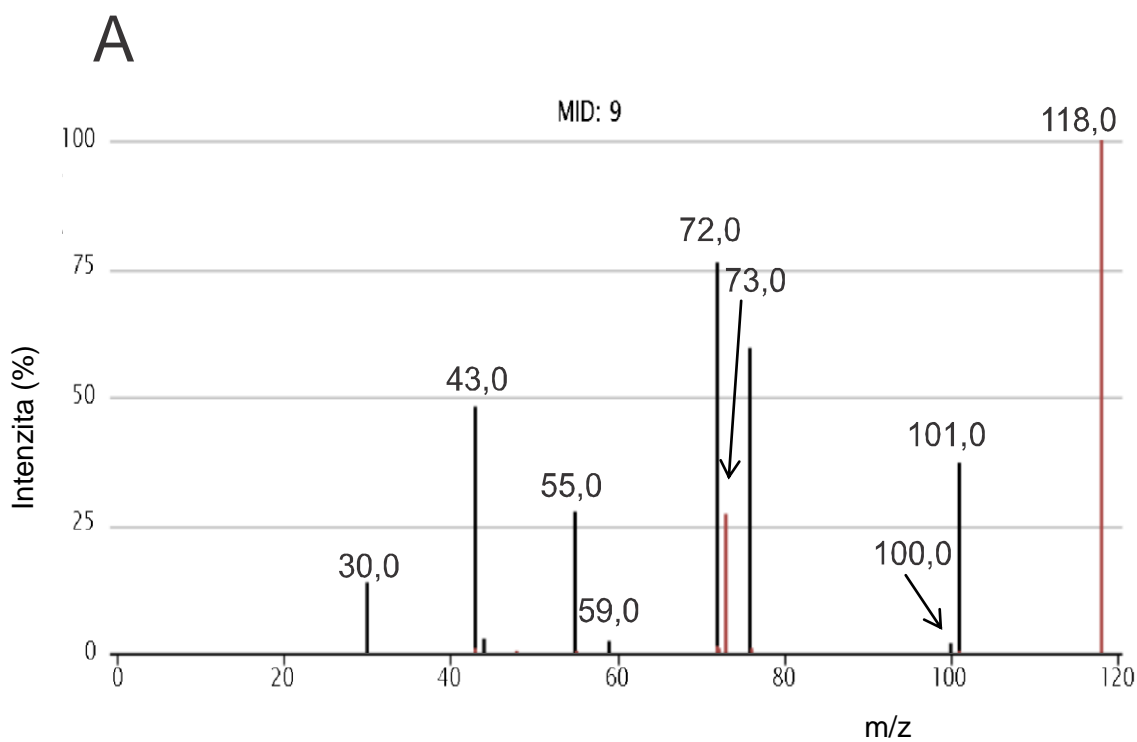
Jako poslední je ukázáno fragmentační spektrum N-Acetylserinu (Obr. 25A), které bylo získáno ze vzorku moče od pacienta s deficitem ACY I, a homocystinu (Obr. 25 B) získané ze vzorku moče od pacienta s deficitem CBS. V databázi METLIN nebyly hmotnostní spektra těchto látek k dispozici, proto s ní nemohly být porovnávány.



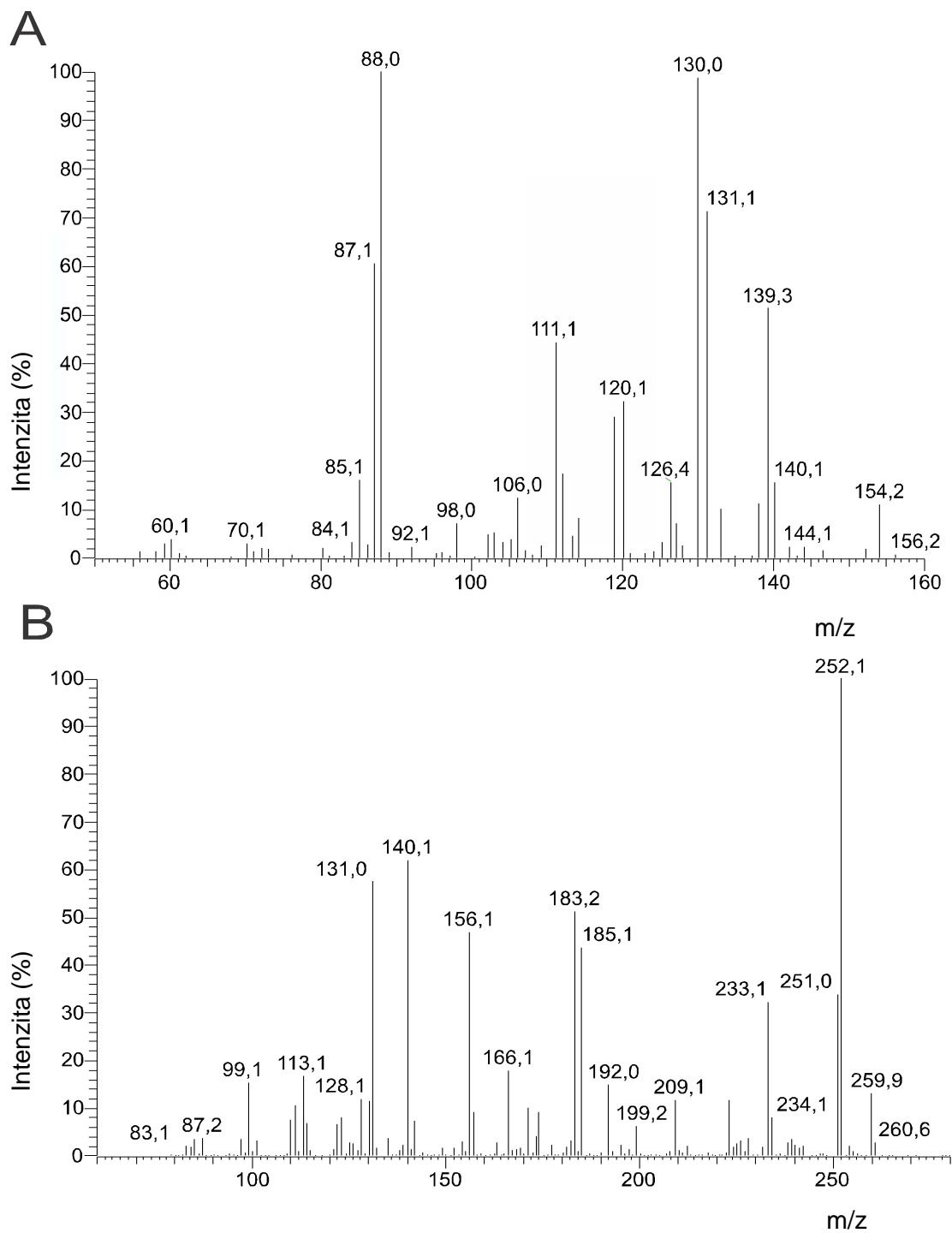
Obr.22: Fragmentační spektrum uracilu z databáze METLIN (A) a získané měřením vzorku moče od pacienta s deficitem OTC (B)



Obr.23: Fragmentační spektrum kreatinu z databáze METLIN (A) a získané měření vzorku moče od pacienta s deficitem GAMT (B)



Obr. 24: Fragmentační spektrum GAA z databáze METLIN (A) a získané měření vzorku moče od pacienta s deficitem GAMT



Obr. 25: Fragmentační spektrum N-Acetylserinu získané měřením vzorku moče od pacienta s deficitem ACY I (A) a homocystinu získané měřením vzorku moče od pacienta s deficitem CBS (B)

## 7 ZÁVĚR

V teoretické části této bakalářské práce byla zpracována rešerše na téma metabolomika a DMP, byly shrnuty poznatky o obecných příčinách vzniku DMP, laboratorní diagnostice a klinických projevech. Detailněji bylo popsáno šest vybraných DMP, jimiž se dále zabývalo v praktické části.

Praktická část se věnovala uplatněním hmotnostní spektrometrie s vysokým rozlišením pro diagnostiku dědičných metabolických poruch. Vzorky močí byly analyzovány pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie ve spojení s Orbitrapem. Byly porovnávány vzorky močí od pacientů s vybranými dědičnými metabolickými poruchy proti kontrolním vzorkům močí. Známé markery jednotlivých DMP byly potvrzeny na základě přesné hmoty a získáním jejich fragmentačních spekter.

## 8 LITERATURA

- Anadiotis G., Ierardi-Curto L., Kaplan P.B., Berry G.T. (2001), Ornithine transcarbamylase deficiency and pankreatitis, *J Pediatr* **1**, 123-4
- Clarke J.T.R. (2002), *A Clinical Guide to Inherited Metabolic Diseases*, 2 nd edition, Cambridge University Press, pp 1-9
- De Hoffmann E., Stroobant V. (2008), *Mass spectrometry – Principles and applications* (3rd edition), Wiley, Chichester, pp 86 – 150
- De Lucca M., Casique L. (2004), Characterization of cystathionine beta-synthase gene mutations in homocystinuric Venezuelan patients: identification of one novel mutation in exon 6, *Mol Genet Metab.***3**, 209-15
- Dettmer K., Hammock B.D. (2004), Metabolomics – A new exciting field within the "omics" sciences, *Environ Health Perspect* **112**, 396 – 7
- Dole M., Mack L., Hines R.L. (1968), MOLECULAR BEAMS OF MACROIONS, *JOURNAL OF CHEMICAL PHYSICS* **49**, 2240-&
- Dunn W.B., Ellis D.I. (2005), Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies, *Trends in Analytical Chemistry* **24**, 4
- Engelke UF, Tassini M, Hayek J, de Vries M, Bilos A, Vivi A, Valensin G, Buoni S, Zannolli R, Brussel W, Kremer B, Salomons GS, Veendrick-Meekes MJ, Kluijtmans LA, Morava E, Wevers RA. (2009), Guanidinoacetate methyltransferase (GAMT) deficiency diagnosed by proton NMR spectroscopy of body fluids, *NMR Biomed* **22**, 538-44
- Fernandes J., Saudubray J.M., Berghe G., Walter J.H. (2008), Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch, Triton, Praha, pp 39 – 40
- Fowler B. (1985), Recent advances in the mechanism of pyridoxine-responsive disorders, *J Inherit Metab Dis.* **8**, 76-83

- Friedecký D., Lemr K. (2012), Úvod do hmotnostní spektrometrie, *Klin. Biochem. Metab.* **20**, 157 – 157
- Fryčák P., Lemr K., Adam T., Hušková R. (2003), Diagnostika vybraných dědičných metabolických poruch tandemovou hmotnostní spektrometrií s využitím moderních ionizačních technik, *Chem. Listy* **97**, 93 – 100
- Gitiaux C., Ceballos-Picot I., Marie S., Valayannopoulos V., Rio M., Verrieres S., Benoist J.F., Vincent M.F., Desguerre I., Bahi-Buisson N. (2009), Misleading behavioural phenotype with adenylosuccinate lyase deficiency, *Eur J Hum Genet.* **1**, 133-6
- Gordon N. (2010), Guanidinoacetate methyltransferase deficiency (GAMT), *Brain Dev.* **32**, 79-81
- Han X., Gross R.W. (2005), Shotgun lipidomics: Electrospray ionization mass spectrometric analysis and quantitation of cellular lipidomes directly from crude extracts of biological samples, *Mass Spectrom Rev.* **24**, 367 – 412
- Hoffmann G.F., Nyhan W.L., Zschocke J., Kahler S.G., Mayatepek E. (2006), Dědičné metabolické poruchy, Grada publishing, Praha, pp 41 – 120
- Holčapek M., Jandera P. (1998), Spojení kapalinové chromatografie a hmotnostní spektrometrie (HPLC/MS), *Chem. Listy* **92**, 278 – 286
- Hu Q., Noll R.J., Li H., Makarov A., Hardman M, Cooks G.R. (2005), The Orbitrap: A new mass spectrometer, *J mass Spectrom* **40**, 430 – 43
- Jaroslav Racek et al. (1999), *Klinická biochemie*, Galén, Praha, pp 23 – 260
- Makarov A. (2000), Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis, *Anal. Chem.* **72**, 1156 – 1162
- Musilová J., Glatz Z. (2011), Metabolomika – základní pojmy, strategie a metodologie, *Chem. Listy* **105**, 745 – 751



- Nicholson J.K., Connely J., Lindon J.C., Holmes E. (2002), Metabonomics: A platform for studying drug toxicity and gene function, *Nat. Rev Drug Discov.* **1**, 153 – 61
- Nussbaum R.L., McInnes R.R., Willard H.F. (2004), *Klinická genetika*, Triton, Praha, pp 86 – 96
- Oliver S.G., Winson M.K., Kell D.B., Baganz F. (1998), Systematic functional analysis of the yeast genome, *Trends. Biotechnol.* **16**, 378 – 8
- Olsen J.V., de Godoy L.M., Li G., Macek B., Mortensen P., Pesch R., Makarov A., Lange O., Horning S., Mann M. (2005), Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap, *Mol Cell Proteomics* **4**, 2012 – 21
- Opekar F., Jelínek I., Rychlovský P., Plizák Z. (2003), *Základní analytická chemie*, Nakladatelství Karolinum, Praha, p 165-170
- Pembrey M.E., Old J.M., Leonard J.V., Rodeck C.H., Warren R., Davies K.E. (1985), Prenatal diagnosis of ornithine carbamoyl transferase deficiency using a gene specific probe, *J Med Genet* **6**, 462-5
- Perry R.H., Cooks R.G., Noll R.J. (2008), Orbitrap mass spectrometry: Instrumentation ion motion and application, *Mass Spectrom Rev.* **27**, 661 – 99
- Sacksteder K.A., Biery B.J., Morrell J.C., Goodman B.K., Geisbrecht B.V., Cox R.P., Gould S.J., Geraghty M.T. (2000), Identification of the alpha-amino adipic semialdehyde synthase gene, which is defective in familial hyperlysinemia, *Am J Hum Genet.* **6**, 1736-43
- Scigelova M., Makarov A. (2006), Orbitrap mass analyzer – Overview and applications in proteomics, *Proteomics* **6**, 16 – 21
- Schwartz J.C., Wade A.P., Enke G.C., Cooks R.G. (1990), Systematic delineation of scan modes in multidimensional mass spectrometry, *Anal. Chem.* **62**, 1809 – 18

- Sommer A., Christensen E., Schwenger S., Seul R., Haas D., Olbrich H., Omran H., Sass J.O. (2011), The molecular basis of aminoacylase 1 deficiency, *Biochim Biophys Acta* **6**, 685-90
- Spěváčková V., Knotková J. (1998), Prvková analýza Klinických materiálů – Aplikace elektrotermické atomové absorpční spektrometrie, *Chem. Listy* **92**, 287 – 293
- Spiegel E.K., Colman R.F., Patterson D. (2006), Adenylosuccinate lyase deficiency, *Molecular Genetics and Metabolism* **89**, 19-31
- Šťastná S. (2008), Laboratorní diagnostika dědičných metabolických poruch, *Med. Pro Praxi* **5**, 274 – 276
- Tomita M., Nishioka T. (2005) *Metabolomics: The Frontier of Systems Biology*, pp. 143-144
- Ubik K. (2000), Fyzikálně-chemické metody, Vydavatel cyklu: Ústav organické chemie a biochemie AV CR, Praha, pp 9 – 106
- Verbruggen KT, Knijff WA, Soorani-Lunsing RJ, Sijens PE, Verhoeven NM, Salomons GS, et al. (2007), Global developmental delay in guanidionacetate methyltransferase deficiency: differences in formal testing and clinical observation. *Eur J Pediatr* **166**, 921–5
- Verner P. (2005), Lineární iontová past a její aplikace v proteomické analýze, *Chem. Listy* **99**, 937 – 942
- Vodrážka Z. (1996), *Biochemie*, Academia Praha, Praha, 9 – 28
- Voet D., Voetová J.G. (1995), *Biochemie*, Victoria publishing Praha, Praha, pp 435 – 458
- Volný M. (2011), Hmotnostní spektrometrie: Přehled zajímavých oblastí aktuálního vývoje, *Chem. Listy* **105**, 230 – 236

- Vřešťál J. a kolektiv (2000), Hmotnostní spektrometrie, Masarykova univerzita, Brno, pp 8 – 90
- Wilm M. (2011), Principles of electrospray ionization, *Mol Cell Proteomics* **10**, 1 – 8
- Wittman C., Kromer J.O. , Kiefer P., Binz T. Heinzle E. (2004), Impact of the cold shock phenomenon on quantification of intracellular metabolites in bacteria, *Anal. Chem.* **327**, 135 – 9
- Yap S. (2005), Homocystinuria due to cystathionine  $\beta$ -synthase deficiency,

Internetové zdroje:

Pavel Nezbeda (15.3. 2013),

<http://www.ceva->

[edu.cz/pluginfile.php/2465/mod\\_resource/content/0/Analyza\\_moci\\_120604.pdf](http://www.ceva-edu.cz/pluginfile.php/2465/mod_resource/content/0/Analyza_moci_120604.pdf)

Metagene.de (10.4.2013)

<http://metlin.scripps.edu> (24.4.2013)

## 9 POUŽITÉ ZKRATKY

AASS	2-aminoadipátsemialdehydsynthasa
ACY I	aminoacylasa I
ADP	adenosindifosfát
ADSL	adenylosukcinátlyasa
AGAT	argininglycinamidinotransferasy
AICAR	aminoimidazolkarboxamidribotidu
APCI	chemická ionizace při atmosférickém tlaku
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku
ATP	adenosintrifosfát
CBS	cystathion- $\beta$ -syntasa
CPS	carbamoylfosfosyntasa
DC	stejnoseměrné elektrické napětí
DMP	dědičné metabolické poruchy
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ESI	elektrosprej
FT-IR	infračervená spektroskopie s Fourierovou transformací
GAA	guanidinoctová kyselina
GAMT	guanidinacetátmethyltransferasa
GMP	guanosinmonofosfát
HESI II	vyhříváný elektrosprej
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IP	iontová past
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
MS	hmotnostní spektrometrie
NADP <sup>+</sup>	oxidovaná forma nikotinaminadenindinukleotidfosfátu
NADPH	nikotinaminadenindinukleotidfosfát
NMR	nukleární magnetická rezonance
OTC	ornithintranskarbamoylasa
RF	radiofrekvenční pole
S-Ado	sukcinyladenosen
SAICAR	sukcinylaminoimidazolkarboxamidribotid
SAICAr	sukcinylaminoimidazolkarboxamidribosid
S-AMP	adenylosukcinát