

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Diagnostika dědičných metabolických poruch
pomocí LC-MS/MS**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Stanislava Pavlíková
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Hana Janečková
Konzultant práce:	RNDr. David Friedecký, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	6. 5. 2013

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

V Olomouci 6. května 2013

Stanislava Pavlíková

Ráda bych poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Mgr. Haně Janečkové za trpělivé vedení a podporu. Dále bych ráda poděkovala RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D. za jeho cenné rady a připomínky a také všem pracovníkům Laboratoře dědičných metabolických poruch za jejich milý přístup a ochotu.

Tato práce vznikla za podpory projektu, jehož infrastrukturální 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	Stanislava Pavlíková
Název práce	Diagnostika dědičných metabolických poruch pomocí LC-MS/MS
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc a Ústav molekulární a translační medicíny Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci
Vedoucí práce	Mgr. Hana Janečková
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Dědičné metabolické poruchy (DMP) jsou onemocnění způsobená mutacemi v DNA. Důsledkem mutace nejčastěji vzniká nefunkční protein, který nemůže plnit svou funkci, což má negativní dopad na celý organismus. Nejčastěji postiženými proteiny jsou enzymy, jejichž poškození může způsobit jednak hromadění látek, které mohou být pro organismus toxické, nebo nedostatek látek pro organismus esenciálních. Tyto poruchy jsou často nevyléčitelné a léčba spočívá pouze v mírnění projevů a příznaků.</p> <p>Cílem experimentální části práce bylo vyvinout a validovat metodu pro diagnostiku vybraných DMP. Vzorky močí byly analyzovány pomocí kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Detekce celkem 32 markerů DMP probíhala v negativním módu na základě skenování produktů rozpadu molekulárního iontu. Do metody byly zařazeny především látky purinového, pyrimidinového a kreatinového metabolismu. Byla provedena validace metody a aplikace na reálné vzorky močí. Metoda byla uvedena do rutinního provozu v Laboratoři dědičných metabolických poruch Oddělení klinické biochemie ve Fakultní nemocnici Olomouc.</p>
Klíčová slova	Dědičné metabolické poruchy, kapalinová chromatografie, tandemová hmotnostní spektrometrie, purinové a pyrimidinové látky, validace
Počet stran	58
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Stanislava Pavlíková
Title	Diagnostics of inherited metabolic disorders using LC-MS/MS
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory for Inherited Metabolic Disorders, Department of Clinical Biochemistry, Medical Hospital, Olomouc and Institute of Molecular and Translational Medicine of the Faculty of Medicine and Dentistry of Palacký University in Olomouc
Supervisor	Mgr. Hana Janečková
The year of presentation	2013
Abstract	<p>Inherited metabolic disorders (IMD) are diseases caused by DNA mutation. The mutation often results in defective protein that does not function properly, it has a negative effect on the organism. The most frequently affected proteins are enzymes and their damage can cause either accumulation of toxic substances or lack of essential metabolites. IMD are often incurable and the treatment offers only reduction of symptoms and manifestation.</p> <p>The aim of experimental part was to develop and validate a method for diagnosis of selected IMD. The urine samples were analyzed using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. Detection of 32 markers of IMD proceeded in a negative mode using multiple reaction monitoring mode. Metabolites of purine, pyrimidine and creatine metabolism were mainly included into the method. The validation and also the application of the method on real urine samples were performed. Nowadays the method has been used in a routine practice in the Laboratory for Inherited Metabolic Disorders, Department of Clinical Biochemistry, Medical Hospital in Olomouc.</p>
Keywords	Inherited metabolic disorders, liquid chromatography, tandem mass spectrometry, purines and pyrimidines, validation
Number of pages	58
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

Bibliografická identifikace:	4
Bibliographical identification:	5
Obsah	6
Cíle práce	- 9 -
TEORETICKÁ ČÁST	- 10 -
1. Dědičné metabolické poruchy	- 11 -
1.1. Vznik	- 11 -
1.2. Projevy a léčba	- 11 -
1.3. Diagnostika	- 12 -
1.3.1. Novorozenecký screening	- 13 -
1.3.2. Selektivní screening	- 14 -
2. Poruchy metabolismu purinů	- 16 -
2.1. Metabolismus purinů	- 16 -
2.2. Charakteristika poruch	- 17 -
2.3. Vybraná onemocnění	- 18 -
2.3.1. Deficit hypoxanthinguaninfosforibosyltransferasy	- 18 -
2.3.2. Deficit adeninfosforibosyltransferasy	- 18 -
2.3.3. Deficit adenosindeaminasy	- 18 -
2.3.4. Deficit purinnukleosidfosforylasy	- 18 -
2.3.5. Deficit xanthinoxidasy	- 19 -
2.3.6. Adenylosukcinátlyasa.....	- 19 -
3. Poruchy metabolismu pyrimidinů	- 19 -
3.1. Metabolismus pyrimidinů	- 19 -
3.2. Charakteristika poruch	- 21 -
3.1. Vybraná onemocnění	- 21 -
3.1.1. Orotová acidurie.....	- 21 -
3.1.2. Nadměrná aktivita cytosolové 5'-nukleotidasy.....	- 21 -
3.1.3. Deficit pyrimidin-5'-nukleotidasy.....	- 21 -

3.1.4.	Deficit dihydroypyrimidindehydrogenasy	- 22 -
3.1.5.	Deficit dihydroypyrimidinamidohydrolysy	- 22 -
3.1.6.	Deficit ureidopropionasy	- 22 -
4.	Poruchy kreatinového metabolismu	- 22 -
4.1.	Metabolismus kreatinu	- 22 -
4.2.	Charakteristika onemocnění	- 23 -
5.	Poruchy močovinového cyklu	- 23 -
5.1.	Cyklus močoviny	- 23 -
5.2.	Charakteristika onemocnění	- 23 -
6.	Galaktosemie	- 24 -
6.1.	Metabolismus galaktosy	- 24 -
6.2.	Charakteristika onemocnění	- 24 -
7.	Poruchy ze střádání kyseliny sialové	- 25 -
7.1.	Kyselina N-acetylneuraminová	- 25 -
7.2.	Charakteristika onemocnění	- 26 -
8.	Tyrosinemie typu I	- 26 -
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST		- 28 -
9.	Úvod	- 29 -
10.	Materiál a vybavení	- 30 -
10.1.	Chemikálie	- 30 -
10.2.	Přístrojové vybavení	- 30 -
10.3.	Biologický materiál	- 31 -
10.3.1.	Příprava vzorku	- 31 -
11.	Metody	- 31 -
11.1.	Příprava standardů	- 31 -
11.2.	Optimalizace podmínek MS/MS	- 32 -
11.3.	Optimalizace podmínek HPLC	- 32 -
11.4.	Kvantifikace	- 33 -
12.	Validace metody	- 33 -

12.1.1.	Opakovatelnost	- 34 -
12.1.2.	Mezilehlá preciznost	- 34 -
12.3.	Linearita kalibračního vztahu	- 34 -
12.4.	Mez detekce.....	- 35 -
12.5.	Mez stanovitelnosti.....	- 35 -
13.	Stanovení referenčních rozmezí	- 35 -
14.	Výsledky	- 35 -
14.1.	Optimalizace podmínek MS/MS	- 35 -
14.2.	Optimalizace podmínek HPLC	- 39 -
14.3.	Validace metody	- 40 -
15.	Referenční rozmezí	- 44 -
16.	Analýza močí pacientů s diagnostikovanou DMP.....	- 46 -
17.	Diskuze	- 49 -
18.	Závěr	- 51 -
19.	Citovaná literatura.....	- 52 -
20.	Použité zkratky	- 56 -

Cíle práce

- Vypracování rešerše na téma dědičné metabolické poruchy se zaměřením na vybrané poruchy a jejich diagnostické markery
- Vývoj a validace metody pro analýzu močí pro diagnostiku vybraných DMP
- Aplikace metody na vzorky močí pacientů a zavedení metody do rutinního provozu

TEORETICKÁ ČÁST

1. Dědičné metabolické poruchy

1.1. Vznik

Dědičné metabolické poruchy (DMP) jsou onemocnění metabolismu způsobená mutacemi DNA. Jedná se především o bodové mutace, při kterých dochází k záměně jednoho nukleotidu za jiný (tranzice a transverze), dále se vyskytují inserce či delece (tzv. posunové mutace) a také přemístění nebo abnormální opakování jednoho či více nukleotidů. Defektní transkripce a translace tak vzniká nefunkční protein, který podle své důležitosti a úlohy v organismu způsobí více či méně závažné projevy daného onemocnění. Také mohou vzniknout např. defektní mRNA či siRNA, které pak nemohou správně regulovat expresi genů. Mutované proteiny mohou být různých povah a struktur. Nejčastěji jsou to enzymy, onemocnění je pak způsobeno hromaděním substrátu, nedostatkem produktu nebo vznikem alternativního produktu. Postiženy mohou být též krevní proteiny (např. hemoglobin), membránové proteiny, kdy následná změna tvaru buňky může způsobovat atypické interakce s okolím, dále také buněčné receptory, proteiny tvořící iontové kanály či regulační proteiny (Racek et al., 2006).

Většina DMP se řadí k autosomálně recesivním onemocněním, vzácně se objevují i onemocnění dědičná autosomálně dominantně či gonosomálně recesivně a dominantně, jsou známá i onemocnění s mitochondriální dědičností.

1.2. Projevy a léčba

DMP jsou závažnými onemocněními, která mají negativní vliv na duševní i tělesný vývoj a projevy dítěte i dospělého. Jejich následkem může být v řadě případů i smrt jedince v novorozeneckém či pozdějším dětském věku. Některé poruchy se ovšem projeví až v dospělosti (Hájek et al., 2000).

Nejčastějšími projevy u novorozenců jsou malformace, mikrocefalie, hypotermie, křeče, apnoické pauly a porucha sacího reflexu. Dožije-li se jedinec staršího dětského či dospělého věku, objevují se vady řeči, mentální retardace, opožděná puberta, opoždění psychomotorického vývoje, podrážděnost, poruchy vědomí, hyperaktivita, sebepoškozování, poškození zraku a sluchu. U nemocných bývají časté vrozené srdeční vady, atypická stavba kostry, problémy s ledvinami či myopatie (Šťastná, 2008).

Léčba DMP nemusí být vždy známá či dostupná, bývá velmi specifická a nákladná. Často se jedná pouze o symptomatickou léčbu, která zmírňuje projevy onemocnění (např. křeče), ale jelikož se jedná o onemocnění geneticky daná a chronická, je léčba jako taková obtížná. Je-li dostupná, liší se podle druhu onemocnění. V případě, že nemoc vyvolává hromadící se substrát popř. vedlejší produkt, aplikuje se dieta se sníženým příjmem substrátu, je-li problémem nedostatek produktu, je nutno potravu o něj obohatit. Krajním řešením může být transplantace orgánů.

Začala se také používat genová terapie. Vůbec poprvé byla použita v roce 1990 u dvou dětí trpících deficitem adenosindeaminasy (ADA) (Blaese et al., 1995), který způsobuje těžké poškození imunitního systému, konkrétně T lymfocytů. Dětem byly odebrány bílé krvinky, byly do nich vneseny funkční kopie genu *ADA* a po potvrzení exprese byly tyto krvinky vráceny do tělního oběhu. Tento způsob genové terapie se u většiny takto léčených pacientů osvědčil, i když měl své nevýhody – omezenou délku života bílých krvinek a také krátkodobou schopnost exprese vneseného transgenu *ADA*. U pacientů s deficitem ADA byla také vyzkoušena genová terapie využívající kmenové buňky. V současné době se genová terapie neustále rozvíjí a přináší nové způsoby léčby nejen DMP (Bordignon et al., 1995).

1.3. Diagnostika

Postupně se vyvíjející možnosti diagnostických postupů v lékařství všeobecně umožňují rychlejší a komplexnější určení diagnózy pacienta a tudíž i včasné nasazení dostupné léčby. Dnešní vědecké postupy umožňují testovat a zkoumat v podstatě celé lidské tělo a snahou je, aby vyšetření bylo co nejjednodušeji proveditelné a co nejméně zatížilo pacienta.

I proto je vyšetření tělních výměšků a tekutin dostupným a běžným způsobem, jak objasnit abnormální stav organismu. Vyšetření tělních tekutin bylo vůbec jedno z prvních, které bylo v rámci lékařských postupů prováděno. Pohledem, čichem či chutí byly zjišťovány odlišnosti mezi zdravými a nemocnými. Jelikož při DMP obecně defekt nějakého enzymu způsobí hromadění substrátu či vedlejšího produktu v tělních tekutinách či tkáních, je tento způsob diagnostiky používaný i pro DMP. Používají se především krev (nebo její složky), moč, mozkomíšní mok, případně slzy a pot.

Diagnostiku DMP můžeme rozdělit do dvou částí – na novorozenecký screening a selektivní screening.

1.3.1. Novorozenecký screening

Dříve byla rozšířena představa, že DMP jsou tak ojedinělými onemocněními, že se s nimi praktický lékař v podstatě nesetká. S rozvojem výzkumu a diagnostických technik se však DMP dostaly do povědomí nejen lékařů, ale i veřejnosti a dnes patří mezi běžně diagnostikovaná onemocnění. Svědčí o tom i jejich zařazení do novorozeneckého screeningu.

Zahájení systematického screeningu fenyلكetonurie v České republice je datováno do roku 1975 (Votava et al., 2010). Postupně se k němu přidávala další onemocnění a v současné době probíhá novorozenecký screening 13 onemocnění, z nichž 10 patří k DMP. Konkrétně to jsou některé z poruch metabolismu aminokyselin a mastných kyselin (Tab. 1). Pro většinu těchto onemocnění platí, že porucha se projeví brzy po narození, často akutní atakou, je proto důležité rychle nemoc diagnostikovat a začít s léčbou (Hoffman et al., 2006 a). Prevalence těchto 13 onemocnění je v České republice 1:1200 (Votava et al., 2010).

Tab. 1: Onemocnění zařazená do novorozeneckého screeningu v České republice. Poruchy metabolismu aminokyselin (1. oddíl), organické acidurie (2. oddíl), poruchy metabolismu (3. oddíl) a transportu (4. oddíl) mastných kyselin, ostatní onemocnění (5. oddíl). Podle www.novorozenecky-screening.cz.

Používaný název onemocnění
Fenyلكetonurie, hyperfenylalanemie
Leucinosa
Glutarová acidurie
Izovalerová acidurie
Deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin (MK) se středně dlouhým řetězcem
Deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenasy MK s dlouhým řetězcem
Deficit acyl-CoA dehydrogenasy MK s velmi dlouhým řetězcem
Deficit karnitinpalmitoyltransferasy I
Deficit karnitinpalmitoyltransferasy II
Deficit karnitinacylkarnitintranslokasy
Kongenitální hypotyreosa (vrozená snížená funkce štítné žlázy)
Kongenitální adrenální hyperplazie (vrozená nedostatečnost tvorby hormonů v nadledvinkách)
Cystická fibrosa (vrozená porucha tvorby hlenu)

Každému narozenému dítěti je odebrán z patičky vzorek krve v podobě krevní skvrny, který je následně na specializovaných pracovištích vyšetřen na přítomnost markerů DMP, jež jsou do novorozeneckého screeningu zařazeny. Celkové riziko onemocnění některou z těchto 10 poruch je 1 : 4 000 (Votava et al., 2010). Pokud trpí dítě poruchou, která není diagnostikována v tomto screeningovém programu, není většinou ihned odhalena. Po určité době (dny až měsíce) se u něj začnou projevovat

zpravidla velice obecné a nespecifické symptomy, které mohou být považovány za projevy jiného onemocnění. Nebo může být také jedinec hospitalizován po náhlém ataku, kdy se nemoc projeví velice náhle a silně.

Novorozenci často po několika hodinách, kdy se zdá být všechno v pořádku, upadají do kómatu a je nutno je napojit na plicní ventilaci. V kojeneckém věku se DMP projevuje nejčastěji neprospíváním, nechutenstvím, zvracením. V ojedinělých případech se po jednorázovém ataku onemocnění v dětství objeví další symptomy až ve starším dětském věku či v dospělosti. V jakémkoli věku také mohou nastat akutní stavy i u léčených pacientů (Hoffman et al., 2006 a). V těchto případech přichází na řadu selektivní screening.

1.3.2. *Selektivní screening*

Toto označení zahrnuje velký soubor různých specifických testů a vyšetření, které se provádí u pacientů s podezřením na některou z DMP.

Nejčastěji aplikovaným přístupem je diagnostika na úrovni metabolitu. Vyšetřují se konkrétní známé markery příslušných onemocnění. Byla vyvinuta řada metod využívajících různé technické a analytické přístupy. Jednotlivé přístupy se liší podle typu onemocnění, povahy analytu a matrice, ve které je stanovován. Mezi využívané techniky se řadí kapilární elektroforéza, tenkovrstevná chromatografie, kapalinová a plynová chromatografie, hmotnostní spektrometrie a radiochemické či imunologické testy.

Diagnostika na úrovni enzymu či DNA je rovněž možná, ale je aplikovaná velmi individuálně a po konzultaci s odborníkem (Šťastná, 2008).

Je třeba podotknout, že důležitou součástí stanovení diagnózy je znalost rodinné anamnézy, tedy onemocnění rodičů nebo jiných příbuzných, podobné příznaky u ostatních sourozenců či jejich úmrtí v novorozeneckém nebo kojeneckém věku. Zvýšenou pozornost je třeba věnovat také těhotným ženám s DMP, protože heterozygotní plod může být poškozen vysokým množstvím toxických metabolitů z těla matky. Je-li u nastávajících rodičů prokazatelně stanovena diagnóza, je možno plod prenatalně vyšetřit na danou poruchu. K vyšetření se používá plodová voda, kultivované buňky plodové vody, fetální krev, buňky choria nebo placenty (Hájek et al., 2000).

Pokud dojde k náhlému úmrtí pacienta z nejasné příčiny a příznaky by mohly poukazovat na DMP, doporučuje se provést postmortální diagnostiku. Zamrazí se již

odebraný materiál, uschovají se všechny dostupné informace, někdy se přistupuje i k postmortálnímu odběru vzorků tkání pro další vyšetření (Šťastná, 2008).

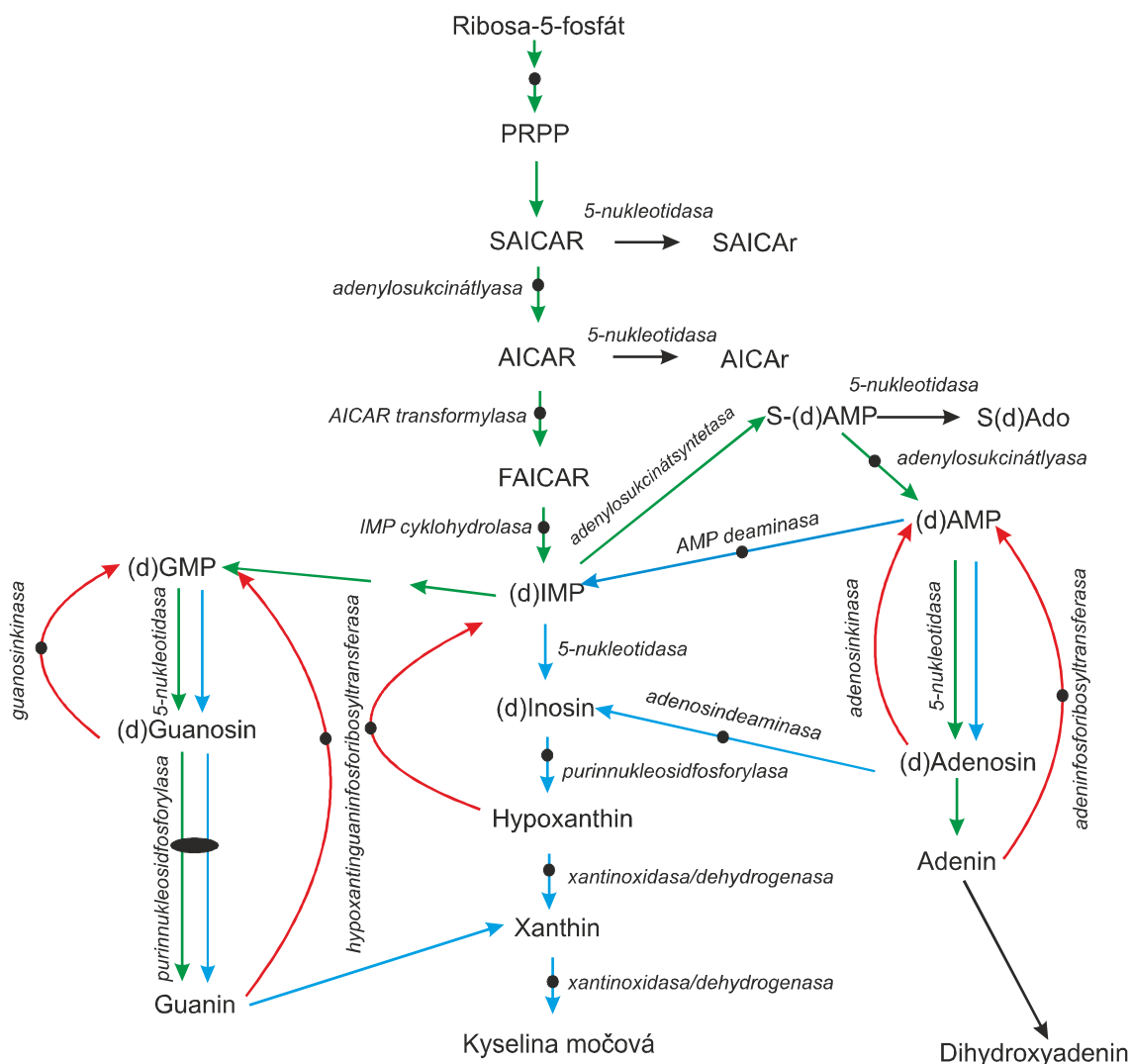
Dědičné metabolické poruchy se bohužel vyskytují a dále se vyskytovat budou. Včasná a přesná diagnostika poruchy může přispívat k brzkému zahájení léčby a tím menšímu riziku vzniku doživotních následků. Bohužel známe i poruchy neslučitelné se životem a v těchto případech je třeba rodinám pacientů poskytovat dostatek informací a poradenství i v souvislosti s jejich dalšími potomky. V každém případě je třeba, aby se o DMP vědělo a mluvilo nejen mezi lékaři, ale i mezi laickou veřejností.

Následující kapitoly budou věnovány vybraným DMP, které je možno diagnostikovat metodou vyvinutou v rámci praktické části této bakalářské práce. Jedná se konkrétně o poruchy metabolismu purinů, pyrimidinů, kreatinu, močovinového cyklu, poruchy se zvýšenou hladinou galaktitolu v moči, tyrosinemii a choroby ze střádání kyseliny sialové.

2. Poruchy metabolismu purinů

2.1. Metabolismus purinů

Purinové nukleotidy jsou důležitými sloučeninami energetického metabolismu, mají regulační funkci a tvoří základní složky DNA a RNA. Metabolismus purinů lze rozdělit na tři části: *de novo* syntéza, katabolický a recyklační řetězec (Obr. 1).



Obr. 1: Metabolismus purinových látek. *De novo* syntéza (zelená), recyklační řetězec (červená), katabolický řetězec (modrá); ● místo, ve kterém může nefunkční enzym prokazatelně způsobit DMP. Zkratky: AICAR/r – aminoimidazolkarboxamidribotid/ribosid; PRPP – fosforibosylpyrofosfát; FAICAR – formylamidoimidazolkarboxamidribotid; S-Ado – sukcinyladenosin; SAICAR/r – sukcinylaminoimidazolkarboxamidribotid/ribosid; S-AMP – adenylosukcinát; (d) – deoxy analoga příslušných látek. (Upraveno podle van den Berghe, 2008)

Během *de novo* syntézy je z fosforibosylpyrofosfátu a jednoduchých prekurzorů (např.: CO₂, glycinu a glutaminu) postupně vytvářen purinový skelet. Recyklační řetězec umožňuje opětovné využití purinových bazí ve formě adenosinmonofosfátu (AMP) a guanosinmonofosfátu (GMP). Z nich jsou tvořeny příslušné nukleotidy, nukleosidy a jejich deoxyanaloga. Centrální látkou purinového metabolismu, ze které jsou GMP a AMP syntetizovány, je inosinmonofosfát (IMP). Purinové látky jsou v katabolickém řetězci odbourávány na kyselinu močovou, která je jako odpadní látka vylučována z těla ven.

2.2. Charakteristika poruch

Byla popsána řada poruch purinového metabolismu (Tab. 2). Jsou způsobeny deficitem nebo nadměrnou aktivitou enzymů a zasahují všechny tři metabolické dráhy. Typickými projevy jsou špatná koordinace pohybů, dna, u některých onemocnění epilepsie a samovolné křeče, dále také poruchy dozrávání T – lymfocytů či jiná imunitní onemocnění (Kahler & Fahey, 2003; Hájek et al., 2000).

Tab. 2: DMP purinových látek.

Název DMP	Klasifikační číslo enzymu
Deficit adenosindeaminasy	EC 3.5.4.4
Nadměrná aktivita adenosindeaminasy	EC 3.5.4.4
Deficit adenylosukcinátlyasy	EC 4.3.2.2
Deficit AICAR transformylasy a IMP cyklohydrolasy	EC 2.1.2.3 EC 3.5.4.10
Deficit adenylátkinasy	EC 2.7.4.3
Deficit adenylátdeaminasy	EC 3.5.4.6
Deficit aldehydoxidas/y/xantindehydrogenasy	EC 1.2.3.1
Deficit adeninfosforibosyltransferasy	EC 2.4.2.7
Deficit deoxyguanosinkinasy	EC 2.7.1.113
Familiární juvenilní hyperurikemická nefropatie	
Deficit hypoxantinguaninfosforibosyltransferasy	EC 2.4.2.8
Deficit IMP dehydrogenasy typu I	EC 1.1.1.205
Nadměrná aktivita IMP dehydrogenasy typu II	EC 1.1.1.205
Deficit inosintrifosfátpyrofosfohydrolasy	EC 3.6.1.19
Deficit methylthioadenosinfosforylasy	EC 2.4.2.28
Deficit molybdenových kofaktorů	
Deficit purinnukleosidfosforylasy	EC 2.4.2.1
Nadměrná aktivita fosforibosylpyrofosfátsynthasy	EC 2.7.6.1
Deficit fosforibosylpyrofosfátsynthasy	EC 2.7.6.1
Deficit S-adenosylhomocysteinhydrolasy	EC 3.3.1.1.
Deficit thiopurinmetyltransferasy	EC 2.1.1.67
Deficit xantinoxidas/y	EC 1.17.3.2

2.3. Vybraná onemocnění

2.3.1. Deficit hypoxanthinguaninfosforibosyltransferasy

Deficit hypoxanthinguaninfosforibosyltransferasy (HGPRT), jehož lehká forma (částečný deficit) je nazývána Kelley – Seegmillerův syndrom a těžká forma Lesch-Nyhanův syndrom, je onemocnění provázené hyperurikemií, mentální retardací, choreoatetózou, spastickými mozgovými obrnami a sebepoškozováním. Hypoxanthin a guanin nejsou metabolizovány na GMP a IMP, tudíž jediná možnost odbourávání těchto bazí je na kyselinu močovou. Tato X-vázaná porucha se obvykle projevuje u mužů, ženy bývají nejčastěji přenašečkami. Závažnost onemocnění závisí na tom, zda je deficit HGPRT celkový nebo jen částečný (Torres & Puig, 2010; Davidson et al., 1989; Hájek et al., 2000; Nyhan, 2005).

2.3.2. Deficit adeninfosforibosyltransferasy

Tento enzym je zodpovědný za recyklaci adeninových nukleotidů. Tvorba AMP je ale možná i jinými cestami, proto jediným problémem zůstává hromadící se adenin, který je převáděn xantinoxidasou na 2,8-dihydroxyadenin, který je ve vodě těžko rozpustný a který vytváří ledvinové kameny. Krystalurie může vyústit až v selhání ledvin (Nyhan, 2005; Barratt et al., 1979; Jurecka, 2009).

2.3.3. Deficit adenosindeaminasy

Do několika měsíců po narození se u dětí objevuje tzv. těžký kombinovaný imunodeficit (SCID), což je závažné poškození humorální a buněčné imunity. Objevují se těžké infekce v kůži, respiračních cestách a gastrointestinálním traktu, které vyúsťují v průjmy, neprospívání či kandidózu. Porucha má progresivní průběh, protože zbytky B a T lymfocytů postupně odumírají. Chybějící adenosindeaminasa (ADA) má za následek hromadění adenosinu a deoxyadenosinu. Onemocnění je možno léčit genovou terapií, transplantací kostní dřeně nebo enzymovou substituční léčbou (van den Berghe et al., 2008; Hoffman et al., 2006 b).

2.3.4. Deficit purinnukleosidfosforylasy

Tuto DMP můžeme zařadit do imunodeficientních onemocnění, protože pacienti trpí nedostatkem T lymfocytů, někdy i poruchou funkce B lymfocytů. To způsobuje časté infekce, ať už bakteriální či virové, dále neurologické potíže i autoimunitní onemocnění. Poškození T buněk je způsobeno hromaděním zejména deoxyguanosinu, který není v nepřítomnosti purinnukleosidfosforylasy (PNP)

odbouráván, inhibuje ribonukleosidreduktasu a poškozuje dělení buněk. Léčba je možná transplantací kostní dřeně (Aytekin et al., 2010; van den Berghe et al., 2008).

2.3.5. Deficit xanthinoxidasy

Toto onemocnění má dva druhy deficitu – deficit xanthinoxidasy (XO), tzv. xanthinurie typu I – a kombinovaný deficit xanthinoxidasy a sulfinoxidasy. Projevují se u novorozenců poruchami krmení, křečemi, špatným svalovým tonem, později mentální retardací, artropatií, myopatií. V moči jsou výrazně snižené hladiny kyseliny močové, jejíž vylučování je téměř kompletně nahrazeno vylučováním xanthinu a hypoxanthinu. Mohou se objevovat ledvinové kameny a vzácně dochází k selhání ledvin. Xanthinurie typu I, která je méně závažná, je léčitelná dietou s nízkým obsahem purinů a dostatečným pitným režimem. Kombinovaný deficit je ale závažnější a jeho léčba je obtížná (van den Berghe et al., 2008; Arikyants et al., 2007).

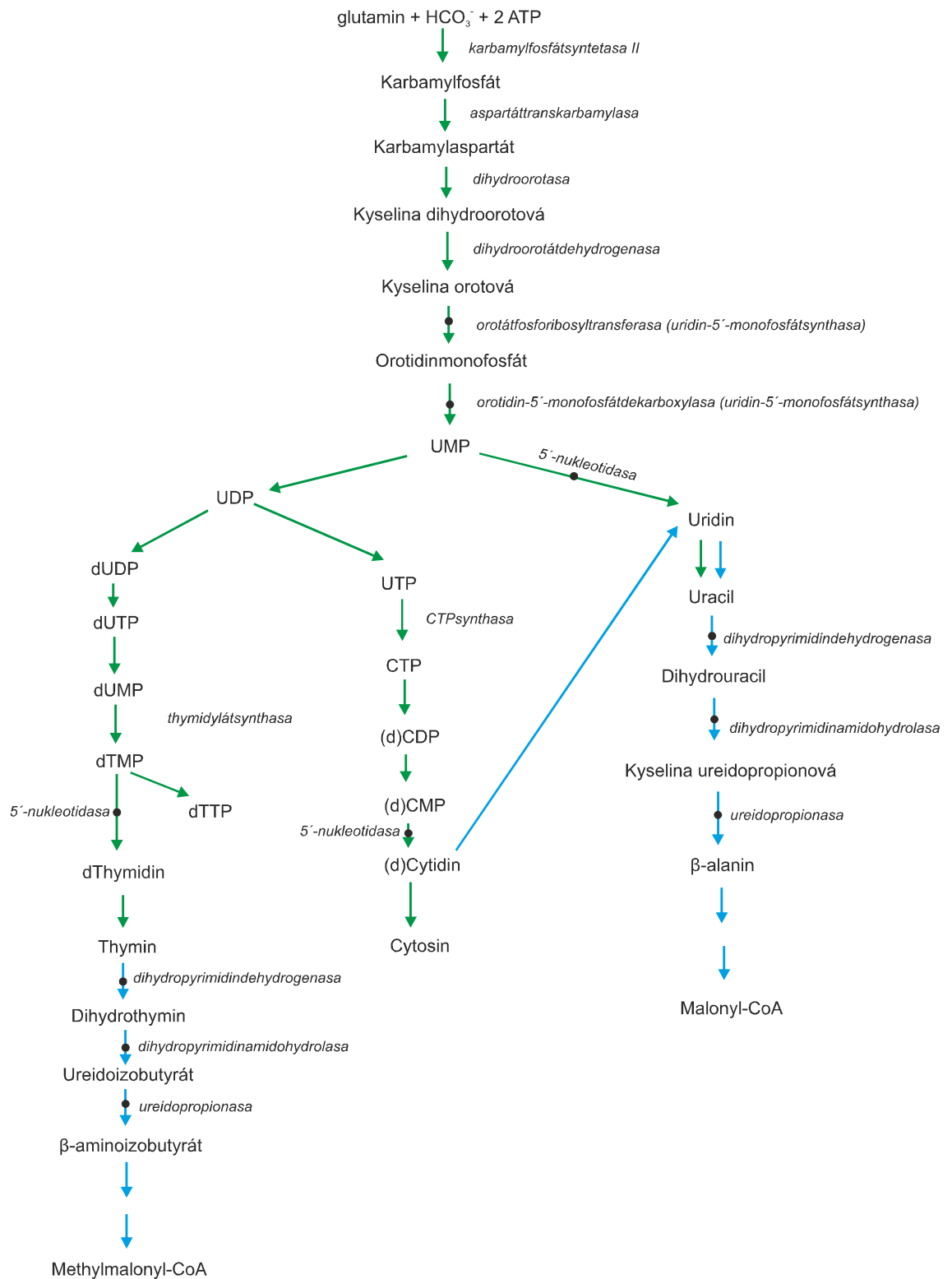
2.3.6. Adenylosukcinátlyasa

Adenylosukcinátlyasa (ADSL) jednak katalyzuje přeměnu adenylosukcinátu (S-AMP) na AMP, ale také sukcinylaminoimidazolkarboxamidribotidu (SAICAR) na aminoimidazolkarboxamidribotid (AICAR). Jeho defekt způsobí v tělních tekutinách hromadění defosforylovaných substrátů SAICARibosidu a sukcinyladenosinu (S-Ado), které jsou při normální funkci ADSL v minimálních koncentracích. Psychomotorická retardace, křeče, autistické chování a hypotonie jsou některé z obecných projevů této poruchy (Nassogne et al., 2000).

3. Poruchy metabolismu pyrimidinů

3.1. Metabolismus pyrimidinů

Biosyntéza pyrimidinových nukleotidů (Obr. 2) se liší od biosyntézy purinových nukleotidů hlavně v principu výstavby heterocyklu. V případě purinových nukleotidů jde o postupnou výstavbu již zakotvenou na ribose. Pyrimidinový kruh je ovšem stavěn samostatně a teprve poté je připojena ribosa. Centrální sloučeninou je uridin-5'-monofosfát, ze kterého vychází tvorba všech pyrimidinových nukleotidů a bází. Tvorba deoxynukleotidů, která je nezbytná pro stavbu DNA, probíhá na úrovni nukleosiddifosfátů. Degradace pyrimidinů vede k tvorbě β -alaninu a β -aminoisobutyrate, které jako malonyl-CoA a methylmalonyl-CoA vstupují do biosyntézy mastných kyselin a citrátového cyklu.



Obr. 2: Metabolismus pyrimidinových nukleotidů. Biosyntéza (zeleně) a katabolismus (modře). ● místo, ve kterém může nefunkční enzym prokazatelně způsobit DMP.

3.2. Charakteristika poruch

Spektrum poruch pyrimidinového metabolismu je také široké (Tab. 3), i když je poruch méně než u DMP purinových látek. Většina z nich s sebou přináší křeče a mentální retardaci (Nyhan, 2005).

Tab. 3: DMP pyrimidinových látek. Použité zkratky: CTP – cytidintrifosfát. Podle Jurecka, 2009.

Název DMP	Klasifikační číslo enzymu
Deficit aktivací indukované cytidindeaminasy	EC 3.5.4.5
Deficit CTP fosfocholincytidyltransferasy	EC 2.7.7.15
Deficit dihydropyrimidiny	EC 3.5.2.2
Deficit dihydropyrimidinehydrogenasy	EC 1.3.1.2
Nadměrná aktivita cytosolové 5-nukleotidasy	EC 3.1.3.5
Deficit pyrimidin-5'-nukleotidasy	EC 3.1.3.5
Deficit thymidinkinasy II	EC 2.7.1.21
Deficit thymidinofosforylasy	EC 2.4.2.4
Deficit uridinmonofosfátsynthasy (orotová acidurie I a II)	EC 4.1.1.23
Deficit ureidopropionasy	EC 3.5.1.6

3.1. Vybraná onemocnění

3.1.1. Orotová acidurie

Je-li uridin-5'-monofosfátsynthasa, která má aktivitu orotátfosforibosyltransferasy a orotidin-5'-monofosfátdekarboxylasy, neaktivní, hromadí se orotová kyselina. Její nadbytek způsobuje usazování krystalků orotátu v ledvinách a močových cestách, dále poruchy fyzického i psychického vývoje a megaloblastickou anemii. Orotová acidurie může také provázet tzv. Reyův syndrom (závažné onemocnění způsobující poškození orgánů u dětí) a deficit enzymů močovinového cyklu (Chatterjea & Shinde, 2012).

3.1.2. Nadměrná aktivita cytosolové 5'-nukleotidasy

Cytosolová 5'-nukleotidasa štěpí nukleosidmonofosfáty na nukleosidy. Její nadměrná aktivita způsobí nedostatek pyrimidinových nukleotidů, který se projevuje křečemi, růstovou retardací, opakovanými infekcemi, problémy s řečí, prostorovou orientací a hyperaktivitou (Page et al. 1997).

3.1.3. Deficit pyrimidin-5'-nukleotidasy

Enzym pyrimidin-5'-nukleotidasa je zodpovědný za defosforylaci nukleosidmonofosfátů. Deficit postihuje erytrocyty, kde ukládání pyrimidinových

nukleotidů způsobuje chronickou hemolytickou anemii (van den Berghe et al., 2008; Warang et al., 2012).

3.1.4. Deficit dihydropyrimidindehydrogenasy

Je-li deficit enzymu celkový, projeví se již v dětském věku motorickou a mentální retardací, epilepsií, opožděním růstu. V tělních tekutinách se hromadí uracil a thymin. Pacienti s parciálním deficitem bývají často odhaleni až v dospělosti při podávání 5-fluorouracilu v rámci léčby rakoviny, který je rovněž substrátem tohoto enzymu. Při jeho deficitu se hromadí, což vede k vážným projevům toxicity (van den Berghe et al., 2008).

3.1.5. Deficit dihydropyrimidinamidohydrolasy

Při deficitu dihydropyrimidinamidohydrolasy (DHP, dihydropyrimidinas) nejsou dihydrothymin a dihydrouracil spolehlivě odbourávány a spolu s thyminem a uracilem se hromadí v tělních tekutinách. Pacienti trpí mentální retardací, křečemi, byla pozorována i mikrocefalie (van den Berghe et al., 2008; van Gennip et al., 1997).

3.1.6. Deficit ureidopropionasy

Tato porucha, při které dochází k zvýšené exkreci kyseliny ureidopropionové a ureidoizobutyrové, se projevuje hypotonií, křečemi, vývojovými opožděními (van den Berghe et al., 2008; van Kuilenburg et al., 2012).

4. Poruchy kreatinového metabolismu

4.1. Metabolismus kreatinu

Kreatin je sloučenina, která se významným způsobem účastní procesů energetického metabolismu. Tkáně jako mozek, srdce či kosterní svalstvo obsahují kreatinkinasu, která fosforyluje kreatin na fosfokreatin. Ten je pak využíván jako zdroj fosfátu pro rychlou syntézu ATP (Struys et al., 2008).

Kreatin je získáván z potravy, ale také je v těle syntetizován a to za účasti dvou enzymů. L-argininglycinamidinotransferasa (AGAT, EC 2.1.4.1) přesouvá amidinovou skupinu z argininu na glycin za vzniku guanidinoacetátu (GAA) a S-adenosyl-L-methionin-N-guanidinoacetátmethyltransferasa (GAMT, EC 2.1.1.2) katalyzuje vstup methylové skupiny na GAA za vzniku kreatinu. Syntéza probíhá hlavně v játrech

a pankreatu, odkud je kreatin pomocí X-vázaného Na a Cl dependentního přenašeče (SLC6A8) transportován do ostatních tkání. Z kreatinu a fosfokreatinu vzniká neenzymatickou přeměnou kreatinin. Za den se obvykle přemění na kreatinin 1,5 % kreatinu (Stöckler-Ipsiroglu & Salomons, 2008). Kreatinin je z těla vylučován hlavně močí a množství vyloučeného kreatininu je závislé na velikosti svalové hmoty (Struys et al., 2008; Boenzi et al., 2011; Stöckler-Ipsiroglu & Salomons, 2008).

4.2. Charakteristika onemocnění

Jsou známy 3 metabolické poruchy s deficitem kreatinu, a to deficit AGAT, deficit GAMT a deficit přenašeče SLC6A8. Deficit AGAT se projevuje sníženou hladinou GAA a kreatinu v moči i krevní plazmě. Deficit GAMT naopak provází akumulace GAA v tělních tekutinách. Deficit SLC6A8 je spojen se zvýšeným poměrem kreatin/kreatinin v moči (Boenzi et al., 2011).

K projevům těchto DMP patří mentální i psychomotorická retardace, epilepsie, hypotonie, autistické sklony a poruchy vývoje řeči (Stromberger et al., 2003). Léčba deficitu AGAT a GAMT je založena na principu perorálního podávání chybějícího kreatinu. To ovšem není možno aplikovat při deficitu přenašeče SLC6A8, u tohoto onemocnění se zatím nepodařilo najít jednoznačně úspěšný způsob léčby (Stöckler-Ipsiroglu & Salomons, 2008).

5. Poruchy močovinového cyklu

5.1. Cyklus močoviny

Cyklus močoviny je metabolickou drahou, kterou je vylučován nepotřebný dusík. Vstupují do něj amoniak, uhličitán a aspartát, soustavou mitochondriálních a cytosolárních reakcí pak vzniká močovina, která je vylučována močí. Dalším produktem je fumarát, který je ve formě malátu možno transportovat do mitochondrie, kde vstupuje do dalších metabolických drah.

5.2. Charakteristika onemocnění

Všechny enzymy cyklu močoviny mohou být postihnuty poruchou. S ohledem na naši diagnostickou metodu jsou důležité ty poruchy, při kterých se hromadí karbamylfosfát. Ten totiž vystupuje z mitochondrií do cytosolu, kde vstupuje do syntézy

pyrimidinových látek. Zpravidla to má za následek velmi zvýšené vylučování kyseliny orotové a orotidinu močí. Těmito poruchami jsou deficit ornithintranskاربامylasy (OTC, EC 2.1.3.3), deficit argininosukcinátsyntetasy (tzv. citrulinemie, EC 6.3.4.5), deficit argininosukcinátlyasy (EC 4.3.2.1) a deficit arginasy (EC 3.5.3.1). Symptomy těchto poruch jsou variabilní, projevují se v různém věku. Mohou se projevit u novorozence, kdy dochází k rychlému zhoršení zdravotního stavu a bez rychlé diagnostiky a léčby často i k úmrtí dítěte. U starších dětí a dospělých dochází zpravidla při metabolické zátěži, kterou může být např. infekce, k výraznějšímu katabolismu bílkovin a dojde k hyperamonemii. Ta má za následek letargii, podráždění, problémy v chování. Neurčité symptomy vystřídá encefalopatie, kóma a akutní ohrožení života. Deficit arginasy je spojen také se spastickou diplegií (forma dětské mozkové obrny) (Leonard, 2008).

6. Galaktosemie

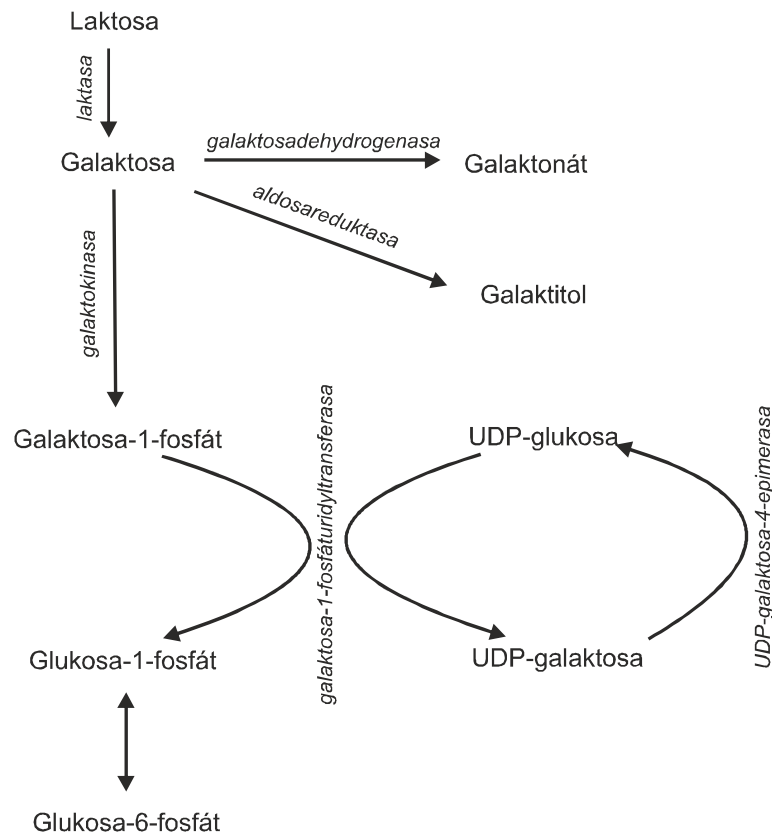
6.1. Metabolismus galaktosy

Laktosa, tzv. mléčný cukr, je v tenkém střevě laktasou štěpena na své základní složky – glukosu a galaktosu. Ta je galaktokinasou (GALK, EC 2.7.1.6) metabolizována na galaktosa-1-fosfát (Obr. 3). Enzym galaktosa-1-fosfáturidylyltransferasa (GALT, EC 2.7.7.12) převádí galaktosa-1-fosfát a uridindifosfoglukosu na glukosa-1-fosfát a uridindifosfogalaktosu. Vedlejší metabolickou drahou může z galaktosy působením aldosareduktasy (EC 1.1.1.21) vznikat galaktitol, působením galaktosadehydrogenasy (EC 1.1.1.46) vzniká galaktonát. Tyto dráhy jsou využívány především ve chvíli, kdy enzymy GALK a GALT nejsou přítomny v dostatečném množství či nefungují optimálně. Pak je hromaděna a vylučována buď čistá galaktosa, galaktosa-1-fosfát nebo galaktitol (Racek et al., 2006; Berry et al., 2008).

6.2. Charakteristika onemocnění

Galaktitol se v moči a dalších tělních tekutinách objevuje ve vysokých koncentracích při deficitu enzymů GALK a GALT. Galaktosa není zpracovávána obvyklým a neefektivnějším způsobem – tedy na glukosa-1-fosfát, ale právě na galaktitol. Tyto poruchy se projevují u novorozenců do několika dnů po porodu a počátku kojení. Dítě trpí průjmy, zvracením, ubývá na váze, nechce přijímat potravu.

Tato onemocnění bývají provázena vrozenou kataraktou (šedým zákalem), hepatopatií a mentální retardací (Burton, 1998). Souhrnně bývají deficity GALK a GALT spolu s deficitem uridindifosfátgalaktosa-4-epimerasy (EC 5.1.3.2) nazývány galaktosemie a v některých zemích jsou testy na galaktosemii součástí novorozeneckého screeningu (Berry et al., 2008).



Obr. 3: Metabolismus galaktosy.

7. Poruchy ze strádání kyseliny sialové

7.1. Kyselina N-acetylneuraminová

Skupina N-acetyl-neuraminové kyseliny a jejich derivátů bývá označována jako sialové kyseliny. Pro zjednodušení však bývá pojem sialová kyselina používán právě pro kyselinu N-acetyl-neuraminovou (Voet & Voet, 1995). Tato sloučenina odvozená od N-acetylmannosaminu a pyrohroznové kyseliny je důležitou složkou některých glykoproteinů (vysoká koncentrace např. v mucinech) a glykolipidů. Nejméně jeden zbytek sialové kyseliny mají ve své struktuře tzv. gangliosidy, což je skupina sfingoglykolipidů, které spoluutvářejí povrchové buněčné membrány a mozkové lipidy.

Kyselina sialová těmto sloučeninám zprostředkovává negativní náboj v prostředí s hodnotou pH okolo 7, což je odlišuje od ostatních glykolipidů (Nelson & Cox, 2008). Gangliosidy plní funkci receptorů pro některé hypofyzární hormony či bakteriální toxiny (např. toxin bakterie *Vibrio cholerae* způsobující cholera) (Voet & Voet, 1995), také jsou zřejmě spojeny s tvorbou nádorů a zajímavé je i dramatické kolísání jejich koncentrace v průběhu embryonálního vývoje (Nelson & Cox, 2008).

7.2. Charakteristika onemocnění

Rozlišujeme dva druhy těchto onemocnění. Jednak poruchy ze stádání volné kyseliny sialové – tzv. sialurie (Salla disease a ISSD – infantilní porucha se stádáním volné kyseliny sialové) a poruchu ze stádání vázané kyseliny sialové (sialidosa) (Wraith, 2008). Prvně jmenované poruchy jsou způsobeny mutací v genu, který kóduje membránový protein sialin, který transportuje kyselinu sialovou z lyzozomů. ISSD se projevuje již v raném dětství a bývá často smrtelná. Objevují se při ní hepatosplenomegalie a kardiomegalie a různé stupně opožděného vývoje dětí. Salla disease se projevuje později a má mírnější průběh. U pacientů se objevuje mírná až střední psychomotorická retardace a vady řeči. (Fois et al., 1987). Podstatou sialidosy je stádání glykopeptidů a oligosacharidů bohatých na kyselinu sialovou, které je způsobeno deficitem enzymu neuraminidasy. Projevy této choroby zahrnují jak pomalu postupující postižení dítěte, tak závažná a fatální onemocnění plodu (Wraith, 2008).

Jelikož se volná kyselina sialová v moči objevuje ve zvýšeném množství jen při sialuriích, je naší vyvinutou metodou možno diagnostikovat pouze tyto DMP.

8. Tyrosinemie typu I

Tyrosinemie typu I je závažné onemocnění zasahující metabolismus aminokyseliny tyrosinu. Postižen je degradační enzym fumarylacetoacetáthydrolasa (EC 3.7.1.2). Jeho deficit způsobuje hromadění fumarylacetoacetátu (FAA), který je považován za karcinogen. FAA je metabolizován na sukcinylaceton (SucAc) a sukcinylacetoacetát (SAA), které jsou rovněž považovány za karcinogeny. Diagnostickými markery mohou být v plazmě zvýšené koncentrace aminokyselin tyrosinu a methioninu, v moči a krvi SucAc a v moči SAA. Zvýšená koncentrace SucAc

a SAA v tělních tekutinách je ostatně pro onemocnění charakteristická. Klinickými projevy bývá postižení ledvin s krvácivými projevy nebo Fanconiho syndromem (onemocnění proximálních tubulů). Léčba je možná dietou s nízkým obsahem tyrosinu, fenylalaninu, methioninu. Také bývá podávána látka nitisinon inhibující enzym katalyzující vznik FAA (Cassiman et al., 2009).

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

9. Úvod

Metoda, která bude dále popisována, umožňuje rychlou a cílenou analýzu močí pacientů. Je do ní zařazeno 32 analytů, které mohou sloužit jako diagnostické markery některých DMP (Tab. 3). Metoda navazuje na diplomovou práci Mgr. Anny Barešové (Barešová, 2011). Původní metoda nepřinášela uspokojivé výsledky v kvantifikaci analytů a v oblasti kontroly kvality. Proto se začala vyvíjet nová metoda, která umožňuje kvantifikaci na základě použití značených interních standardů. Mezi hlavní odlišnosti od původní metody patří použití negativního módu pro analýzu všech látek a zkrácení doby analýzy na 9 min. Metoda umožňuje kvantitativní stanovení a u některých analytů kvalitativní průkaz (Tab. 3). V případě kvalitativního průkazu se jedná o látky, které jsou za fyziologických podmínek nedetekovatelné.

*Tab. 3: Jednotlivé analyty jako markery některých DMP v moči. Jako hypotetické markery jsou zde označeny meziprodukty purinového metabolismu – formylglycinamidribosid (FGAr), karboxaminoimidazolribosid (CAIr), aminoimidazolribosid (AIR) a FAICAr. * označuje látky, u kterých je možný kvalitativní průkaz.*

Analyt	Onemocnění
Adenin	Deficit adeninfosforibosyltransferasy
Adenosin	Deficit adenosindeaminasy
AICAr	Deficit AICAR transformylasy a IMP cyklohydrolasy
AIR *	Hypotetický marker deficitu AIR synthetasy nebo AIR karboxylasy
CAIr *	Hypotetický marker deficitu SAICAR synthetasy
Deoxyadenosin	Deficit adenosindeaminasy
Deoxyguanosin	Deficit purinnukleosidfosforylasy
Deoxyinosin	Deficit purinnukleosidfosforylasy
Deoxyuridin	Deficit thymidinfosforylasy
Dihydrothymidin	Deficit dihydropyrimidinasy
Dihydrouracil	Deficit ureidopropionasy Deficit dihydropyrimidinasy
Dihydroxyadenin *	Deficit adeninfosforibosyltransferasy
FAICAr *	Hypotetický marker deficitu IMP cyklohydrolasy
FGAr *	Hypotetický marker deficitu fosforibosylformylglycinamidinsynthetasou
Galaktitol	Galaktosemie
Guanidinoacetát	Deficit S-adenosyl-L-methionin-N-guanidinoacetátmethyltransferasy Deficit L-argininglycinamidinotransferasy
Guanosin	Deficit purinnukleosidfosforylasy
Hypoxathin	Deficit aldehydoxidasy/xanthindehydrogenasy Deficit hypoxantinguaninfosforibosyltransferasy Deficit molybdenových kofaktorů Deficit xanthindehydrogenasy

Analyt	Onemocnění
Inosin	Deficit purinnukleosidfosforylasy
Kreatin	Deficit kreatinového přenašeče SLC6A8 Deficit L-argininglycinamidinotransferasy
Kreatinin	Deficit kreatinového přenašeče SLC6A8
Orotidin	Deficit uridinmonofosfátsynthasy (orotová acidurie I a II)
Orotová kyselina	Deficit uridinmonofosfátsynthasy (orotová acidurie I a II)
SAICAr *	Deficit adenylosukcinátlyasy Deficit AICAR transformylasy a IMP cyklohydrolasy
Sialová kyselina	Salla disease Infantilní porucha ze střeďání volné kyseliny sialové
Sukcinylaceton	Tyrosinemie typu I
Sukcinyladenoin *	Deficit adenylosukcinátlyasy Deficit AICAR transformylasy a IMP cyklohydrolasy
Thymidin	Deficit thymidinofosforylasy
Thymin	Deficit dihydropyrimidinasy Deficit dihydropyrimidindehydrogenasy
Uracil	Deficit dihydropyrimidinasy Deficit dihydropyrimidindehydrogenasy
Uridin	Deficit thymidinofosforylasy
Xanthin	Deficit aldehydoxidas/y/xanthinoxidas/y Deficit molybdenových kofaktorů Deficit xanthinoxidas/y

10. Materiál a vybavení

10.1. Chemikálie

Použité standardy, značené standardy i další chemikálie byly analytické čistoty a byly nakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Pro přípravu roztoků a mobilní fáze byla použita ultračistá voda od firmy Sigma-Aldrich (LC-MS Chromasolv). Dále byly používány vzorky externí kontroly kvality ERNDIM (European research network for evaluation and improvement of screening, diagnosis and treatment of inherited disorders of metabolism; Manchester, UK) z roku 2012. Jednalo se o sadu vzorků s definovanými koncentracemi diagnosticky významných metabolitů, které zahrnovaly jednak purinové a pyrimidinové látky (tzv. *Purines and pyrimides in urine*) a také další látky zahrnuté v naší metodě (tzv. *Special assay in urine*).

10.2. Přístrojové vybavení

Analýza vzorků močí byla prováděna pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (UHPLC Ultimate 3000, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) s použitím kolony Luna (3 μm NH₂, 2 x 100 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA),

ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem (MS/MS API 4000, AB Sciex, Framingham, MA, USA), který pracuje na principu trojitého kvadrupólu.

Pro přípravu vzorků a mobilních fází byly použity analytické váhy (KERN ABT 120-5DM, Belling, Německo), centrifuga (Micro 120, Hettich, Německo), pH metr (Cyberscan pH 510, Thermo scientific, Waltham, MA, USA), ultrazvuková lázeň (Kraintek K12, Slovensko), vortex (IKA Works, USA).

10.3. Biologický materiál

Pro analýzu byly použity vzorky močí pacientů, které byly odeslány do Laboratoře dědičných metabolických poruch LDMP s podezřením na DMP. U všech vzorků byla známa koncentrace kreatininu, která byla stanovena na Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc FNOL. Dále byly použity papírky Whatman 903 (Maidstone, UK) se skvrnami močí pacientů, u nichž byla potvrzena DMP.

10.3.1. Příprava vzorku

Moč byla po stanovení koncentrace kreatininu naředěna mobilní fází tak, aby výsledná koncentrace kreatininu byla nejvýše 2 mmol/l. Vzorky s nižší koncentrací nebyly ředěny vůbec. Naředěná či samotná moč byla centrifugována (5 min, 10 000 g), následně bylo odebráno 25 µl do skleněné vialky, bylo přidáno 25 µl směsi interních standardů (IS, viz níže) a vše bylo promícháno.

Pro stanovení validačních parametrů byly používány vzorky externí kontroly kvality (EQC) o definované koncentraci jednotlivých analytů. Příprava vzorků byla analogická s biologickými vzorky.

Referenční rozmezí byla stanovena na základě 50 kontrolních vzorků močí, u nichž byla DMP vyloučena.

Papírky s močí byly extrahovány vodou a směsí mobilních fází A a B (1:1). Tyto vzorky byly následně centrifugovány (5 min, 10 000 g) a smíchány se směsí IS.

11. Metody

11.1. Příprava standardů

Značené interní standardy byly rozpuštěny ve vodě. Z důvodu špatné rozpustnosti hypoxanthinu a xanthinu byly tyto látky rozpouštěny v alkalickém prostředí hydroxidu amonného (100 mmol/l, 300 mmol/l).

Ze všech IS byla vytvořena směs (Tab. 4), která byla dále používána ke kvantifikaci analytů ve vzorcích moči. Roztoky jednotlivých IS byly rovněž použity k optimalizaci podmínek MS/MS a HPLC.

Tab. 4: Výsledná koncentrace značených standardů ve směsi pro analýzu moči.

Interní standard	Výsledná koncentrace ve směsi (mol/l)	Interní standard	Výsledná koncentrace ve směsi (mol/l)
IS - 13C3 Sialová kyselina	2.50E-05	IS - D2 Guanidinoacetát	5.00E-05
IS - 13C5 Adenosin	1.00E-05	IS - D2 Hypoxanthin	1.01E-05
IS - 13C6 Galaktitol	1.00E-04	IS - D3 Kreatin	5.00E-05
IS - 15N2 Orotová kyselina	1.00E-05	IS - D3 Kreatinin	5.00E-04
IS - 15N2 Uracil	1.00E-05	IS - D4 Thymin	9.99E-06
IS - 15N2 Xanthin	1.04E-05		

11.2. Optimalizace podmínek MS/MS

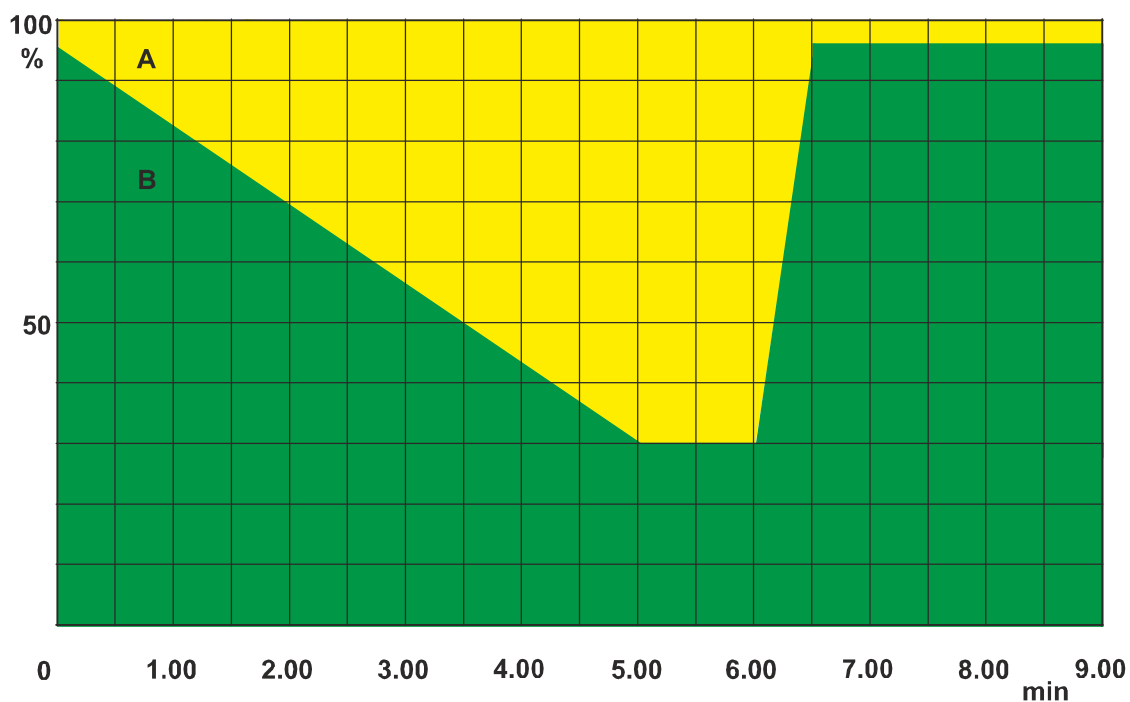
Rozpuštěné standardy byly naředěny směsí mobilních fází A a B a dávkovány přímo do iontového zdroje hmotnostního spektrometru syringe pumpou (průtok 7 μ l/min). Pro každou značenou látku bylo automaticky vyhledáno 6 nejintenzivnějších fragmentů a byl optimalizován deklasterační potenciál, vstupní a výstupní potenciál kolizní cely a kolizní energie. Optimalizace podmínek byla provedena také pro nezačtené látky, které byly původně měřeny v pozitivním módu.

Během HPLC-MS/MS analýzy byly jednotlivé látky detekovány použitím módu sledování produktu rozpadu molekulárního iontu (MRM, multiple reaction monitoring). Nejdříve byly látky identifikovány všemi 6 MRM přechody z MS/MS optimalizace a poté už pouze jedním vybraným MRM přechodem, který se vyznačoval nejvyšším poměrem signálu k šumu.

11.3. Optimalizace podmínek HPLC

Podmínky HPLC analýzy vycházejí z již dříve publikované metody (Bajad et al., 2006). Používán je systém hydrofilní interakční chromatografie (HILIC), čili polární stacionární fáze a polární mobilní fáze. Toto uspořádání je vhodné pro separaci polárních a hydrofilních látek. Ke chromatografické separaci byla použita kolona Luna (délka 100 mm, aminopropylková stacionární fáze, velikost částic 3 μ m). Na kolonu, která byla termostatovaná na 30 °C, byly nastříkovány 2 μ l vzorku. Průtok kolonou byl 0,4 ml/min. Z důvodu zkrácení analýzy ze 13 na 9 min byl upraven průběh gradientové eluce (Obr. 4). Dvousložková mobilní fáze byla složena z acetátu amonného (25 mmol/l, pH = 9,45; A) a acetonitrilu (B). Byla aplikována gradientová eluce vodného

pufru do organického rozpouštědla. Před další analýzou byla kolona 3 min ekvilibrována (Obr. 4).



Obr. 4: Průběh gradientové eluce.

11.4. Kvantifikace

Pro kvantifikaci byly vyhodnocovány poměry ploch stanovovaného analytu vůči značenému internímu standardu, vybranému na základě retenčního času při separaci na koloně a strukturní podobnosti. Koncentrace analytů ve vzorcích moči byly vztaženy na komerčně dostupné kalibrátory.

12. Validace metody

Validační parametry byly změřeny u analytů s dostupnou kalibrací a kontrolou kvality.

12.1. Preciznost

Preciznost je definována jako těsnost shody mezi naměřenými hodnotami veličiny získanými opakovanými měřeními na stejném objektu či podobných objektech za specifikovaných podmínek, tj. podmínek opakovatelnosti, mezilehlé preciznosti a reprodukovatelnosti (Terminologie z oblasti metrologie, 2010).

12.1.1. Opakovatelnost

Opakovatelnost (tzv. opakovatelnost v jednom dni, intra-assay) je definována jako těsnost shody mezi navzájem nezávislými výsledky zkoušek získanými za podmínek opakovatelnosti (Terminologie z oblasti metrologie, 2010). To znamená, že výsledky jsou získány opakovaným použitím téže zkušební metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, týmž pracovníkem, za použití shodných přístrojů a zařízení, během krátkého časového rozmezí.

Opakovatelnost byla stanovena z 10 analýz vzorků EQC, byl stanoven variační koeficient.

12.1.2. Mezilehlá preciznost

Tato vlastnost metody (dříve tzv. opakovatelnost mezi dny, inter-assay) je stanovovaná podobně jako opakovatelnost, ale měření jsou prováděna v rámci jedné laboratoře v různé dny, různými analytiky a za použití rozdílných pomůcek (Terminologie z oblasti metrologie, 2010).

Mezilehlá preciznost byla stanovena ze vzorků tzv. vnitřní kontroly kvality, tj. směs již dříve analyzovaných vzorků EQC, které se běžně analyzují společně s patientskými vzorky a jsou používány jako interní kontrola správné práce laboratoře v rámci dané metody. Bylo provedeno deset měření během deseti dnů.

12.2. Vychýlení

Vychýlení neboli bias udává rozdíl mezi střední hodnotou výsledků zkoušky a přijatou referenční hodnotou (Terminologie z oblasti metrologie, 2010). V našem případě byla stanovena jako procentuální odchylka průměrných koncentrací analytů z deseti měření ve vzorcích EQC od jejich známých koncentrací.

12.3. Linearita kalibračního vztahu

Linearitou rozumíme rozsah hodnot obsahu, množství či koncentrací, ve kterém je analytický signál lineární funkcí hodnot obsahu, množství či koncentrace. Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient. Čím více je blízký 1, tím těsnější je závislost obou proměnných a tím více je závislost lineární.

Linearita byla stanovena měřením triplikátů vzorků EQC o různých koncentracích jednotlivých analytů. Byly analyzovány 4 vzorky pro purinové a pyrimidinové látky a 4 vzorky pro ostatní látky.

12.4. Mez detekce

Mez detekce (LoD) odpovídá naměřené hodnotě koncentrace, pro kterou je pravděpodobnost nepravdivého tvrzení o nepřítomnosti látky a pravděpodobnost nepravdivého tvrzení o její přítomnosti rovno β a α (IUPAC doporučuje β a α rovno 0,05) (Terminologie z oblasti metrologie, 2010). Byla tedy hledána koncentrace, pro kterou byl analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. LoD byla stanovena jako nejnižší koncentraci analytu, při které je signál trojnásobkem šumu. Byly použity vzorky EQC s nejnižší koncentrací analytu.

12.5. Mez stanovitelnosti

Mez stanovitelnosti (LoQ) je definována jako nejnižší množství analytu ve vzorku, které může být stanoveno jako exaktní hodnota s požadovanou hodnotou nejistoty (doporučená hodnota vyjádřená jako relativní směrodatná odchylka je 10 %) (Terminologie z oblasti metrologie, 2010). LoQ byla stanovena analogicky mezi detekce, a to jako nejnižší koncentrace analytu, pro kterou je odezva signálu desetinásobkem odezvy šumu.

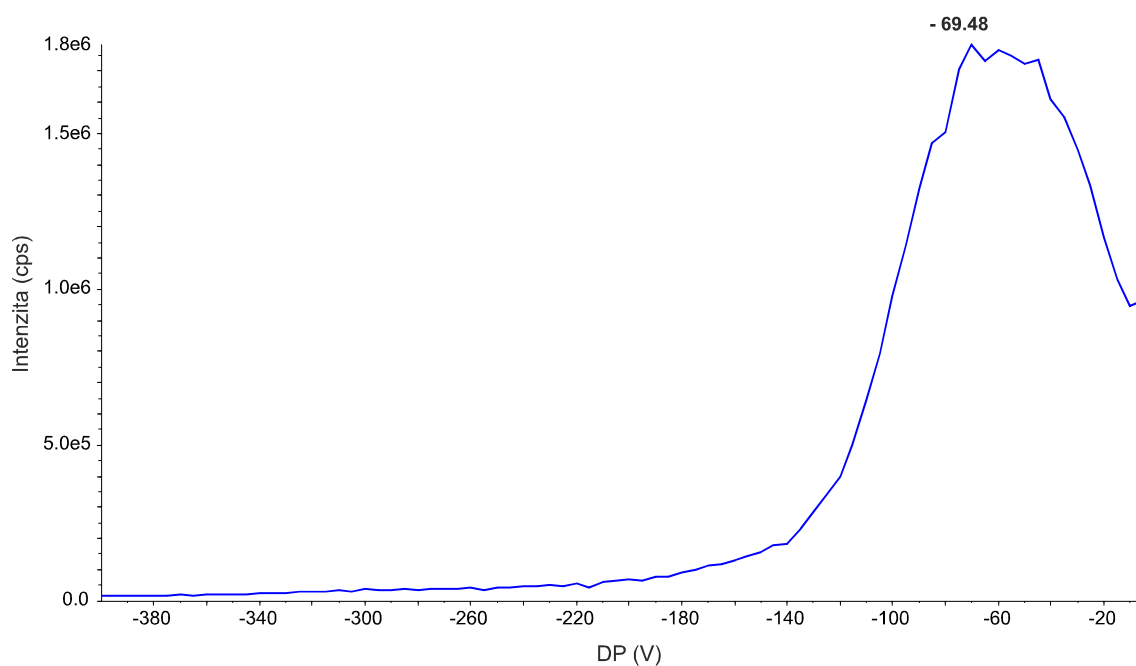
13. Stanovení referenčních rozmezí

Referenční rozmezí byla stanovena na základě již vyšetřených vzorků dětí, u nichž byla vyloučena DMP. Za pomoci statistických nástrojů aplikovaných na normální rozdělení dat byly vypočteny referenční meze (97,5tý percentil) pro jednotlivé analyty. Toto bylo určeno zvláště pro děti mladší a starší jednoho roku.

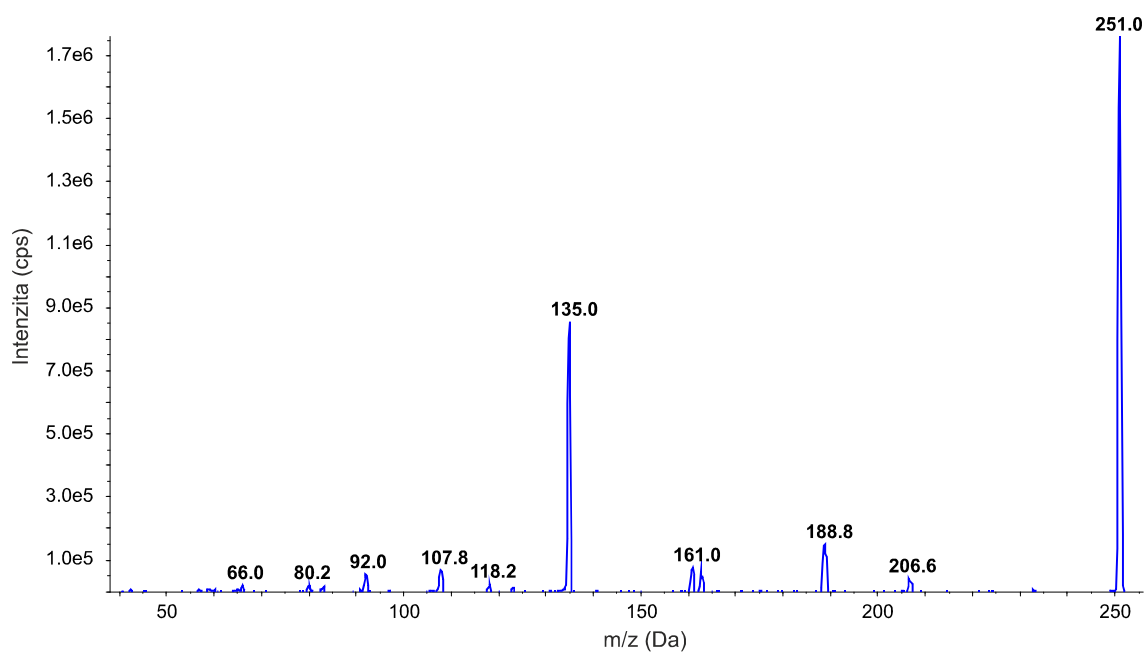
14. Výsledky

14.1. Optimalizace podmínek MS/MS

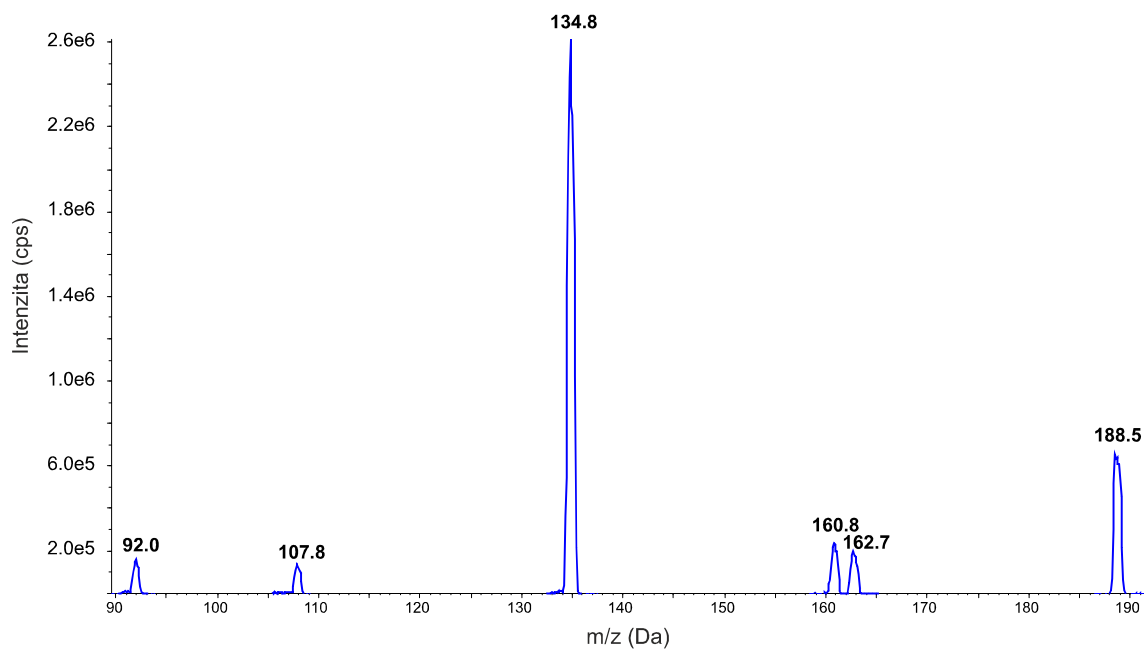
Byla změřena hmotnostní a fragmentační spektra všech požadovaných látek. Automaticky byl nastaven optimální deklasterační potenciál, následně vybráno 6 nejintenzivnějších fragmentů, u nichž byly optimalizovány vstupní (EP) a výstupní (CXP) potenciál kolizní cely a kolizní energie (CE). Jako příklad je uvedena optimalizace parametrů deoxyinosinu (Obr. 5 – 8).



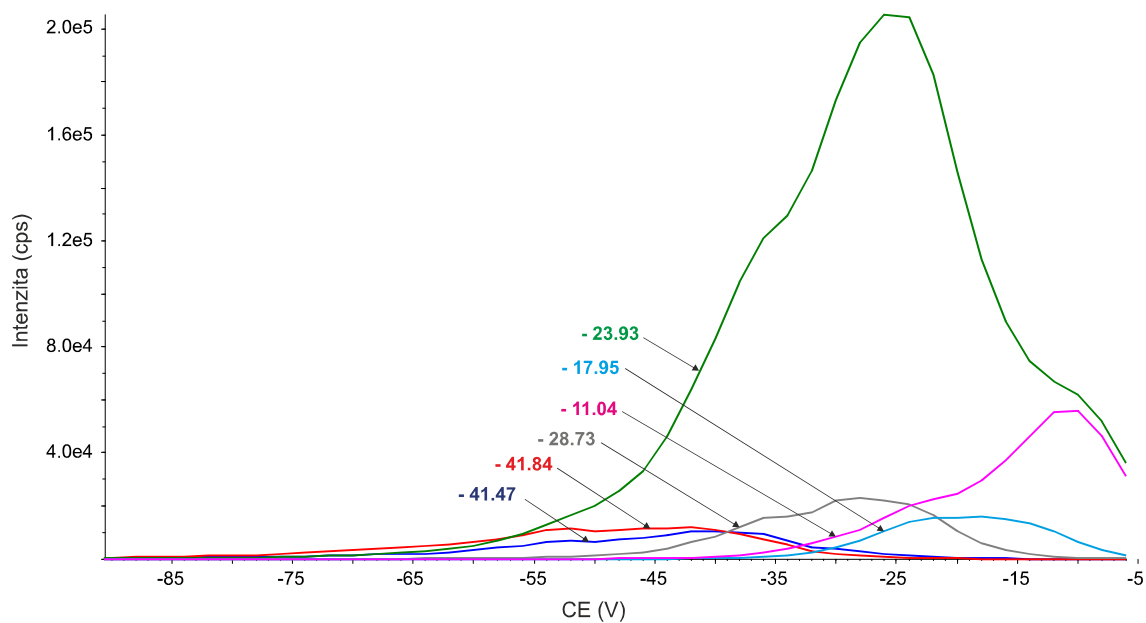
Obr. 5: Optimalizovaný DP deoxyinosinu



Obr. 6: Iničiální hmotnostní spektrum deoxyinosinu



Obr. 7: Fragmentační spektrum deoxyinosinu



Obr. 8: Optimalizované CE pro 6 fragmentů s nejvyšší intenzitou odezvy

V Tab. 5 jsou pro všechny analyty uvedeny vybrané MRM přechody, interní standard, na který je daná látka vztažena, a optimalizované hodnoty DP a CE. EP byl pro všechny látky 10 V a CXP 5 V.

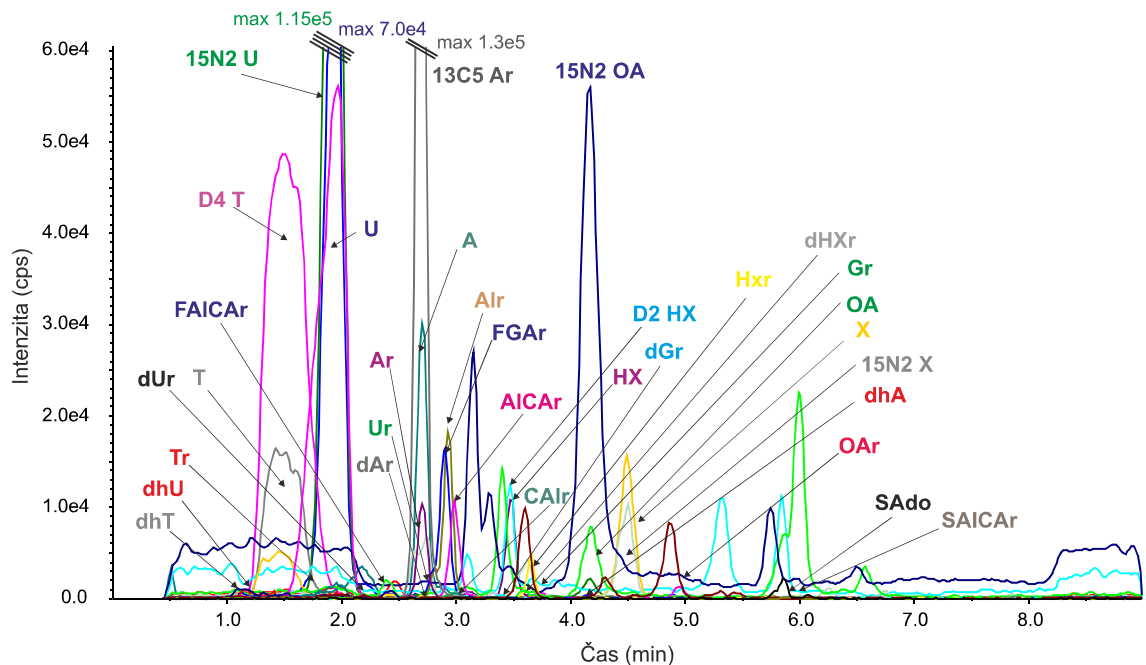
Tab. 5: Přehled molekulárních (Q1) a produktových iontů (Q2), deklasteračních potenciálů a kolizních energií jednotlivých analytů a značených standardů.

Zkratka	Analyt	Interní standard	Q1 (Da)	Q2 (Da)	DP (V)	CE (V)
A	Adenin	13C5 Ar	133.9	106.8	-60	-24
Ar	Adenosin	13C5 Ar	265.9	133.7	-40	-10
	AICAr	13C5 Ar	257.1	124.9	-60	-16
	Alr	13C5 Ar	214.0	82.0	-65	-22
	CAIr	13C5 Ar	258.0	125.9	-55	-16
dAr	Deoxyadenosin	13C5 Ar	250.0	133.8	-55	-11
dGr	Deoxyguanosin	13C5 Ar	265.9	149.9	-70	-24
dHXr	Deoxyinosin	13C5 Ar	251.0	134.8	-60	-24
dUr	Deoxyuridin	13C5 Ar	227.0	183.8	-60	-20
dhT	Dihydrothymidin	D4 T	127.0	42.0	-35	-22
dhU	Dihydrouracil	15N2 U	112.9	42.1	-40	-22
dhA	Dihydroxyadenin	13C5 Ar	166.0	123.0	-55	-16
	FAICAr	13C5 Ar	285.1	124.9	-35	-24
	FGAr	13C5 Ar	233.1	142.8	-55	-12
Gal	Galaktitol	13C6 Gal	180.9	88.9	-50	-20
GAA	Guanidinoacetát	D2 GAA	115.9	73.9	-40	-12
Gr	Guanosin	13C5 Ar	281.9	149.9	-75	-24
HX	Hypoxanthin	D2 HX	134.8	91.8	-60	-22
HXr	Inosin	13C5 Ar	266.8	134.8	-55	-24
	Kreatin	D3 Kreatin	129.9	87.7	-40	-12
	Kreatinin	D3 Kreatinin	112.0	67.8	-50	-22
OA	Orotová kyselina	15N2 OA	154.8	110.9	-35	-14
Oar	Orotidin	13C3 SA	287.0	111.0	-60	-25
	SAICAr	13C3 SA	372.9	124.9	-75	-36
SA	Sialová kyselina	13C3 SA	307.9	86.8	-55	-24
SucAc	Sukcinylacetón	D2 GAA	156.9	98.8	-35	-12
SAdo	Sukcinyladenosin	13C3 SA	382.1	206.0	-60	-20
Tr	Thymidin	D4 T	241.0	124.9	-60	-12
T	Thymin	D4 T	125.0	42.1	-45	-24
U	Uracil	15N2 U	110.9	42.1	-45	-24
Ur	Uridin	15N2 U	243.2	200.0	-60	-20
X	Xanthin	15N2 X	150.8	107.8	-60	-22
13C3 SA	13C3 Sialová kys.		311.1	89.9	-50	-22
13C5 Ar	13C5 Adenosin		271.0	133.8	-45	-12
13C6 Gal	13C6 Galaktitol		187.0	91.9	-60	-22
15N2 OA	15N2 Orotová kys.		156.9	112.8	-25	-12
15N2 U	15N2 Uracil		113.0	42.9	-55	-24
15N2 X	15N2 Xanthin		152.9	108.8	-25	-22
D2 GAA	D2 Guanidinoacetát		118.0	75.9	-50	-12
D2 HX	D2 Hypoxanthin		137.0	92.9	-50	-22
	D3 Kreatin		133.0	90.9	-40	-12
	D3 Kreatinin		115.0	67.9	-50	-22
D4 T	D4 Thymin		129.0	42.0	-40	-26

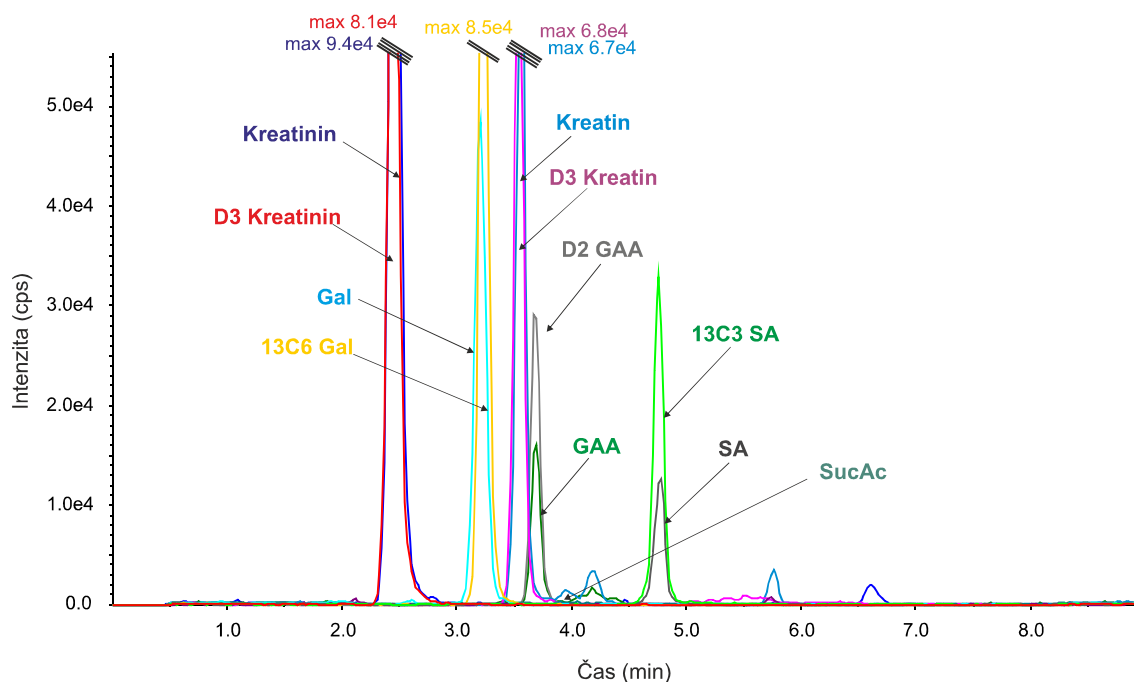
14.2. Optimalizace podmínek HPLC

Z MRM přechodů vybraných během MS/MS optimalizace byl po nástřiku standardů na kolonu vybrán pro každou látku jeden nejvhodnější (Tab. 5), a to na základě dostatečného poměru intenzity píku analytu k intenzitě šumu. Vybrané přechody byly potvrzeny nástřikem již dříve analyzovaných močí pacientů.

Jako příklad chromatografické separace je uvedena analýza kontrolního vzorku moči zdravého jedince. Na Obr. 9 vidíme purinové a pyrimidinové látky a standardy, na Obr. 10 ostatní látky.



Obr. 9: Chromatogram kontrolní moči zdravého jedince.
Purinové a pyrimidinové látky a standardy.



Obr. 10: Chromatogram kontrolní moči zdravého jedince. Ostatní látky a standardy.

14.3. Validace metody

Variační koeficient pro měření opakovatelnosti (Tab. 6) byl v rozmezí 2,23 – 10,68 %. Mezilehlá preciznost (Tab. 7) byla v rozmezí 3,35 – 17,11 %. Hodnota vychýlení bias (Tab. 8) byla < 10 %.

Tab. 6: Opakovatelnost. Deset měření během jednoho dne.

Analyt	Průměrná koncentrace (μmol/l)	CV (%)	Analyt	Průměrná koncentrace (μmol/l)	CV (%)
Adenin	230.50	7.64	Hypoxanthin	152.60	10.68
Adenosin	75.14	8.16	Inosin	50.96	8.39
AICAr	516.00	4.33	Kreatin	515.40	2.79
Deoxyadenosin	112.31	6.45	Kreatinin	9836.00	4.12
Deoxyguanosin	123.50	7.29	Orotová kys.	688.50	2.23
Deoxyinosin	104.49	5.23	Orotidin	21.53	7.27
Deoxyuridin	196.60	4.06	Sialová kys.	213.20	8.27
Dihydrothymidin	234.60	7.53	SucAc	23.04	5.25
Dihydrouracil	489.00	3.38	Thymidin	97.35	2.78
GAA	116.20	5.16	Thymin	150.30	3.06
Galaktitol	173.00	6.49	Uracil	213.60	2.77
Guanosin	182.20	6.43	Xanthin	131.80	7.00

Tab. 7: Mezilehlá preciznost. Deset měření během deseti dnů.

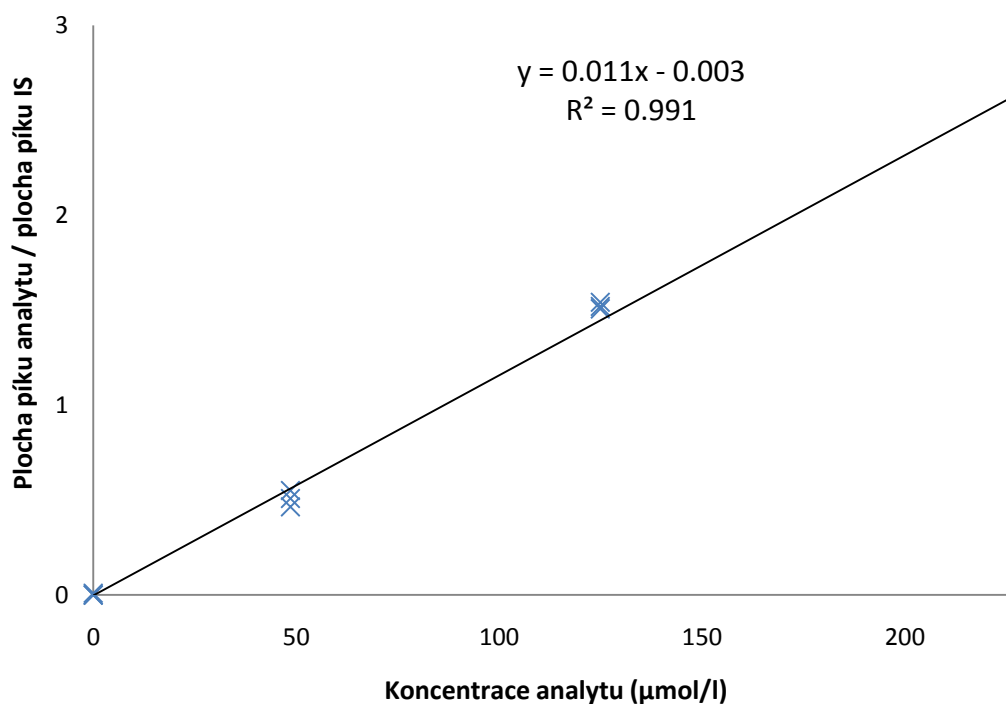
Analyt	Průměrná koncentrace (μmol/l)	CV (%)	Analyt	Průměrná koncentrace (μmol/l)	CV (%)
Adenin	29.13	14.07	Guanosin	18.60	14.23
Adenosin	15.69	11.28	Hypoxanthin	74.20	8.42
AICAr	587.40	11.12	Inosin	8.49	10.84
Kreatin	1301.00	3.35	Orotová kys.	264.80	7.68
Kreatinin	3910.00	6.77	Orotidin	4.94	12.92
Deoxyadenosin	12.36	10.35	Sialová kys.	74.85	11.40
Deoxyguanosin	10.97	10.16	Sukcinylacetone	3.00	15.07
Deoxyinosin	9.83	16.67	Thymidin	10.86	16.50
Deoxyuridin	26.38	17.11	Thymin	12.42	9.95
Dihydrouracil	217.70	16.88	Uracil	116.41	7.36
Galaktitol	753.40	7.22	Uridin	0.75	11.33
Guanidinoacetát	187.40	8.06	Xanthin	73.96	10.24

Tab. 8: Vychýlení měření.

Analyt	Průměrná naměřená koncentrace (μmol/l)	Skutečná hodnota koncentrace (μmol/l)	Vychýlení (%)
Adenin	230.5	228.0	-1.10
Adenosin	75.1	75.1	-0.05
AICAr	516.0	516.0	0.00
Deoxyadenosin	112.3	124.0	9.43
Deoxyguanosin	123.5	130.0	5.00
Deoxyinosin	104.5	104.0	-0.47
Deoxyuridin	196.6	197.0	0.20
Dihydrothymin	234.6	238.0	1.43
Dihydrouracil	489.0	494.0	1.01
GAA	116.2	116.0	-0.17
Galaktitol	173.0	173.0	0.00
Guanosin	182.2	188.0	3.09
Hypoxanthin	152.6	154.0	0.91
Inosin	51.0	50.8	-0.31
Kreatin	515.4	515.0	-0.08
Kreatinin	9836.0	9900.0	0.65
Orotová kys.	688.5	692.0	0.51
Orotidin	21.5	21.7	0.78
Sialová kys.	213.2	215.0	0.84
SucAc	23.0	23.0	-0.17
Thymidin	97.4	99.0	1.67
Thymin	150.3	150.0	-0.20
Uracil	213.6	214.0	0.19
Xanthin	131.8	134.0	1.64

Rovnice regrese, korelační koeficienty a lineární rozsah jsou uvedeny v Tab. 9. Korelační koeficient se pohybuje v rozmezí 0,931 – 0,998. Na Obr. 11 je uveden příklad lineární regrese adeninu.

Limit detekce a kvantifikace byl změřen v rozsahu 0,022 – 23,698 a 0,073 – 78,993 $\mu\text{mol/l}$ (Tab. 10).



Obr. 11: Linearita. Adenin.

Tab. 9: Linearita. Rovnice regrese, korelační koeficient a lineární rozsah koncentrací analytů.

Analyt	Rovnice regrese	Korelační koeficient R ²	Lineární rozsah koncentrací (μmol/l)
Adenin	$y = 0.011x - 0.003$	0.991	0-228
Adenosin	$y = 0.033x + 0.012$	0.998	0-104
AICAr	$y = 0.026x + 0.224$	0.996	0-516
Deoxyadenosin	$y = 0.027x + 0.009$	0.992	0-124
Deoxyguanosin	$y = 0.017x + 0.057$	0.979	0-130
Deoxyinosin	$y = 0.013x - 0.006$	0.992	0-104
Deoxyuridin	$y = 0.005x + 0.010$	0.996	0-197
Dihydrothymidin	$y = 0.0004x - 0.0010$	0.972	0-238
Dihydrouracil	$y = 0.0003x - 0.0436$	0.987	0-4500
GAA	$y = 0.016x + 0.147$	0.993	50.2-148
Galaktitol	$y = 0.008x + 0.249$	0.967	1.84-295
Guanosin	$y = 0.009x - 0.016$	0.978	0-188
Hypoxanthin	$y = 0.028x - 0.080$	0.991	11-255
Inosin	$y = 0.024x + 0.048$	0.991	4.3-100
Kreatin	$y = 0.016x + 0.038$	0.988	30-515
Kreatinin	$y = 0.002x + 0.669$	0.992	3010-13500
Orotová kys.	$y = 0.015x + 4.290$	0.951	0-2780
Orotidin	$y = 0.116x + 0.114$	0.986	0-30
Sialová kys.	$y = 0.031x - 0.481$	0.993	23-330
SucAc	$y = 0.039x - 0.037$	0.931	0-36
Thymidin	$y = 0.218x + 0.063$	0.982	0-99
Thymin	$y = 0.038x + 0.259$	0.997	0-200
Uracil	$y = 0.026x + 0.703$	0.990	14.9-989
Xanthin	$y = 0.026x - 0.019$	0.981	8.1-257

Tab. 10: Limit detekce a kvantifikace.

Analyt	LoD (μmol/l)	LoQ (μmol/l)	Analyt	LoD (μmol/l)	LoQ (μmol/l)
Adenin	1.32	4.39	Hypoxanthin	0.62	2.07
Adenosin	0.07	0.23	Inosin	0.02	0.07
AICAr	0.07	0.24	Kreatin	2.18	7.26
Deoxyadenosin	0.12	0.40	Kreatinin	12.12	40.39
Deoxyguanosin	0.09	0.29	Orotová kys.	0.59	1.98
Deoxyinosin	0.13	0.44	Orotidin	0.04	0.12
Deoxyuridin	0.29	0.98	Sialová kys.	2.26	7.54
Dihydrothymidin	1.96	6.53	SucAc	1.59	5.29
Dihydrouracil	23.70	78.99	Thymidin	0.03	0.09
GAA	1.77	5.91	Thymin	0.11	0.38
Galaktitol	0.07	0.24	Uracil	0.10	0.34
Guanosin	0.09	0.31	Xanthin	0.30	1.00

15. Referenční rozmezí

Referenční meze byly stanoveny jako 97,5tý percentil souboru dat. Bylo analyzováno 25 kontrolních vzorků moči dětí mladších jednoho roku a 25 vzorků moči dětí nad 1 rok (Tab. 11). V Tab. 12 je uveden přehled koncentrací jednotlivých analytů pacientů s diagnostikovanými DMP. Pro látky, u kterých je možný pouze kvalitativní průkaz, není koncentrace stanovitelná.

Tab. 11: Referenční rozmezí pro jednotlivé analyty.

Analyt	Referenční rozmezí (umol/mmol kr.)		Analyt	Referenční rozmezí (umol/mmol kr.)	
	< 1 rok	> 1 rok		< 1 rok	> 1 rok
Adenin	< 2	< 2	Guanosin	< 2	< 2
Adenosin	< 2	< 2	Hypoxanthin	< 50	< 30
AICAr	< 5	< 5	Inosin	< 5	< 2
Alr	-	-	Kreatin	5-600	5-1000
CAIr	-	-	Kreatinin	-	-
Deoxyadenosin	< 2	< 2	Orotová kys.	< 10	< 5
Deoxyguanosin	< 2	< 2	Orotidin	< 5	< 5
Deoxyinosin	< 2	< 2	SAICAr	-	-
Deoxyuridin	< 2	< 2	Sialová kys.	< 100	< 50
Dihydrothymin	-	-	Sukcinylaceton	< 5	< 2
Dihydrouracil	< 30	< 15	Sukcinyladenosen	-	-
Dihydroxyadenin	-	-	Thymidin	< 2	< 2
FAICAr	-	-	Thymin	< 6	< 4
FGAr	-	-	Uracil	< 20	< 20
Galaktitol	< 500	< 400	Uridin	< 2	< 2
Guanidinoacetát	< 200	< 135	Xanthin	< 70	< 30

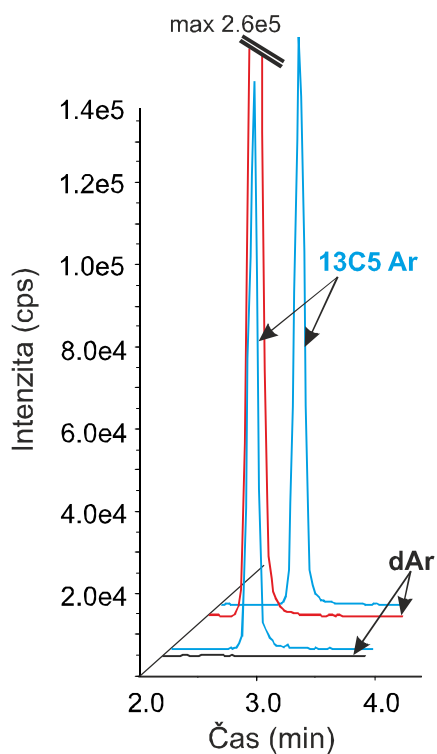
Tab. 12: Přehled koncentrací analytů v močích již diagnostikovaných pacientů. Hodnoty jsou přepočítány na mmol kreatininu. Žlutě vyznačené jsou hodnoty diagnostických markerů.

Analyt	Koncentrace (μmol/mmol kreatininu)						
	ADA	PNP	DPDH	XOD	GAMT	GAL	OA
Adenin	101.86	2.34	0.90	2.30	0.99	0.00	17.65
Adenosin	5.48	3.44	0.90	0.92	0.50	0.10	1.60
AICAr	2.19	19.53	0.90	1.84	2.08	2.00	0.00
Alr	-	-	-	-	-	-	-
CAIr	-	-	-	-	-	-	-
Deoxyadenosin	280.39	0.31	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Deoxyguanosin	1.10	290.63	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00
Deoxyinosin	38.34	251.56	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Deoxyuridin	0.00	0.16	0.90	0.00	0.00	0.00	0.00
Dihydrothymidin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Dihydrouracil	4.38	5.16	8.11	2.30	3.27	1.90	21.93
Dihydroxyadenin	-	-	-	-	-	-	-
FAICAr	-	-	-	-	-	-	-
FGAr	-	-	-	-	-	-	-
Galaktitol	198.25	264.06	131.53	306.45	280.20	24624.62	33.69
Guanidinoacetát	133.63	89.69	70.27	84.33	460.40	265.27	32.62
Guanosin	7.67	564.06	0.90	0.92	0.10	0.40	1.60
Hypoxanthin	37.24	155.47	2.70	40.09	9.21	12.71	1.60
Inosin	6.57	562.50	0.90	1.38	0.40	1.30	0.53
Kreatin	170.87	581.25	606.31	344.70	16.53	1941.94	572.19
Kreatinin	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00	1000.00
Orotová kyselina	5.48	19.69	0.90	1.38	1.39	4.60	418.18
Orotidin	3.29	52.97	0.90	0.92	1.58	0.90	5.88
SAICAr	-	-	-	-	-	-	-
Sialová kyselina	86.53	11.56	19.82	23.04	24.36	81.18	2.14
Sukcinylacetón	1.10	0.16	8.11	0.46	0.30	0.10	0.00
Sukcinyladenosin	-	-	-	-	-	-	-
Thymidin	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00
Thymin	44.91	5.47	274.77	15.21	1.29	2.70	17.11
Uracil	20.81	26.25	329.73	10.60	4.75	3.70	320.32
Uridin	2.19	1.09	0.00	0.46	0.10	0.80	4.28
Xanthin	108.43	11.09	15.32	338.71	12.38	17.32	0.53
Guanidinoacetát/kreatin					27.84		
Kreatin/Kreatinin					0.02		

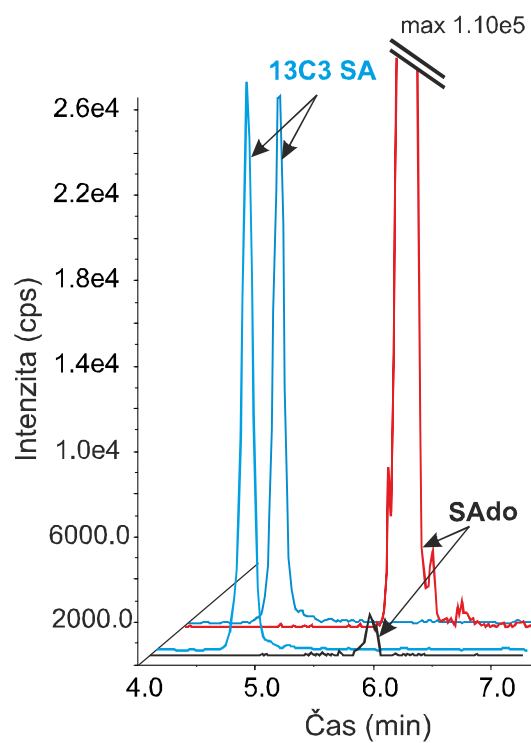
16. Analýza moči pacientů s diagnostikovanou DMP

Byly analyzovány vzorky moči pacientů s diagnostikovanou DMP a tyto vzorky byly porovnány s kontrolními vzorky zdravých pacientů (Obr. 12-20).

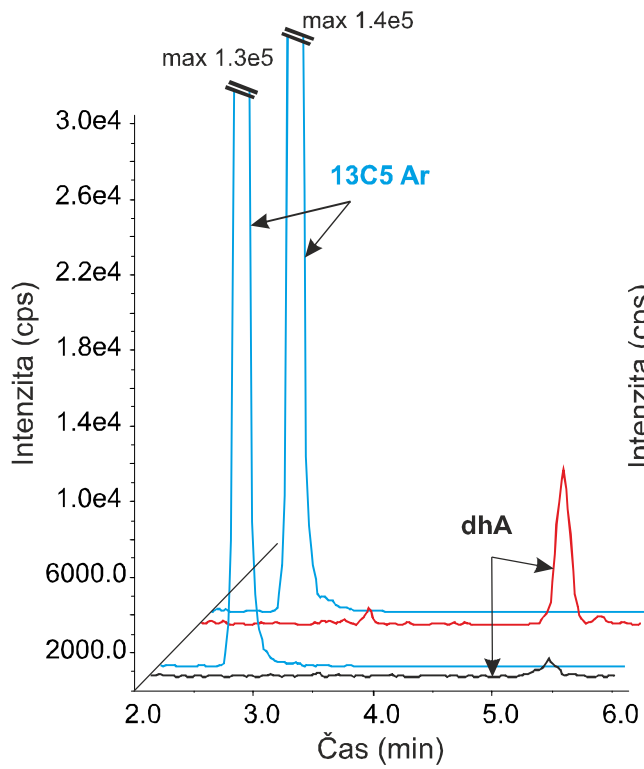
Ke každému analytu je zobrazen i odpovídající interní standard. Změřený vzorek pacienta je znázorněn červenou barvou, kontrolní vzorek černou barvou a interní standard modrou barvou.



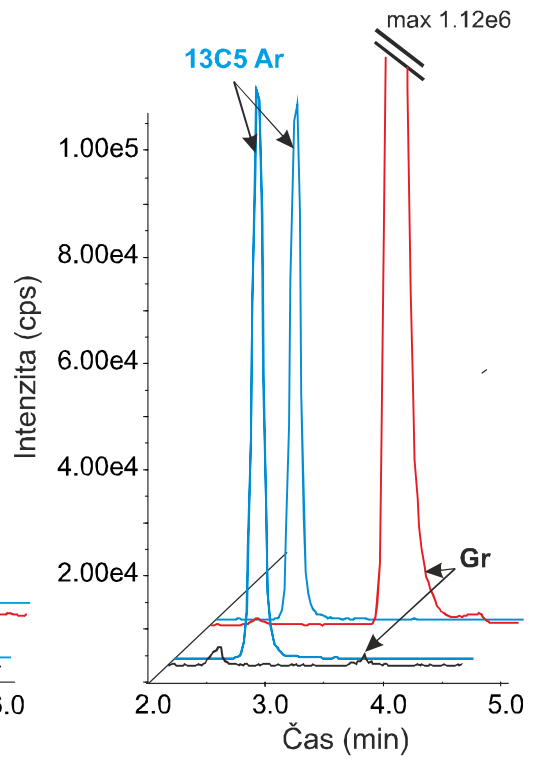
Obr. 12: Deficit ADA



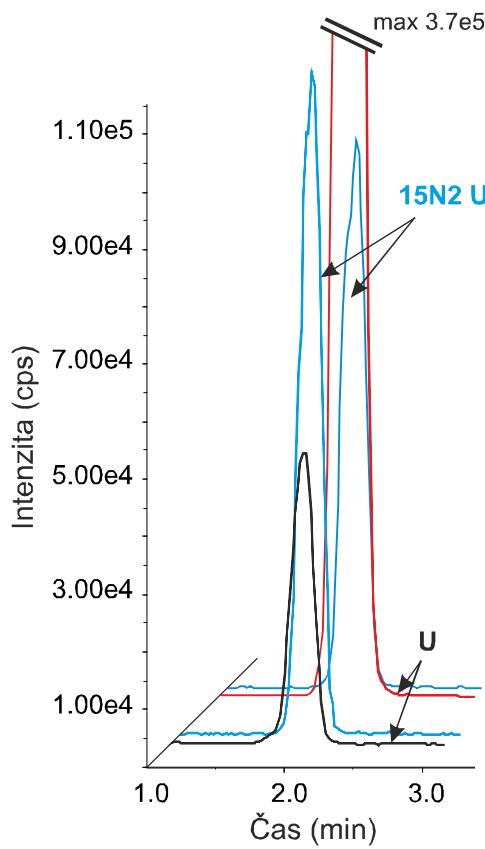
Obr. 13: Deficit ADSL



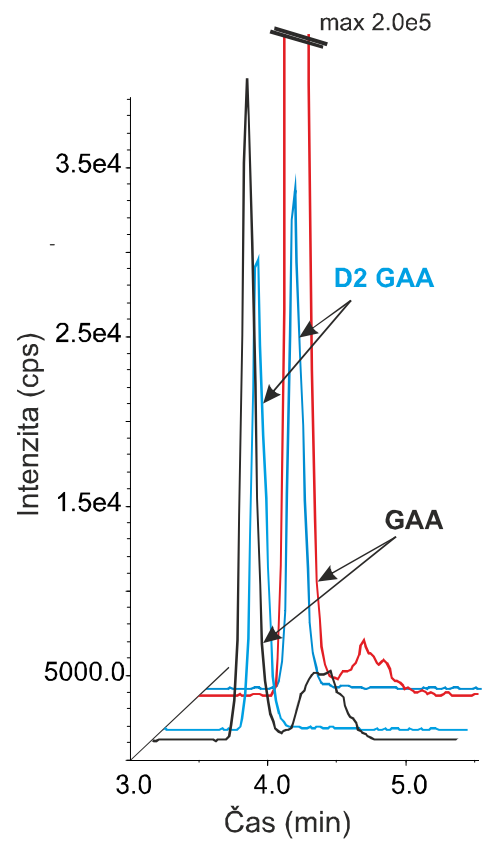
Obr. 14: Deficit APRT



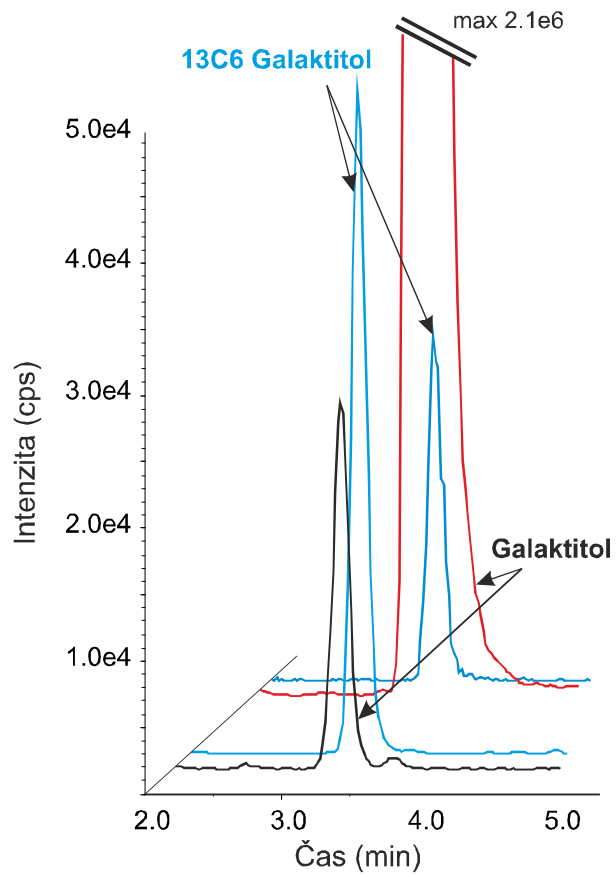
Obr. 15: Deficit PNP



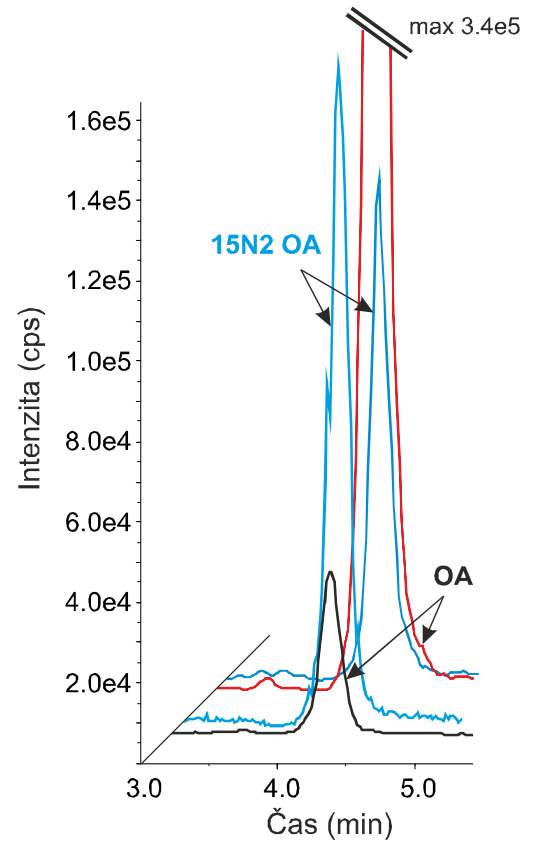
Obr. 16: Deficit DPDH



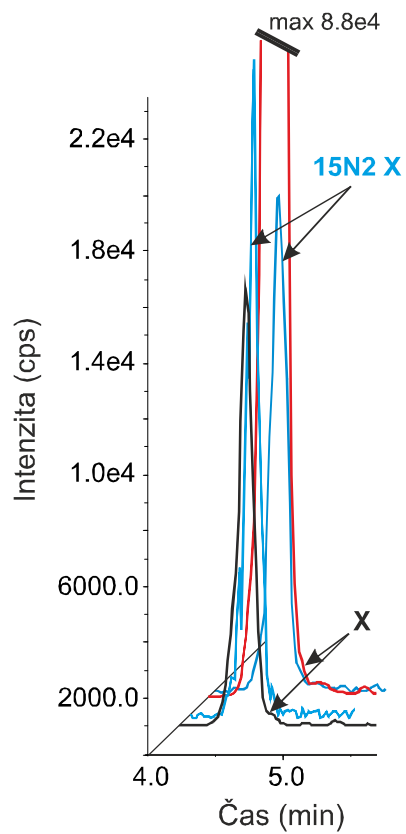
Obr. 17: Deficit GAMT



Obr. 18: Galaktosemie



Obr. 19: Orotová acidurie



Obr. 20: Deficit XOD

17. Diskuze

Cílem praktické části práce bylo vyvinout a validovat metodu analýzy močí pro diagnostiku DMP. Metoda navazuje na práci Anny Barešové z roku 2010 a liší se od ní v několika aspektech. Provedení analýzy pouze v negativním modu a zkrácení doby jedné analýzy ze 14 na 9 min výrazně snižuje celkový čas analýzy a tím urychluje získání potřebných výsledků. I když jsou látky analyzovány pouze v negativním modu, je stanovení dostatečně citlivé vzhledem ke klinickým požadavkům na analytické parametry metody. Přidání značených interních standardů přineslo zlepšení validačních parametrů a tudíž přesnější a správnější kvantifikaci.

Metoda je zaměřena hlavně na látky purinového a pyrimidinového metabolismu, a to proto, že původně nahrazuje kapilárně elektroforetickou metodu používanou v LDMP (Adam, 1999; Friedecký, 2002). V rámci tohoto stanovení byly dříve prováděny 3 analýzy vzorku: celkový screening v alkalickém pH, konfirmační analýza v kyselém pH a pro kyselinu orotovou a orotidin další analýza v kyselém pH při obrácené polaritě. Celková doba těchto tří analýz byla 18 minut a také tato metoda nebyla dostatečně robustní. Proto se začala vyvíjet metoda LC-MS/MS, do které byly kromě purinových a pyrimidinových látek zařazeny také markery dalších DMP. Kreatin, sukcinylaceton a galaktitol byly přidány jako nové, do té doby totiž nebyly v LDMP vyšetřovány. Galaktitol je důležitým diagnostickým markerem galaktosemie a v rámci metody nahrazuje marker galaktosu, která je pomocí LC-MS/MS špatně rozlišitelná od glukosy. Guanidinoacetát byl dosud na Oddělení klinické biochemie stanovován pouze kvalitativně kapkovací reakcí a kyselina sialová byla dříve stanovována spektrofotometricky.

Vyvinutá metoda je dostatečně citlivá, i když se citlivost v rámci skupin látek významně liší. Stanovení (deoxy)ribosidů je z důvodu jejich struktury a dobré fragmentace velmi citlivé, naopak stanovení sukcinylacetonu, jehož molekula je špatně ionizovatelná, je méně citlivé, ale stále pro diagnostiku plně dostačující.

Separace kapalinovou chromatografií v uspořádání HILIC dobře ukazuje, jak se jednotlivé látky separují podle své polaritě a polaritě mobilní fáze. Retence se snižuje s rostoucí polaritou mobilní fáze (čili se zvyšujícím se podílem vodného alkalického pufru k organickému rozpouštědлу) a naopak se zvyšuje s rostoucí polaritou analytu. Tedy méně polární uracil či thymin se eluují z aminopropylové kolony mezi prvními, na rozdíl od sukcinyladenosinu či SAICAr, které jsou eluovány z kolony jako poslední ze studovaných analytů (Obr. 9).

Metoda byla po úspěšné validaci aplikována na vzorky močí pacientů s diagnostikovanou DMP a kontrolní vzorky močí zdravých dětí. Rutinně se používá

v LDMP od podzimu 2012. Od té doby bylo metodou vyšetřeno několik desítek vzorků, u jedné pacientky byla diagnostikována mírná forma orotové acidurie a dalšího pacienta podezření na galaktosemii.

18. Závěr

V teoretické části byla sepsána rešerše na téma dědičné metabolické poruchy, zaměřena byla na poruchy purinového a pyrimidinového metabolismu, dále na poruchy kreatinového metabolismu, močovinového cyklu, galaktosemii, poruchy ze stáráání kyseliny sialové a tyrosinemii.

Byla vyvinuta metoda analýzy močí pomocí LC-MS/MS. Po optimalizaci podmínek HPLC a MS/MS byly stanoveny validační parametry, a to opakovatelnost, mezilehlá preciznost, LoD, LoQ, linearita a také referenční rozmezí analytů.

Metoda byla aplikována na vzorky močí diagnostikovaných pacientů a kontrolní vzorky zdravých jedinců. V současnosti je metoda součástí rutinního provozu LDMP, Oddělení klinické biochemie, FNOL.

19. Citovaná literatura

- Adam T., Friedecký D., Fairbanks L., Ševčík J., Barták P. (1999) Capillary electrophoresis for detection of inherited metabolic disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Clin. Chem.* **45**, 2086-2093.
- Arikyants N., Sarkissian A., Hesse A., Eggermann T., Leumann E., Steinmann B. (2007) Xanthinuria type I: a rare cause of urolithiasis. *Pediatr. Nephrol.* **22**, 310-314.
- Aytekin C., Dogu F., Tanir G., Guloglu D., Santisteban I. et al. (2010) Purine nucleoside phosphorylase deficiency with fatal course in two sisters. *Eur. J. Pediatr.* **169**, 311-314.
- Bajad S.U., Lu W., Kimball E.H., Yuan J., Peterson C., Rabinowitz J.D. (2006) Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* **1125**, 76-88.
- Barešová A. (2011) Development of a HPLC-TMS screening method for diagnosing of inherited metabolic disorders: master of science thesis. Univerzita Palackého v Olomouci, pp. 34-52, vedoucí práce: RNDr. David Friedecký, PhD.
- Barratt T. M., Simmonds H. A., Cameron J. S., Potter C. F., Rose G. A. et al. (1979) Complete deficiency of adenine phosphoribosyltransferase - A third case presenting as renal stones in a young child. *Arch. Dis. Child.* **54**, 25-31.
- Berry G. T., Segal, S., Gitzelmann R. (2008) Poruchy metabolismu galaktózy. In Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch. (Fernandes, J., Saudubray, J.M., van den Berghe, G., Walter, J.H., ed.) pp 157-166, TRITON, Praha.
- Blaese R. M., Culver K. W., Miller A. D., Carter Ch. S., Fleisher T. et al. (1995) T lymphocyte-directed gene therapy for ADA⁻ SCID: initial trial results after 4 years. *Science.* **270**, 475-480.
- Boenzi S., Rizzo C., Di Ciommo V. M., Martinelli D., Goffredo B. M. et al. (2011) Simultaneous determination of creatine and guanidinoacetate in plasma by

liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **56**, 792-798.

- Bordignon C., Notarangelo L. D., Nobili N., Ferrari G., Casorati G. et al. (1995) Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA⁻ immunodeficient patient. *Science* **270**, 470-475.
- Burton B. K. (1998) Inborn errors of metabolism in infancy: a guide to diagnosis. *Pediatrics* **102**, online, doi: 10.1542.
- Cassiman D., Zeevaert R., Holme E., Kvittingen E.-A., Jaeken J. (2009) A novel mutation causing mild, atypical fumarylacetoacetase deficiency (Tyrosinemia type I): a case report. *Orphanet J. Rare Dis.* **4**, online!!!
- Davidson B. L., Tarlé S. A., Palella T. D., Kelley W. N. (1989) Molecular basis of hypoxanthin-guanin phosphoribosyltransferase deficiency in ten subject determined by direct sequencing of amplified transcript. *J. Clin. Invest.* **84**, 342-346.
- Fois A., Balestri P., Farnetani M. A., Mancini G. M. S., Borgogni P. et al. (1987) Free sialic acid storage disease. *Eur. J. Pediatr.* **146**, 195-198.
- Friedecký D., Adam T., Barták P. (2002) Capillary electrophoresis for detection of inherited disorders of purine and pyrimidine metabolism: a selective approach. *Electrophoresis* **23**, 565-571.
- Hájek Z., Kulovaný E., Macek M. (2000) Základy prenatální diagnostiky, pp. 291-324, Grada Publishing, spol. s r. o., Praha.
- Hoffman G. F., Nyhan W. L., Zshocke J., Kahler S. G., Mayatepek E. (2006 a) Dědičné metabolické poruchy, pp. 41-63 , Grada Publishing, a.s., Praha.
- Hoffman G. F., Nyhan W. L., Zshocke J., Kahler S. G., Mayatepek E. (2006 b) Dědičné metabolické poruchy, pp. 339-348 , Grada Publishing, a.s., Praha.
- Chatterjea M. N., Shinde R. (2012) Textbook of medical biochemistry, 8th edition, pp. 236-237, Jaypee Brothers Medical Publishers, New Delhi.
- Jurecka A. (2009) Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* **32**, 247-263.

- Kahler S. G., Fahey M. C. (2003) Metabolic disorders and mental retardation. *Am. J. Med. Genet. C* **117**, 31-41.
- Leonard J. V. (2008) Poruchy cyklu močoviny a příbuzných enzymů. V Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch. (Fernandes J., Saudubray J.M., van den Berghe G., Walter J.H., ed.) pp 299-308, TRITON, Praha.
- Nassogne M.-C., Henrot B., Aubert G., Bonnier Ch., Marie S. et al. (2000) Adenylosuccinase deficiency: an unusual cause of early-onset epilepsy associated with acquired microcephaly. *Brain Dev.* **22**, 383-386.
- Nelson D.L., Cox M.M. (2008) Lehninger principles of biochemistry, pp. 354-355, W.H. Freeman and Company, New York.
- Nyhan W. L. (2005) Disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Mol. Genet. Metab.* **86**, 25-33.
- Page T., Yu A., Fontanesi J., Nyhan W. L. (1997) Developmental disorder associated with increased cellular nucleotidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 11601-11606.
- Racek J., Eiselt J., Friedecký B., Holeček V., Nekulová M., Pittrová H. (2006) Klinická biochemie, pp.259-268, Galén, Praha.
- Stöckler-Ipsiroglu S., Salomons G. S. (2008) Syndromy s deficitem kreatinu. V Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch. (Fernandes J., Saudubray J.M., van den Berghe G., Walter J.H., ed.) pp 247-253, TRITON, Praha.
- Stromberger C., Bodamer O. A., Stöckler-Ipsiroglu S. (2003) Clinical characteristics and diagnostic clues in inborn errors of creatine metabolism. *J. Inherit. Metab. Dis.* **26**, 299-308.
- Struys E. A., Verhoeven N. M., Jakobs C. Creatine and its metabolites (2008) In Laboratory guide to the methods in biochemical genetics. (Blau N., Duran M., Gibson K. M., ed.) pp. 739-741, Springer, Berlin.
- Šťastná S. (2008) Laboratorní diagnostika dědičných metabolických poruch. *Medicína pro praxi* **5**, 274-276.

- Torres R. J., Puig J. G. (2010) Lesch-Nyhan syndrome. *Drug Future*. **35**, 421-427.
- van den Berghe G., Vincent M.-F., Marie S. (2008) Poruchy metabolismu purinů a pyrimidinů. V *Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch*. (Fernandes J., Saudubray J.M., van den Berghe G., Walter J.H., ed.) pp 479 – 496, TRITON, Praha.
- van Gennip A. H., Abeling N. G. G. M., Vreken P., van Kuilenburg A. B. P. (1997) Inborn errors of pyrimidine degradation: clinical, biochemical and molecular aspects. *J. Inher. Metab. Dis.* **20**, 203-213.
- van Kuilenburg A. B. P., Dobritzsch D., Meijer J., Krumpel M., Selim L. A. et al. (2012) β -ureidopropionase deficiency: phenotype, genotype and protein structural consequences in 16 patients. *Biochim. Biophys. Acta* **1822**, 1096-1108.
- Voet D., Voet J. G. (1995) *Biochemistry*, 2nd Edition, pp. 283-284, John Wiley & Sons, Inc., Somerset, New Jersey.
- Votava F., Kožich V., Šťastná S., Chrastina P., Adam T., Friedecký D. et al. (2010) Novorozenecký screening v České republice. *Postgraduální medicína* **12**, 785-795.
- Warang P., Kedar P., Ghosh K., Colah R. (2012) A new simple approach for the determination of pyrimidine 5'-nucleotidase activity in human erythrocytes using an ELISA reader. *Int. J. Lab. Hematol.* **34**, 232-236.
- Wraith J. E. (2008) Mukopolysacharidózy a oligosacharidózy. V *Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch*. (Fernandes J., Saudubray J.M., van den Berghe G., Walter J.H., ed.) pp 547-559, TRITON, Praha.
- Terminologie z oblasti metrologie (2010). Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, pp. 55-89, Praha.

20. Použité zkratky

A	adenin
ADA	adenosindeaminasa
ADSL	adenylosukcinátlyasa
AGAT	L-argininglycinamidinotransferasa
AICAR/r	aminoimidazolkarboxamidribotid/ribosid
AIR/r	aminoimidazolribotid/ribosid
APRT	adeninfosforibosyltransferasa
Ar	adenosin
CAIR/r	karboxaminoimidazolriboti/ribosid
CDP	cytidindifosfát
CE	kolizní energie
CMP	cytidinmonofosfát
CTP	cytidintrifosfát
CXP	výstupní potenciál kolizní cely
CV	variační koeficient
dAr	deoxyadenosin
dGr	deoxyguanosin
dhA	dihydroxyadenin
DHP	dihydropyrimidinamidohydrolasy
dHXr	deoxyinosin
dhT	dihydrothymin
dhU	dihydrouracil
DMP	dědičná metabolická porucha
DP	deklasterační potenciál

DPDH	dihydropyrimidindehydrogenasy
dUr	deoxyuridin
EP	vstupní potenciál kolizní cely
EQC	externí kontrola kvality
FAA	fumarylacetoacetátu
FAICAR/r	formylamidoimidazolkarboxamidribotid/ribosid
FGAR/r	formylglycinamidribotid/ribosid
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
GAA	guanidinoacetát
GALK	galaktokinasa
GALT	galaktosa-1-fosfáturidylyltransferasa
GAMT	S-adenosyl-L-methionin N-guanidinoacetátmethyltransferasa
Gal	galaktitol
Gr	guanosin
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HGPRT	hypoxanthinguaninfosforibosyltransferasa
HX	hypoxanthin
HXr	inosin
IS	interní standard
ISSD	infantilní porucha se střeďáním volné kyseliny sialové
IUPAC	Mezinárodní unie pro čistou a aplikovanou chemii
LDMP	Laboratoř dědičných metabolických poruch
LoD	limit detekce
LoQ	limit kvantifikace

MRM	sledování produktu rozpadu molekulárního iontu
OA	kyselina orotová
OAr	orotidin
OTC	ornithintranskarbamylasa
PNP	purinnukleosidfosforylaza
PRPP	fosforibosylpyrofosfát
SA	kyselina sialová
SAA	sukcinylacetoacetát
Sado	sukcinyladenosin
SAICAR/r	sukcinylaminoimidazolkarboxamidribotid/ribosid
S-AMP	adenylosukcinát
SCID	těžký kombinovaný imunodeficit
SLC6A8	X-vázaný Na a Cl dependentní přenašeč kreatinu
SucAc	sukcinylaceton
T	thymin
TMP	thymidinmonofosfát
Tr	thymidin
TTP	thymidintrifosfát
U	uracil
UDP	uridindifosfát
UMP	uridinmonofosfát
Ur	uridin
UTP	uridintrifosfát
X	xanthin