

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Diagnostika vybraných dědičných metabolických poruch novorozeneckého screeningu pomocí HPLC-MS/MS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Stanislava Pavlíková
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Hana Janečková, Ph. D.
Konzultant práce:	RNDr. David Friedecký, Ph. D.
Rok:	2015

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne 30. 4. 2015

Bc. Stanislava Pavlíková

Ráda bych poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Haně Janečkové, Ph.D. za trpělivost a milý přístup, se kterými mě provázela celé dva roky. Děkuji také RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D. za jeho rady a kolektivu Laboratoře dědičných metabolických poruch za vstřícný přístup a vytváření milého pracovního prostředí.

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) a Národním programem udržitelnosti I (LO1304).

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora	Bc. Stanislava Pavlíková
Název práce	Diagnostika vybraných dědičných metabolických poruch novorozeneckého screeningu pomocí HPLC-MS/MS
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc
Vedoucí práce	Mgr. Hana Janečková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	<p>Vzhledem k plánovanému rozšíření novorozeneckého screeningu v roce 2015 bylo cílem práce vyvinout druhostupňovou HPLC-MS/MS metodu, která by umožňovala potvrzení vybraných dědičných metabolických poruch. Byla vyvinuta a validována metoda, kterou je možno stanovit v suché krevní skvrně methionin, homocystein a cystathionin, což jsou důležité markery poruch metabolismu methioninu a kobalaminů. Dále jsou do metody zahrnuty methylmalonát a methylcitrát, jejichž stanovení může být v rámci selektivního screeningu využito pro diagnostiku methylmalonové acidurie a propionové acidemie. Metoda byla aplikována na vzorky pacientů s diagnostikovanou metabolickou poruchou a na více než 500 krevních skvrn novorozenců, ze kterých byla stanovena referenční rozmezí pro jednotlivé analyty.</p>
Klíčová slova	Dědičné metabolické poruchy, novorozenecký screening, metabolismus methioninu, validace, kapalinová chromatografie, tandemová hmotnostní spektrometrie
Počet stran	61
Počet příloh	0
Jazyk	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Autor's first name and surname	Bc. Stanislava Pavlíková
Title	Diagnosis of selected inherited metabolic diseases from newborn screening using HPLC-MS/MS.
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory for Inherited Metabolic Disorders, Department of Clinical Biochemistry, University Hospital, Olomouc.
Supervisor	Mgr. Hana Janečková, Ph.D.
The year of presentation	2015
Abstract	<p>Regarding to the planned extension of the newborn screening in 2015, the aim of the work was to develop 2nd tier HPLC-MS/MS method that would enable the confirmation of selected inherited metabolic diseases. A method was developed and validated, it can be used for determination of methionine, homocysteine and cystathionine in dried blood spot. These metabolites are important markers of disorders in methionine and cobalamine metabolism. Methylmalonate and mehylcitrate are also included in the method, their determination can be used for methylmalonic aciduria and propionic academia diagnosis within selective screening. Method was applied to patients' samples and also more than 500 newborns' dried blood spots and the reference ranges were established.</p>
Keywords	Inherited metabolic diseases, newborn screening, methionine metabolism, validation, liquid chromatography, tandem mass spectrometry
Number of pages	61
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

Cíle práce.....	8
1. Úvod.....	9
2. Současný stav dané problematiky.....	10
2.1 Dědičné metabolické poruchy	10
2.2 Novorozenecký screening	11
2.2.1 Novorozenecký screening v České Republice	11
2.3 Příčiny, klinické projevy a léčba vybraných DMP.....	12
2.3.1 Metabolismus methioninu a homocysteinu	12
2.3.2 Homocystinurie	14
2.3.2.1 Deficitu cystathion- β -synthasy.....	14
2.3.2.2 Deficit 5, 10-methylentetrahydrofolátreduktasy	16
2.3.2.3 Poruchy metabolismu kobalaminu	17
2.3.3 Deficit methionin-S-adenosyltransferasy	18
2.3.4 Deficit S-adenosylhomocysteinhydrolasy	18
2.3.5 Deficit glycin-N-methyltransferasy.....	19
2.3.6 Nutriční deficit vitamínu B ₁₂ u matky novorozence	19
2.3.7 Deficit methylmalonyl-CoA mutasy	20
2.3.8 Deficit propionyl-CoA karboxylasy.....	21
2.4 Odběrový materiál pro novorozenecký screening.....	21
2.4.1 Whatman protein saver cards	21
2.4.2. Odběr krve pro NBS dle legislativy ČR.....	21
2.5 Příprava a analýza suchých krevních skvrn	22
2.5.1 Obecný postup	22
2.5.2 Výhody a nevýhody.....	23
2.5.3 Metody analýzy krevních skvrn	23
2.5.4 Laboratorní vyšetření KS v České Republice	24
2.6 Stabilita Krevních skvrn.....	24
2.7 Validace.....	24
2.7.1 Definice validace	24
2.7.2 Správnost metody	24
2.7.3 Přesnost metody	25
2.7.4 Linearita.....	25
2.7.5 Mez detekce a stanovitelnosti.....	26
3. Experimentální Část.....	27
3.1 Úvod	27
3.2 Materiál a vybavení	29

3.2.1 Chemikálie.....	29
3.2.2 Přístrojové vybavení.....	29
3.2.3 Biologický materiál	29
3.2.4 Příprava vzorků	30
3.2.4.1 Příprava dithiothreitolu.....	30
3.2.4.2 Příprava suchých krevních skvrn pro kalibraci a validaci.....	30
3.2.4.3 Příprava mobilních fází pro LC.....	30
3.3 Metody.....	32
3.3.1 Příprava směsi značených standardů	32
3.3.2 Optimalizace chromatografických podmínek	32
3.3.3 Optimalizace MS/MS podmínek	32
3.3.4 Kvantifikace	33
4. Výsledky	34
4.1 Optimalizace podmínek HPLC	34
4.2 Optimalizace podmínek MS/MS	37
4.3 Výpočet skutečných koncentrací analytů v KS.....	38
4.4 Validační parametry	41
10.4.1 Správnost metody	41
10.4.2 Přesnost metody	42
10.4.3 Linearita.....	43
10.4.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti.....	46
4.4 Referenční rozmezí.....	46
4.5 Analýza krevních skvrn s diagnostikovanou poruchou.....	53
5. Diskuze	55
6. Závěr.....	57
Literatura	58
Seznam použitých zkratk	61

CÍLE PRÁCE

- Vypracování rešerše zaměřené na dědičné metabolické poruchy metabolismu methioninu a metody přípravy a analýzy krevních skvrn.
- Vývoj a validace druhostupňové diagnostické HPLC-MS/MS metody pro analýzu suchých krevních skvrn novorozenců.
- Aplikace metody na vzorky pacientů a zavedení do rutinního provozu.

1. ÚVOD

Tato práce se zabývá diagnostikou dědičných metabolických poruch (DMP) v metabolismu methioninu. V rámci připravovaného rozšíření novorozeneckého screeningu (NBS) byla v Laboratoři dědičných metabolických poruch Fakultní nemocnice Olomouc (LDMP FNOL) vyvíjena druhostupňová (tzv. „second-tier“) metoda, která umožňuje potvrzení výsledků primárního novorozeneckého screeningu a to v případě zjištěných abnormalit v koncentraci methioninu. Metoda zahrnuje analýzu methioninu (MET), homocysteinu (HCY) a cystathioninu (CYSTA), jejichž koncentrace v porovnání s referenčními rozmezími ukážou, zda novorozenec trpí některou z DMP metabolismu methioninu. Zároveň jsou v metodě zařazeny analyty methylmalonát (MMA) a methylcitrát (MCA), jejichž stanovení umožní potvrzení deficitu methylmalonyl-CoA mutasy nebo propionyl-CoA karboxylasy, obě tyto poruchy se totiž vyznačují zvýšenou koncentrací propionylkarnitinu. Tyto poruchy sice nejsou zařazeny v celoplošném screeningu, ale jejich diagnostika probíhá v rámci selektivního screeningu. Metoda tedy bude mít dvoje uplatnění.

V teoretické části této práce jsou uvedeny obecné informace o novorozeneckém screeningu, dále stručný popis vybraných dědičných metabolických poruch. Je též diskutováno použití suchých krevních skvrn jako diagnostického materiálu a shrnuty poznatky týkající se validace metody.

V rámci experimentální části jsou uvedeny postupy optimalizace a výsledky validace metody. Vyšetřením více než 500 krevních suchých skvrn byla stanovena referenční rozmezí pro jednotlivé analyty.

2. SOUČASNÝ STAV DANÉ PROBLEMATIKY

2.1 DĚDIČNÉ METABOLICKÉ PORUCHY

Dědičné poruchy metabolismu jsou onemocnění, jejichž příčinou jsou mutace DNA. Jsou tedy geneticky podmíněné a primárně je postižena určitá metabolická dráha. Výsledkem bývá celé spektrum klinických příznaků.

V současné době je známo okolo 900 DMP, všechny patří do skupiny vzácných onemocnění, mají kumulativní incidenci 1:500 (Honzík, 2011). Jejich společným znakem je přítomnost biochemických či enzymových odchylek zjištěných pouze speciálním vyšetřením (Kožich, 2010).

V závislosti na typu mutace rozlišujeme DMP monogenní (defekt v jednom genu), polygenní a multifaktoriální (příčinou je kombinace defektů v několika genech a vliv vnějších faktorů) a chromosomální. Mohou být dědičné autosomálně recesivně, vzácně autosomálně dominantně, gonosomálně dominantně či recesivně, vyskytují se i onemocnění s mitochondriální dědičností (Martásek a Svačina, 2010).

Včasné zjištění diagnózy je u léčitelných poruch zásadní, protože nasazení léčby zabraňuje rozvinutí a prohlubování příznaků a vede ke zlepšení kvality života postiženého jedince. Diagnostika u neléčitelných poruch je také důležitá, z důvodu optimalizace symptomatické léčby, genetického poradenství a prenatální diagnostiky v postižených rodinách a také proto, že u jedince lze předpokládat další komplikace související s jeho onemocněním, což umožňuje zacílit další léčbu (Honzík, 2011).

Klinické projevy jsou velmi rozmanité, protože u pacienta dochází k poškození více různých orgánů a tkání. Příznaky se také liší v závislosti na závažnosti poruchy. DMP se mohou projevit už během prenatálního vývoje, nejčastěji se příznaky objeví v novorozeneckém či dětském věku, mohou se ale projevit až v pubertě či dospělosti. (Honzík, 2011).

Léčba se odvíjí od typu a závažnosti poruchy. Častá je dietoterapie spojená s podáváním speciálních preparátů, vitaminů, farmakologických chaperonů, rekombinantních enzymů nebo s dialýzou. Cílem je suplementovat nedostatečnou funkci metabolické dráhy, zamezit tvorbě toxických produktů nebo je eliminovat z organismu. Moderní medicína umožňuje také transplantaci kmenových buněk a postižených orgánů (Kožich 2010).

2.2 NOVOROZENECKÝ SCREENING

V 60. letech 20. století vyvinul americký mikrobiolog Robert Guthrie bakteriální inhibiční test k detekci zvýšených koncentrací fenylalaninu v suchých krevních kapkách, který později umožnil cílené a plošné testování dětí, stejně jako vyšetření vzorků pacientů, u kterých bylo podezření na fenylketonurii (Hoffmann et al., 2006). Bylo zjištěno, že pacienti trpící touto chorobou mohou být léčeni speciální dietou zavedenou Horstem Bickelem a včasné určení diagnózy tak předchází závažným klinickým projevům onemocnění (Pitt, 2010). Postupně se u novorozenců začalo testovat více onemocnění a pro takovéto plošné vyhledávání některých chorob se vžilo pojmenování novorozenecký screening. Počet a typ testovaných onemocnění se v jednotlivých státech liší, stejně jako používané diagnostické metody (Carroll a Downs, 2006).

V roce 2011 byla v rámci evaluace populačního novorozeneckého screeningu v EU vydána shrnující zpráva, která uvádí počet poruch zjišťovaných v jednotlivých zemích Evropy. Data byla vztažena k 1. září roku 2010. V té době bylo nejvíce poruch v rámci screeningových programů a výzkumných studií vyhledáváno v Rakousku (29), Španělsku (27), Maďarsku (25) a na Islandu (26). Naopak mezi země s nejnižším počtem vyhledávaných poruch patřily Finsko (1), Estonsko (2), Rumunsko (2), Srbsko (2) a v Albánii screening vůbec neprobíhal (Burgard et al., 2011).

2.2.1 Novorozenecký screening v České Republice

V ČR je v současné době aktivně a celoplošně vyhledáváno 13 poruch, z nichž 10 řadíme k DMP. Jedná se o poruchy metabolismu aminokyselin (fenylketonurie a leucinosu), organické acidurie (glutarová a isovalerová acidurie), poruchy metabolismu a transportu mastných kyselin (MK; deficit acyl-CoAdehydrogenasy MK se středně dlouhým řetězcem a velmi dlouhým řetězcem, deficit 3-hydroxylacyl-CoAdehydrogenasy MK s dlouhým řetězcem, deficit karnitinpalmitoyltransferasy I a II a deficit karnitinacylkarnitintranslokasy). Společným znakem těchto poruch je, že včasná diagnóza umožňuje nasazení léčby, která zásadním způsobem zlepšuje kvalitu života nemocného.

V roce 2013 probíhal na našem území pilotní projekt, jehož cílem bylo rozšíření NBS a zlepšení zachytu některých onemocnění, která jsou v rámci NBS diagnostikována. Se souhlasem rodičů byly suché krevní skvrny novorozenců po vyšetření poruch zahrnutých v klasickém NBS použity pro screeningovou studii

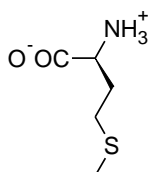
zaměřenou na záchyt argininemie, citrulinemie, homocystinurie z důvodu deficitu cystathion- β -synthasy, defektu methylenetetrahydrofolát reduktasy a poruchy remethylace a methioninemie z důvodu deficitu methioninadenosintransferasy. Výsledkem této studie je připravované rozšíření NBS, které bude během roku 2015 uvedeno do praxe.

Tématem experimentální části této diplomové práce je diagnostická metoda zaměřená na poruchy metabolismu methioninu a homocysteinu. Další kapitola bude proto věnována těmto DMP.

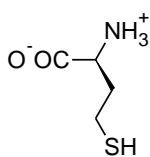
2.3 PŘÍČINY, KLINICKÉ PROJEVY A LÉČBA VYBRANÝCH DMP

2.3.1 Metabolismus methioninu a homocysteinu

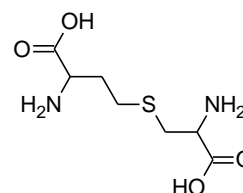
Methionin (Obr. 1) a homocystein (Obr. 2) jsou sirné aminokyseliny, jejichž metabolická přeměna spolu úzce souvisí. HCY vzniká demethylací MET, který pochází z potravy. Může být zpětně remethylován na MET nebo kondenzuje se serinem za vzniku cystathioninu (Obr. 3). Remethylace může probíhat dvěma způsoby. První způsob probíhá hlavně v játrech, ledvinách a mozku. Při něm je na HCY přenášena methylová skupina z 5-methyltetrahydrofolátu (5-methyl-THF), reakce je katalyzována 5-methyl-THF-homocysteinmethyltransferasou v přítomnosti methylkobalaminu. Druhý způsob probíhá pouze v játrech a methylová skupina je přenášena na HCY z betainu v reakci katalyzované betain-homocysteinmethyltransferasou. Vzniklý MET je dále aktivován na S-adenosylmethionin (SAM), ze kterého po odevzdání methylové skupiny vzniká S-adenosyl-homocystein. Ten je hydrolyzován na HCY, čímž se cyklus uzavírá. Při bazálním příjmu MET v potravě prochází molekula HCY remethylačním cyklem 1,5-2 krát. Snížený přísun bílkovin způsobí zvýšený průchod HCY cyklem (3,5krát). Vysoký přísun MET je spojen s rychlou přeměnou MET na SAM, který způsobí snížení tvorby methyl-THF a naopak aktivuje tvorbu cystathioninu cystathion- β -syntasou (Žák a Zeman, 2010). Schéma příslušných drah a zapojených enzymů je na Obr. 4.



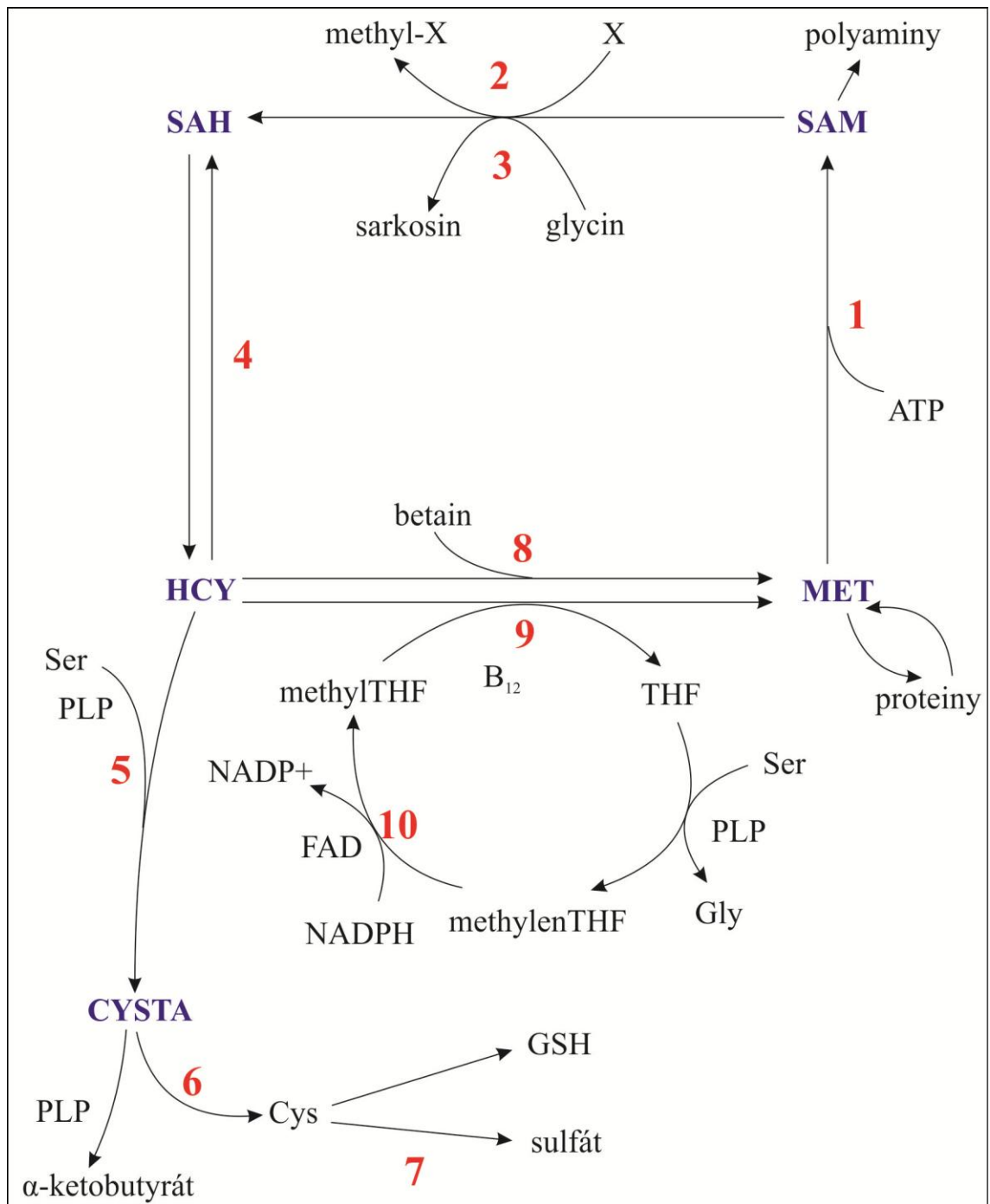
Obr. 1: Methionin



Obr. 2: Homocystein



Obr. 3: Cystathionin



Obr. 4: Metabolismus MET a HCY

- 1: methionin-S-adenosyltransferasa
- 2: SAM-dependentní transmethylace
- 3: glycin-N-methyltransferasa
- 4: SAH hydrolasa
- 5: cystathionin- β -syntasa

- 6: γ -cystathioninasa
- 7: sulfidoxidasa
- 8: betain-HCY methyltransferasa
- 9: methioninsynthasa
- 10: 5,10-methylen-THF reduktasa

SAM – S-adenosyl-methionin, SAH – S-adenosyl-homocystein, CYSTA – cystathionin, THF – tetrahydrofolát, GSH – glutathion, PLP – pyridoxal-5-fosfát, Cys – cystein, X – akceptor methylové skupiny, methyl-X – methylovaný akceptor. (Podle Žák a Zeman, 2010)

V rámci metabolické dráhy methioninu se můžeme setkat s několika DMP:

2.3.2 Homocystinurie

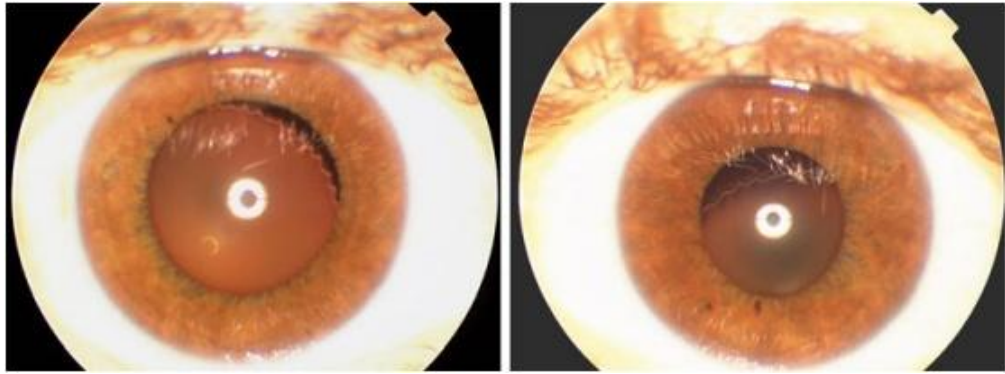
Homocystinurie (někdy se užívá termínu homocysteinurie, homocystin je oxidovaná dimerní forma homocysteinu) je termín pro skupinu onemocnění charakteristických zvýšenými koncentracemi HCY v plasmě a moči. Je způsobena genetickými poruchami metabolismu MET, HCY a transkobalaminu. Tato porucha byla objevena v roce 1962 v rámci testování močí mentálně retardovaných pacientů na přítomnost netypických aminokyselin. O dva roky později bylo demonstrováno, jaká metabolická dráha je poškozena (Mudd et al, 1985). Ovšem hyperhomocystinemie (nefyziologické zvýšené hladiny HCY v organismu) bývá pozorována i u lidí s nedostatečným příjmem vitamínu B₆, B₁₂ a kyseliny listové (Iacobazzi et al., 2014).

2.3.2.1 Deficitu cystathion-β-synthasy

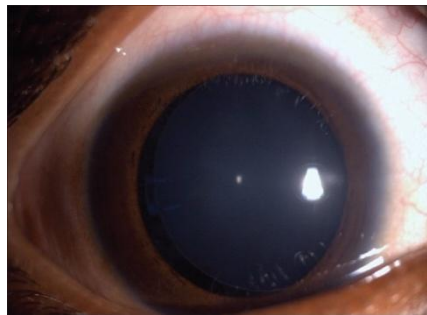
Cystathionin-β-syntasa (EC 4.2.1.22) katalyzuje konverzi HCY na CYSTA. Reakce je vstupní bránou k dalším důležitým biochemickým procesům, např. syntéze glutathionu, významné komponentě detoxifikačních procesů buňky. Dále takto dochází k odbourání přebytečných sírných aminokyselin (Iacobazzi et al., 2014).

Tento typ homocystinurie je dědičný autosomálně recesivně. Vede ke hromadění MET, HCY a jejich S-adenosylderivátů v tkáních, k nedostatku cystathioninu a nízkým hladinám cysteinu. Je spojen se závažným postižením očí, kostry, centrálního nervového systému a vaskulárního systému (Andria et al., 2008).

Postižení očí je způsobeno dislokací očních čoček (např. subluxe – vychýlení čočky mimo osu oka, Obr. 5), bývá přítomna krátkozrakost a glaukom. Může se objevit odchlípení a degenerace sítnice nebo katarakta. Mezi nálezy na kostech patří skoliosa (Obr. 6), knoflíkovitá kolena, omezená hybnost kloubů, bikonkávní a zploštělé intervertebrální disky (Andria et al., 2008).

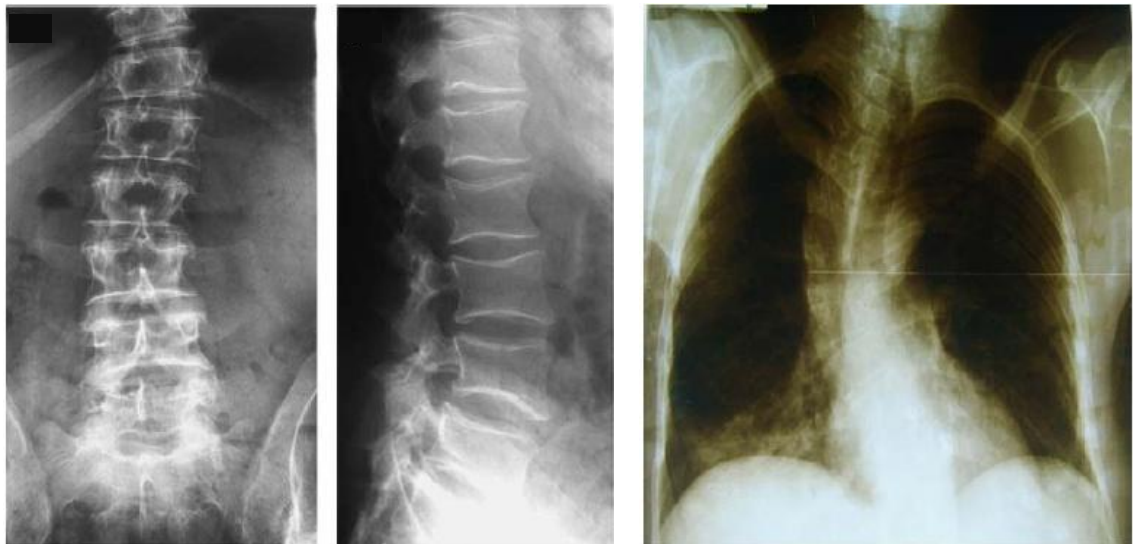


A



B

Obr. 5: Subluxace oční čočky. A – přední subluxace čočky u obou očí 35-letého muže s diagnostikovanou homocystinurií (Martínez-Gutiérrez et al., 2011), B – přední subluxace čočky u 6-letého chlapce homocystinurika (Kaliaperumal et al., 2014).



A

B

C

Obr. 6: Rentgenové snímky 26-letého muže s homocystinurií. A – čelní snímek bederní páteře, viditelné zakřivení páteře (skoliosa), B – boční snímek totožné bederní páteře, C – čelní snímek hrudní páteře, viditelná skoliosa (Azzabi et al., 2009).

Homocystein je ve vysokých koncentracích neurotoxický. Vysoká hladina poškozuje nervovou trubici už během embryonálního vývoje. U matek, které mají zvýšenou hladinu homocysteinu je větší riziko, že se jim narodí dítě s vývojovou vadou nervové soustavy (Strunecká, 2011). U mnoha pacientů se pak objeví opoždění vývoje, mentální retardace, dále se mohou objevit křeče či psychické poruchy (Andria et al., 2008).

HCY je také rizikovým faktorem při vzniku nemocí kardiovaskulárního systému. Má přímý vliv na endoteliální buňky cév, v plasmě má tendenci k autooxidaci, přičemž vznikají volné kyslíkové radikály, které zahajují lipoperoxidaci membrán a endotelií. Zvyšuje adhezivitu a agreabilitu krevních destiček, čímž porušuje koagulační rovnováhu. U pacientů s homocystinurií se tak často objevují tromboembolické komplikace (Žák a Zeman, 2010).

Cílem léčby je snížit hladinu homocysteinu. Jedním ze způsobů, jak toho lze dosáhnout, je podávání vitamínu B₆ – pyridoxinu. U pyridoxin-senzitivních pacientů pak dochází ke snížení hladiny HCY a MET na úroveň normálních koncentrací. Bohužel velká skupina pacientů patří mezi pyridoxin-rezistentní. U těch musí být celoživotně dodržována dieta s nízkým obsahem MET a vysokým obsahem cystinu. Společně s vitamínem B₆ může být pacientům podáván betain (remethyluje HCY), vitamin C (zlepšuje endoteliální dysfunkci) a kyselina listová (bývá užívána, protože podávání pyridoxinu způsobuje její nedostatek) (Andria et al., 2008, Nevorál et al., 2003).

V rámci diety s nízkým obsahem methioninu mají pacienti zakázáno konzumovat všechny druhy masa včetně rybiho a výrobky z nich, tvrdé i tavené sýry, všechny druhy luštěnin, vejce jako samostatný pokrm, ořechy a mandle. Částečně omezena musí být konzumace mléka, másla, smetany, bílého pečiva, mouky, krupice, vloček, rýže, těstovin, brambor. Potraviny povolené bez omezení jsou např. ovoce, zelenina, marmelády a džemy, cukr, olej, margaríny, nízkobílkovinné pečivo a mouka, nízkobílkovinné těstoviny a mléko (www.nspku.cz).

2.3.2.2 Deficit 5, 10-methylentetrahydrofolátreduktasy

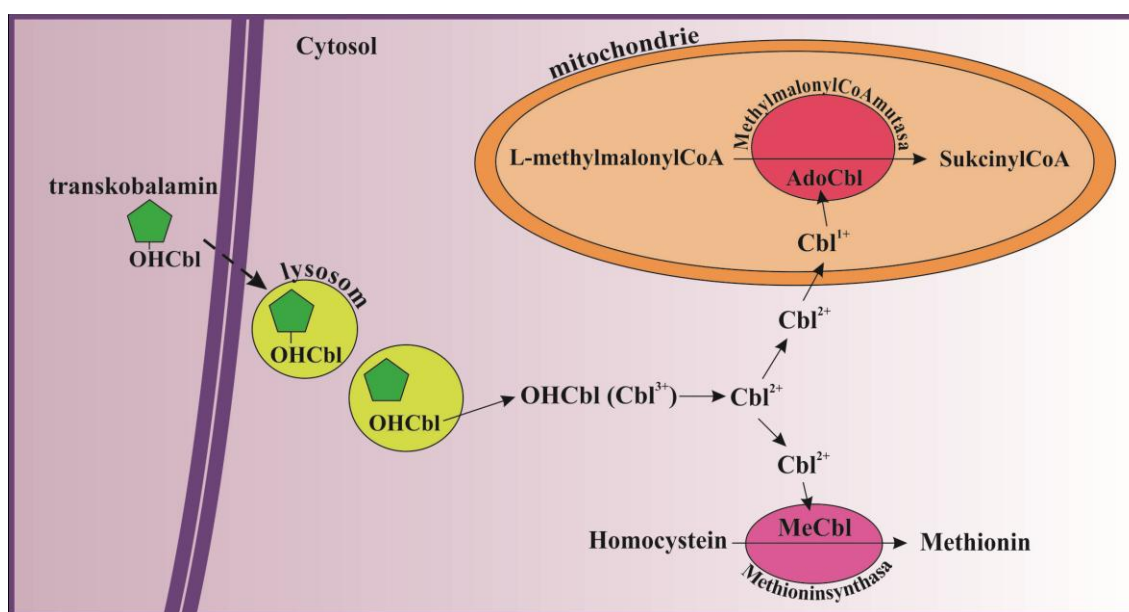
Substrátem 5, 10-methylen-THF-reduktasy (EC 1.5.1.20) je 5,10-methylen-THF, forma folátu přítomná nejčastěji uvnitř buněk. Produktem methylen-THF-reduktasy je 5-methyl-THF, který je převládající formou folátu cirkulujícího v těle. Defekt enzymu vede k abnormální distribuci folátů v těle a snížení hladiny folátu v plasmě. (van der Put et al., 1998). Současně nízká hladina methyl-THF blokuje enzymovou přeměnu HCY

na MET, což vede ke zvýšeným hladinám HCY v organismu. V závislosti na typu mutace v genu pro methylen-THF-reduktasu se onemocnění může projevit různými způsoby. Publikovány byly defekty nervové trubice, akutní neurologické poruchy v raném dětství, progresivní encefalopatie v pozdějším dětském věku nebo epilepsie. Léčba spočívá v podávání betainu, kyseliny listové, vitamínu B₆ a B₁₂ a dietě s nízkým obsahem methioninu (Iacobazzi et al., 2014, Prasad et al., 2011).

2.3.2.3 Poruchy metabolismu kobalaminu

Kobalamin (vitamin B₁₂, Cbl) získáváme z potravy. Vstřebává se v trávicím traktu pomocí speciálních receptorů enterocytů. Prostřednictvím transkobalaminu putuje krevním oběhem a je přijímán do buněk pomocí lysosomů (Obr. 7). V buňce se vyskytuje ve dvou formách – jako methylCbl v cytosolu plní funkci kofaktoru enzymu N-5-methylTHF:homocysteinmethyltransferasy (tzv. methioninsynthasy, EC 2.1.1.13). Druhá forma – adenosylCbl funguje v mitochondriích jako koenzym methylmalonyl-CoA mutasy (E.C. 5.4.99.2), jejíž nedostatečnost způsobuje onemocnění methylmalonovou acidurií (Fisher et al., 2014).

Poruchy související s metabolismem Cbl můžeme dělit na poruchy resorpce a transportu Cbl a poruchy jeho intracelulárního využití.



Obr. 7: Cesta kobalaminu v organismu.

OHCbl – hydroxykobalamin, MeCbl – methylkobalamin, AdoCbl – adenosylkobalamin.
(Podle: Rosenblatt a Fowler, 2008)

Nejčastějším typem poruchy metabolismu kobalaminu je porucha Cbl typu C (CblC) vedoucí ke kombinované methylmalonové acidurii a homocystinurii. Jedná se o defekt intracelulárního využití kobalaminu, kdy je narušena tvorba methylkobalaminu a adenosylkobalaminu (Carrillo-Carrasco a Venditti, 2012). Počátečními symptomy u dětí do jednoho roku věku jsou nespecifická letargie, ochablost, hypotonie, problémy s výživou, mikrocefalie, křeče a vývojové opoždění. U dětí diagnostikovaných v pozdějším věku se objevují psychické problémy – zmatenost, poruchy osobnosti, dále křeče a myelopatie. Léčba spočívá v podávání parenterálního hydroxyCbl a betainu, které často zmírňuje symptomy a potíže, ovšem kromě těch neurologických (opoždění vývoje, křeče, mikrocefalie a další přetrvávají) (Fisher et al., 2014).

Jedním z důvodů, proč má porucha metabolismu Cbl výrazný vliv na organismus, je fakt, že při zablokování methionintransferasy se hromadí nespoteřebovaný HCY, resp. SAH, který inhibuje betain-homocysteinmethyltransferasu. Tím se snižuje tvorba MET, resp. SAM, který jako důležitý donor methylu nemůže vstupovat do důležitých reakcí, např. methylace DNA, histonů, neurotransmiterů apod. (Iacobazzi et al., 2014).

2.3.3 Deficit methionin-S-adenosyltransferasy

Jedná se o poruchu jaterní formy tohoto enzymu (EC 2.5.1.6), která vede ke zvýšení koncentrací MET ve tkáních a tělesných tekutinách. Za normálních podmínek enzym aktivuje MET na SAM, který je důležitým donorem methylové skupiny (Andria et al., 2008). Pokud reakce neprobíhá, methionin se hromadí a u některých pacientů může dokonce kvůli velmi vysokým koncentracím docházet až k alternativnímu metabolismu MET – transaminaci, jíž produktem je 4-methylthio-3-oxobutyrate a dimethylsulfid, který způsobuje zápach dechu (Gahl et al., 1998).

U některých pacientů nemá tato porucha žádné závažné projevy a je považována za benigní, u několika pacientů byly ale pozorovány neurologické abnormality a mozková demyelinizace vedoucí k mentální retardaci (Chamberlin et al., 1996). Dochází-li k demyelinizaci, je pacientům podáván SAM (Andria et al., 2008).

2.3.4 Deficit S-adenosylhomocysteinhydrolasy

Enzym (EC 3.3.1.1) katalyzuje reversibilní hydrolýzu SAH na homocystein a adenosin, které jsou za fyziologických podmínek ihned dále zpracovávány. SAH je inhibitorem mnoha SAM-dependentních methyltransferas a jako takový hraje důležitou roli v regulaci methylačních procesů (Isa et al., 2006).

Deficit tohoto enzymu byl poprvé popsán v roce 2004 u chorvatského chlapce, který trpěl postižením svalové hmoty, jater a mozku. Ve svalech byla pozorována pozvolná, ale postupující destruktivní myelopatie, v játrech lehká chronická hepatitida a v mozku postižení bílé hmoty a abnormálně pomalá myelinizace. Do pátého měsíce věku jeho psychomotorický vývoj sice pomalu, ale kontinuálně postupoval, v pátém měsíci se zastavil a konečná diagnóza byla určena v necelých 13 měsících věku. Byl léčen dietou s nízkým obsahem methioninu a byl mu podáván fosfatidylcholin a kreatin monohydrát. Došlo ke snížení hladin SAM, SAH a MET (Barić et al., 2004).

O rok později bylo publikováno klinické pozorování a léčba mladšího bratra tohoto chorvatského chlapce, který byl monitorován od narození, onemocnění bylo u něj prokázáno v necelých 4 měsících věku. Od narození trpěl svalovou hypotonií, po několika dnech se u něj objevily dýchací obtíže. Až do započetí léčby, jejíž princip byl stejný jako u jeho bratra, byl hypotonický a vykazoval opoždění psychomotorického vývoje (Barić et al., 2005).

2.3.5 Deficit glycin-N-methyltransferasy

Enzym (EC 2.1.1.20) je zodpovědný za přenos methylové skupiny ze SAM na glycin za vzniku SAH a N-methylglycinu (sarkosinu). Byly publikovány tři případy tohoto onemocnění, dva italské sourozenci a jeden chlapec z Řecka. Všichni trpěli methioninemií a zvýšením hladiny jaterních transaminas v plasmě. Od ostatních poruch, při kterých je v plasmě zvýšený methionin, lze deficit glycin-N-methyltransferasy odlišit měřením koncentrací dalších metabolitů. Konkrétně je výrazně zvýšená hladina SAM, naopak zvýšeny nejsou koncentrace sarkosinu, SAH a HCY (Mudd et al., 2001; Augoustides-Savvopoulou et al., 2003; Andria et al., 2008).

2.3.6 Nutriční deficit vitamínu B₁₂ u matky novorozence

Důležitost a funkce vitamínu B₁₂, resp. kobalaminu byla zmíněna výše. Zdrojem jsou téměř výhradně živočišné výrobky - maso, vejce, ryby a mléko. Je-li matka přísná vegetariánka či veganka, zdroj tohoto vitamínu jí v přirozené stravě chybí. Dále se deficit vitamínu objevuje u pacientů se zhoubnou anemií, po resekci tenkého střeva nebo chirurgickém žaludečním bypassu. Ať je nedostatek B₁₂ způsoben jakkoli, má závažný dopad na neurologický vývoj plodu (Scolamiero et al., 2014).

V krvi novorozenců roste hladina propionylkarnitinu, methylmalonové kyseliny a HCY. V několika měsících věku se u dítěte objevuje letargie, nízký svalový tonus, zvracení a průjmy, opoždění psychomotorického vývoje, malý váhový přírůstek. Potíže se mohou objevit i v případě, že matka během těhotenství užívala vitaminové doplňky. Léčba spočívá v injekčním podávání vitamínu B₁₂, orálním podávání železa a B₁₂ je podáván i matce (Roumeliotis et al., 2012; Guez et al., 2012).

Jak již bylo zmíněno, níže popsaná metoda bude využívána i pro selektivní screening, konkrétně pro diagnostiku deficitu methylmalonyl-CoA mutasy a deficitu propionyl-CoA karboxylasy.

2.3.7 Deficit methylmalonyl-CoA mutasy

Onemocnění, někdy nazývané methylmalonová acidurie, je jedno z mnoha organických acidurií. Postihnutý enzym (EC 5.4.99.2) je vitamin B₁₂-dependentní. Jeho deficit vede k hromadění methylmalonyl-CoA, jehož důsledkem je zvýšené množství MMA v moči a plasmě. Dochází k sekundární inhibici propionyl-CoA karboxylasy, což vede ke zvýšené hladině kyseliny propionové, propionylkarnitinu a methylcitrátu. Je-li u kojeneho dítěte zjištěna v moči vysoká koncentrace MMA, je nutno vyloučit deficit vitamínu B₁₂ zvláště u dětí kojených matkami přísnými vegetariánkami či vegankami.

Projevit se onemocnění může třemi způsoby: těžkou novorozeneckou formou, kdy po úvodním období bez příznaků dojde k prudkému zhoršení stavu až ke kómatu, ve kterém dítě trpí mimovolnými pohyby, křečemi. Mozek je poškozen edémem. Akutní intermitentní forma s pozdním začátkem se projeví později, někdy dokonce až v dospívání opakovanými ataky kómatu s hematologickými a imunologickými problémy. Chronická progresivní forma mívá gastrointestinální nebo neurologické projevy.

Akutní léčba se odvíjí od formy onemocnění, dlouhodobě se porucha léčí nízkobílkovinnou dietou s podáváním vitamínů, která je značně individuální (Wendel a Ogier de Baulny, 2008)

2.3.8 Deficit propionyl-CoA karboxylasy.

Deficit tohoto biotin-dependentního enzymu (EC 6.4.1.3) bývá nazýván jako propionová acidemie. Charakteristický je zvýšenou koncentrací volné kyseliny propionové v krvi a moči, zvýšeným propionylkarnitinem, MCA a dalšími metabolity.

Projevy a léčba jsou obdobné jako u methylmalonové acidurie.

2.4 ODBĚROVÝ MATERIÁL PRO NOVOROZENECKÝ SCREENING

2.4.1 Whatman protein saver cards

Vzorky – suché krevní skvrny (KS) pro NBS se v ČR odebírají novorozencům na speciální propisovací kartičky Whatman 903 (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Tyto kartičky se označí údaji o novorozenci, rodičích, lékaři a nemocnici. Každá kartička má své číslo a čárový kód. Do naznačených a krytých odběrových kroužků se nechají nasáknout 3 kapky kapilární krve. Ta by měla pokrýt celý odběrový kruh o průměru 1,27 cm. Každý kruh udrží 75-80 µl krve.

2.4.2. Odběr krve pro NBS dle legislativy ČR

Kapilární krev se novorozencům odebírá z patičky 48-72 h po narození. Odebírá se i *post mortem* novorozencům, kteří zemřeli před regulérním odběrem. NBS v tomto případě pomáhá vyjasnit příčinu úmrtí. Pokud dítě potřebuje krevní transfuzi, léčbu kortikoidy, dopaminem, provede se odběr dříve, než k nasazení léčby dojde. Vzorek se odebírá dvojmo, jeden pro vyšetření DMP a druhý pro vyšetření ostatních poruch zařazených do NBS. V některých případech je nutno vyšetření opakovat, tzv. rescreening se provádí 8. – 14. den po narození, odběr probíhá obdobně.

Při odběru je nutno dbát na správné provedení, krev by měla nasáknout do celého odběrového prostoru, krevní skvrny by neměly být přesaturované, dostatečně uschnuté a kartička se nesmí dostat do kontaktu s látkou, která by mohla způsobit degradaci vzorku. Následně jsou kartičky zaslány do příslušné laboratoře, která screening provádí.

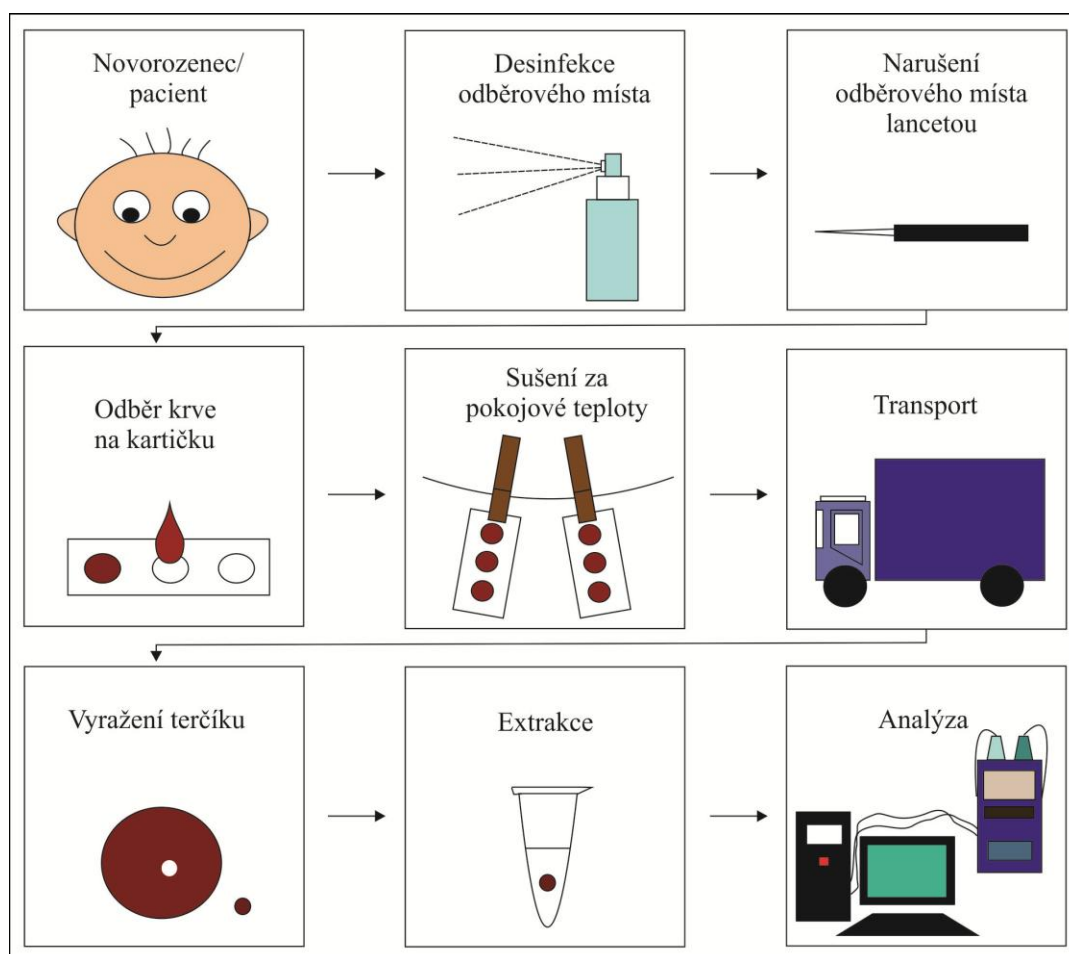
Laboratoře novorozeneckého screeningu jsou povinny po vyšetření zajistit adekvátní skladování a archivaci kartiček po dobu minimálně 5 let tak, aby je bylo možno použít pro případné opakování vyšetření a aby byly chráněny proti zneužití (Věstník MZ ČR, 2009).

2.5 PŘÍPRAVA A ANALÝZA SUCHÝCH KREVNÍCH SKVRN

2.5.1 Obecný postup

Ať je účel odběru a zpracování KS jakýkoli, je nutno dbát na několik kroků (Obr. 8). Po samotném odběru následuje vysušení vzorku. Dostatečné vysušení je velmi důležité, protože zbytková vlhkost svědčí bakteriím a plísním a také ovlivňuje extrakci. Dalším důležitým krokem je správný transport a uchování. Vzorky by měly být zasílány do laboratoří v nepropustném obalu spolu s vysoušedlem. Pokud mají být uchovávány po velmi dlouhou dobu (několik let), musí být skladovány za nízkých teplot (-20, -80 °C) (Lehmann et al., 2013).

V laboratoři následuje vyražení terčů, při kterém je nutno dbát, aby nedošlo ke křížové kontaminaci vzorků. Extrakční činidlo a metoda vyšetření jsou voleny podle typu analyzovaných látek. Špatně zvolené extrakční činidlo může vést ke zkresleným výsledkům z důvodu degradace nebo nedostatečné extrakce (Demirev, 2013).



Obr. 8: Obecný postup práce s krevními skvrnami.

2.5.2 Výhody a nevýhody

Tato technika je minimálně invazivní, jen málo bolestivá, vyžadovány jsou pouze desítky mikrolitrů kapilární krve. Je snadno automatizovatelná, kompatibilní s mnoha bioanalytickými metodami.

Malý objem vzorku, který je jistě pro novorozence výhodný, je ale zároveň výzvou pro analýzu samotnou, zvláště u stopových analytů. Dalším problémem může být nerovnoměrná distribuce krve v krevní skvrně – při odběru krev nenasákne po celém povrchu odběrového kruhu, což vede ke zkreslení výsledků. Skladování ve vhodných podmínkách může být při vyšetřování velkého množství vzorků také problematické (Demirev, 2013).

2.5.3 Metody analýzy krevních skvrn

Jedna z nejužívanějších metod analýzy krevních skvrn je spojení chromatografie a hmotnostní spektrometrie – off-line nebo online. Různé typy chromatografie umožňují analyzovat široké spektrum látek.

Vhodný a široce využívaný je přímý nástřik ve spojení s tandemovým hmotnostním spektrometrem (FIA-TMS). Je to rychlá a dobře automatizovatelná metoda využitelná pro toxikokinetické, farmakodynamické a obsáhlé screeningové studie.

V diagnostice dědičných a infekčních onemocnění se osvědčily na DNA založené testy (např. PCR). Jejich využití v analýze KS se rozvíjí hlavně v oblasti virových onemocnění – detekce cytomegaloviru, HIV nebo rozlišení hetero a homozygotů v oblasti genetických poruch.

Byly vytvořeny testy pro vyšetření enzymové aktivity řady enzymů zodpovědných za DMP. V této oblasti se osvědčily fluorimetrické, spektrofotometrické, ale i tandemově hmotnostně spektrometrické metody.

ELISA, jako zástupce imunometod, je využitelná pro detekci např. C-reaktivního proteinu. V analýze KS tvoří levný a účinný nástroj širokého populačního screeningu (Demirev, 2013; Tanna and Lawson, 2011).

Slibnou, ale zatím málo používanou metodou se zdají být mikrofluidní čipy. Dosud byla vyvinuta digitální mikrofluidní platforma pro rychlé enzymové vyšetření kyselých α -glukosidasy a α -galaktosidasy pro screening Pompeho a Fabryho poruch (Sista et al., 2011).

Uvedenými metodami mohou být detekovány různé analyty – exogenní nukleové kyseliny (nejčastěji virové), peptidy nebo proteiny (sérové proteiny a protilátky), sacharidy, lipidy a malé organické molekuly (aminokyseliny, vitamin D) a také xenobiotika (narkotika, léčiva) (Lehmann et al., 2013).

2.5.4 Laboratorní vyšetření KS v České Republice

Pro vyšetření DMP je používána FIA-TMS. Pro vyšetření kongenitální hypotyreosy, kongenitální adrenální hyperplasie a cystické fibrosy jsou používány imunoanalytické metody (Věstník MZ ČR, 2009).

2.6 STABILITA KREVNÍCH SKVRN

Suché krevní skvrny využívané pro NBS jsou zpravidla analyzovány až několik desítek hodin nebo dní po odběru. Proto je důležité, aby zjišťované markery byly v tomto materiálu stabilní. Bártil et al. (2014) uvádí, že ztráta MET, CYSTA a HCY byla po 14 dnech skladování v 25°C 5,6 %, 8,1 % a 2,8 %. Adam et al. (2011) uvádí ztrátu MET v krevní skvrně po 35 dnech skladování 11,6 % za nízké vlhkosti a 29,7 % za vysoké vlhkosti. Turgeon et al. (2010) popisuje ztrátu MMA, MCA a HCY po 7 dnech skladování při 22 °C o 2,3 %, 9,8 % a 19 %.

2.7 VALIDACE

2.7.1 Definice validace

Podle mezinárodního metrologického slovníku je validace ověřování, že specifikované požadavky jsou přiměřené pro zamýšlené použití (JCGM 200, 2012). Nováková et al. (2013) rozvádí definici validace jako dokazování, že s velkým stupněm jistoty bude určitý proces trvale poskytovat produkt odpovídající předem určené specifikaci. Tento důkaz je získán ve formě dokumentace. Správné provedení závisí na vhodném výběru validačních parametrů a k validaci je nutné použít kvalifikovaná zařízení.

2.7.2 Správnost metody

Je definována jako těsnost shody mezi výsledkem měření a skutečnou hodnotou (JCGM 200, 2012). Rozdíl mezi přijatou referenční hodnotou a naměřenou hodnotou je nazýván chyba výsledku. Ta se skládá ze dvou složek – konstantní a náhodné chyby

výsledku. Rozdíl mezi střední hodnotou výsledků zkoušek a přijatou referenční hodnotou je nazýván odchylka (BIAS) (Nováková et al., 2013).

2.7.3 Přesnost metody

Přesnost je definována jako těsnost shody mezi údaji nebo naměřenými výsledky získanými opakovaným měřením stejného nebo podobného předmětu zkoumání za specifických podmínek (JCGM 200, 2012). Závisí na rozdělení náhodných chyb a nevztahuje se k referenční hodnotě (Nováková et al., 2013).

Míra přesnosti bývá číselně vyjádřena jako směrodatná odchylka nebo variační koeficient, získané za specifických podmínek měření (JCGM 200, 2012). Podle těchto podmínek vyjadřujeme přesnost jako opakovatelnost, mezilehlou preciznost a reprodukovatelnost (Nováková et al., 2013).

Opakovatelnost je získána opakovaným použitím stejné zkušební metody na identickém materiálu, v téže laboratoři, týměž pracovníkem, za použití stejných přístrojů a zařízení, během krátkého časového rozmezí.

Mezilehlá preciznost je získána za podmínek, které zahrnují stejný postup měření identického materiálu, stejné místo v rozšířeném časovém úseku, ale je možno změnit některé podmínky – např. pracovníka, měřicí systém apod.

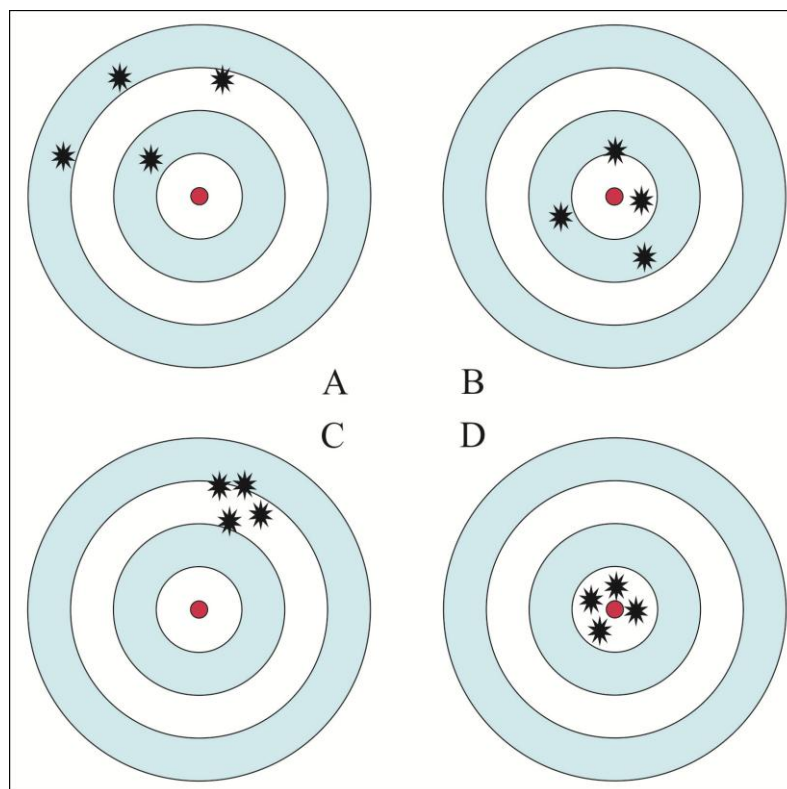
Reprodukovatelnost vyjadřuje shodu výsledků za podmínek, při kterých je stejný analytický materiál podrobován měření různými osobami, přístroji, v různých místech a časových intervalech. Zachována zůstává analytická metoda (Nováková et al., 2013).

Různé případy správnosti a přesnosti analytické metody jsou znázorněny na Obr. 9.

2.7.4 Linearita

Linearita je schopnost metody poskytnout v daném rozsahu přijatelnou lineární korelaci mezi odezvou detektoru a koncentrací analytu ve vzorku. Lineární závislost dvou náhodných proměnných je matematicky obecně vyjádřena: $y = a + bx$.

Těsnost vzájemné závislosti dvou náhodných proměnných charakterizuje korelační koeficient - R. Dosahuje při lineární závislosti hodnot ± 1 , čím více se blíží jedné, tím je závislost obou proměnných těsnější (Nováková et al., 2013).



Obr. 9: Grafické vyjádření správnosti a přesnosti metody.
 A – nepřesná a nesprávná metoda, B – nepřesná a správná metoda, C – přesná a nesprávná metoda, D – přesná a správná metoda. Podle: Nováková et al., 2013.

2.7.5 Mez detekce a stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) odpovídá koncentraci, pro kterou je analytický signál statisticky významně odlišný od šumu. Mez stanovitelnosti (LOQ) je koncentrace, při které správnost a přesnost umožňují kvantitativní vyhodnocení výsledku. LOD a LOQ lze vypočítat s využitím poměru signálu a šumu, ze směrodatné odchylky odezvy a směrnice kalibrační křivky, ze směrodatné odchylky odezvy blanku nebo ze směrodatné odchylky posunutí (Nováková et al., 2013).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 ÚVOD

Jak již bylo zmíněno, cílem experimentální části bylo vyvinout a validovat druhostupňovou metodu, která by umožňovala potvrdit diagnózu u dětí, u nichž v primárním novorozeneckém screeningu byly zjištěny abnormální koncentrace methioninu, v případě selektivního screeningu navíc potvrdit nálezy se zvýšeným propionylkarnitinem. Do metody bylo vybráno pět metabolitů, které jsou diagnostickými markery pro různá onemocnění v metabolismu methioninu a kobalaminů, propionové acidemie a methylmalonové acidurie (Tabulka 1 a 2).

Tab. 1: Očekávané metabolické odchylky při poruchách metabolismu MET a Cbl v primárním a sekundárním vyšetření NBS.

Metabolická odchylka	Primární výsledek NBS	Sekundární vyšetření		
	MET	tHCY	CYSTA	MET/ CYSTA
Homocystinurie (deficit cystathion- β - synthasy)	↑ (↑↑)	↑↑	N*(↓)	↑↑
Metabolismus kobalaminů				
deficit Cbl C, Cbl D a Cbl F	↓	↑	↑	↓
deficit Cbl D-Var 1, Cbl E a Cbl G	↓	↑		
Deficit methioninadenosyltransferasy I/III	↑	N*(↑)		
Deficit adenosylhomocysteinhydrolasy	↑	N*(↑)	N*(↑)	N*(↑)
Deficin glycin-N-methyltransferasy	↑	N*		
Deficit methylentetrahydrofolát reduktasy	N*(↓)	↑	↑	↓
Nutriční deficit Cbl u matky a další Cbl defekty	N*(↓)	N*(↑)		
Deficit vitamínu B ₆	N*(↑)	N*(↑)		

* N – normální hodnoty, ↑ - zvýšení koncentrace, ↑↑ - velmi výrazné zvýšení koncentrace, ↓ - snížení koncentrace, MET/CYSTA – poměr koncentrací MET a CYSTA, který je také využíván jako metabolický ukazatel. (Podle Turgeon et al., 2010, Bártil et al., 2014, Carrillo-Carrasco et al., 2012, Barić et al., 2004)

Tab. 2: Očekávané metabolické odchylky při poruchách metabolismu propionové kyseliny a Cbl v primárním a sekundárním vyšetření NBS.

Metabolická odchylka	Primární výsledek NBS	Sekundární vyšetření	
	C3-AC	MMA	MCA
Deficit propionyl-CoAkarboxylasy	↑↑	N*	↑↑
Deficit methylmalonyl-CoAmutasy	↑(↑↑)	↑↑	↑
Metabolismus kobalaminů			
deficit Cbl A, Cbl B a Cbl D-Var 2	↑	↑	N*
deficit Cbl C, Cbl D a Cbl F	↑	↑	N*
Nutriční deficit Cbl u matky a další Cbl defekty	N*(↑)	N*(↑)	N*

* N – normální hodnoty, ↑ - zvýšení koncentrace, ↑↑ - velmi výrazné zvýšení koncentrace, ↓ - snížení koncentrace. (Podle Turgeon et al., 2010 a Bártl et al., 2014).

3.2 MATERIÁL A VYBAVENÍ

3.2.1 Chemikálie

Použité standardy, značené standardy a chemikálie byly analytické čistoty, zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Pro přípravu mobilních fází a roztoků byla použita ultračistá voda LC/MS Chromasolv (Sigma-Aldrich). Byly použity komerční HCY kalibrátory (RECIPE, ClinCal® Whole Blood Calibrator Set (filter spots) for homocysteine, Level 0-3, ClinChek® Whole Blood Control (filter spots) for homocysteine, Level I, II).

3.2.2 Přístrojové vybavení

Analýza suchých krevních skvrn probíhala vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií (UHPLC Ultimate 3000, Dionex, Sunnyvale, CA, USA). Separace byla prováděna na koloně C8 (2.6 µm, 100 x 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, CA, USA). Detekce tandemovým hmotnostním spektrometrem (MS/MS API 4000, AB Sciex, Framingham, MA, USA) probíhala v módu skenování produktu rozpadu molekulárního iontu. Pro detekci MET, CYSTA a HCY byl použit pozitivní ionizační mód a pro detekci MMA a MCA negativní ionizační mód.

Pro přípravu vzorků a mobilních fází byly použity razicí kleště, nastavitelné pipety, krokovací pipeta (HandyStep, Brand, Wertheim, Německo), analytické váhy (KERN ABT 120-5DM, Belling, Německo), centrifuga na 96-jamkové pláty (Heraeus Biofuge Stratos, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA), třepačka na 96-jamkové pláty (Biosan PST-60 HL, Riga, Lotyšsko), ultrazvuková lázeň (Kraintek K12, Slovensko), vortex (IKA Works, USA).

3.2.3 Biologický materiál

Analyzovány byly suché krevní skvrny novorozenců zaslané do LDMP za účelem vyšetření novorozeneckého screeningu. Tyto skvrny byly odebrány novorozencům z patičky 48 – 72 hodin po narození na odběrové kartičky pro NBS (Whatman 903, GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Švédsko).

3.2.4 Příprava vzorků

Vzorky byly připravovány v 96-jamkové destičce. Kleštěmi byly do jamek vyraženy z krevních skvrn (KS) terčíky o průměru 3 mm. Ke každému terčíku bylo přidáno 20 μl směsi značených standardů (viz níže) a vzorky byly třepány 1 min na třepačce. Dále bylo do každé jamky pipetováno 20 μl 500 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dithiothreitolu (viz níže) a 100 μl 0,1% kyseliny mravenčí (viz příprava mobilní fáze A). Vzorky byly třepány 15 min na třepačce a centrifugovány (10 min, 4 °C, 2000 rpm). Z každé jamky bylo odebráno 90 μl supernatantu, který byl přepipetován do čisté jamky a použit k analýze.

Současně se vzorky pacientů byly chystány k analýze komerční HCY kalibrátory a spikované KS pro kalibraci.

3.2.4.1 Příprava dithiothreitolu

Tento roztok není možno dlouhodobě skladovat, proto byl připravován vždy čerstvý, konkrétně 500 $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dithiothreitol ($M = 154,2 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$). Podle počtu vzorků byla vypočtena požadovaná navážka, která byla rozpuštěna v potřebném množství vody. Pro jednu destičku, tedy 96 vzorků byla potřeba minimální navážka 0,148 g, které byly rozpuštěny v 1,92 ml vody.

3.2.4.2 Příprava suchých krevních skvrn pro kalibraci a validaci

Byla použita směs nesrážlivých krví od dětí (<10 let), které netrpěly onemocněním ovlivňujícím metabolismus methioninu, homocysteinu a kobalaminu. Standardy pěti zkoumaných metabolitů (MET, MMA, MCA, HCY, CYSTA) byly rozpuštěny a byly z nich připraveny směsi č. C1-5 (Tab. 3). Na přípravu skvrn bylo použito vždy 50 μl směsi standardů a 450 μl krve. Pro nulový bod kalibrační řady bylo použito 50 μl ultračisté vody, která byla smíchána se 450 μl krve. Z takto připravené krve byly na odběrové kartičky pro NBS vytvořeny KS (na jednu skvrnu bylo použito 50 μl krve) a byly vysušeny v digestoři. Skladovány byly v mrazničce při teplotě - 20 °C.

3.2.4.3 Příprava mobilních fází pro LC

MF A: 0,1% kyselina mravenčí ve vodě: 1,02 ml 98% kyseliny mravenčí bylo doplněno do 1 l vodou.

MF B: 0,1% kyselina mravenčí v methanolu: 1,02 ml 98% kyseliny mravenčí bylo doplněno do 1 l methanolem.

Tab. 3: Příprava směsi pro spikované krevní skvmy.

Standard	ZK standardu ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Směs pro přípravu KS										
		C5		C4		C3		C2		C1		
		C	V	C	V	C	V	C	V	C	V*	
	($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	(μl)	($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	(μl)	($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	(μl)	($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	(μl)	($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	(μl)	($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	(μl)
HCY	7175	2000	139.4	1000	69.7	500	34.8	100	50			
MET	6175	2000	161.9	1000	81.0	500	40.5	100	50			
CYSTA	4500	200	22.2	100	11.1	50	5.6	10	5			
MMA	8553	2000	116.9	1000	58.5	500	29.2	100	50			
MCA	3822	400	52.3	200	26.2	100	13.1	20	10			
Celkový objem směsi standardů (μl)			492.8		246.4		123.2		25.0			12.5
Objem vody - doplnění do 0.5 ml (μl)			7.2		253.6		376.8		475.0			487.5

ZK – zásobní koncentrace, V* - krevní skvmy byly připraveny naředěním směsi C 5, proto je uveden až celkový objem.

3.3 METODY

3.3.1 Příprava směsi značených standardů

Rozpuštěním v ultračisté vodě byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých značených standardů, které byly následně smíchány (Tab. 4) a doplněny vodou na objem 25 ml.

Tab. 4: Příprava směsi značených standardů.

Standard	Zásobní koncentrace ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Zásobní objem (μl)	Konečná koncentrace ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	Objem (μl)
D3-MCA	6829	25000	10	36.6
D3-MET	6175	25000	10	40.5
D3-MMA	1000	25000	10	250.0
D4-HCY	54.99	25000	10	4546.3
D4-CYSTA	4419	25000	1.5	8.5
Celkový objem standardů (μl)				20118.1
Objem vody pro doplnění do 25 ml (μl)				4881.9

3.3.2 Optimalizace chromatografických podmínek

Pro chromatografickou separaci byla modifikována dříve publikovaná metoda (Bártl et al., 2014). V systému reversních fází byly látky separovány na koloně Phenomenex C8 (2.6 μm , 100 x 4.6 mm) při 25 °C. Byla aplikována gradientová eluce při průtoku mobilní fáze 0,35 ml·min⁻¹. Celková doba analýzy byla 5 min. Nástřik vzorku činil 5 μl .

3.3.3 Optimalizace MS/MS podmínek

Pro každý analyt a značený standard byly pomocí přímého nástřiku do hmotnostního analyzátoru vyhledány nejintenzivnější specifické fragmenty a byly optimalizovány hodnoty deklasteračního potenciálu, vstupního a výstupního potenciálu kolizní cely a kolizní energie.

MET, CYSTA, HCY jsou detekovány v pozitivním ionizačním módu, MMA a MCA v negativním ionizačním módu. V průběhu jedné analýzy dochází v čase 3,8 min k přepnutí ionizace z pozitivního do negativního módu.

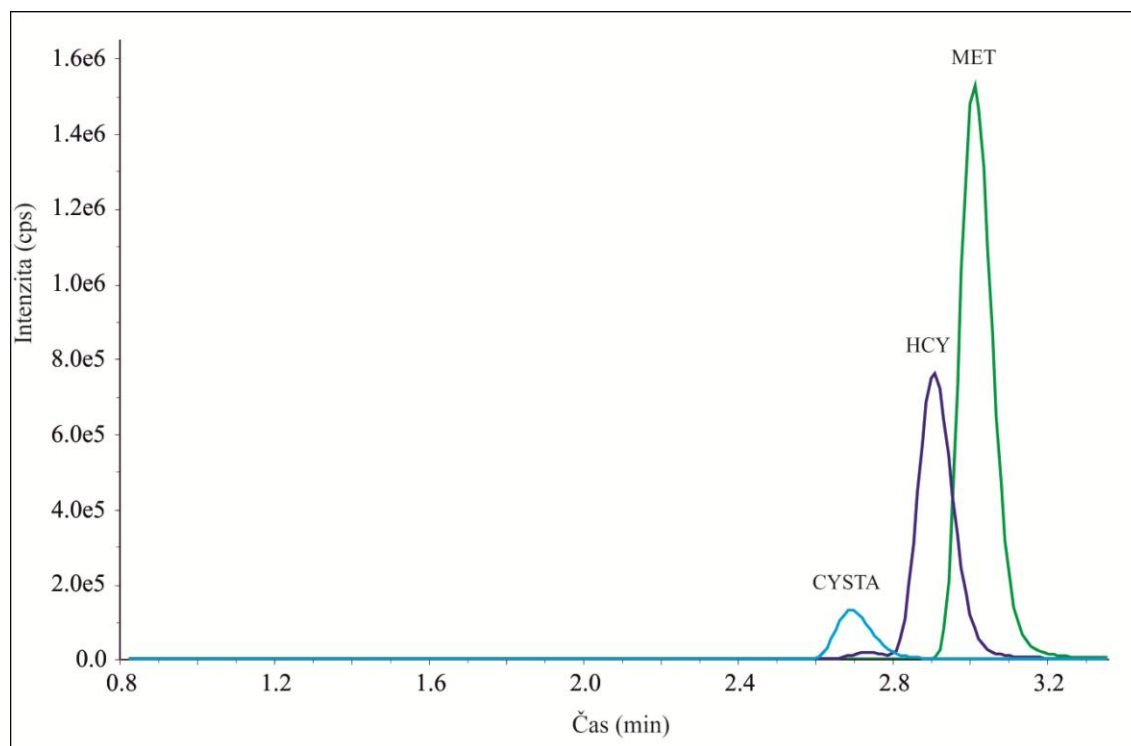
3.3.4 Kvantifikace

Pro kvantifikaci byl pro každý analyt stanoven poměr plochy analytu ku značenému standardu. Koncentrace analytů byly odečteny na základě externí kalibrace (manuálně připravené kalibrátory).

4. VÝSLEDKY

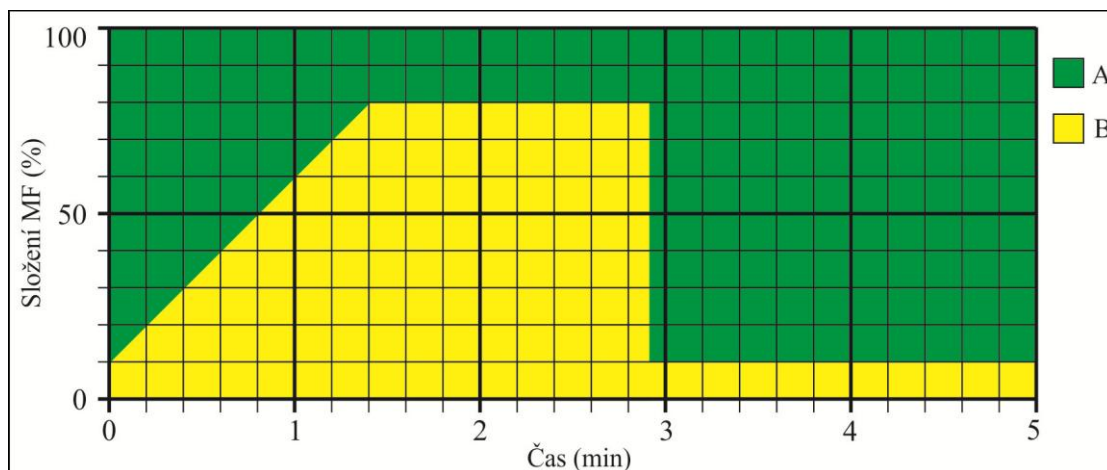
4.1 OPTIMALIZACE PODMÍNEK HPLC

Nejdříve byla testována dříve publikovaná separační metoda (Bártl et al., 2014), kde byly MET, HCY a CYSTA separovány na koloně C8 (Sunfire, 3,5 μ m, 4,6 x 100 mm) isokratickou elucí (0,1 % kyselina mravenčí ve 40 % methanolu). Ale za těchto podmínek nebyla pozorována dostatečná separace studovaných látek (Obr. 10).



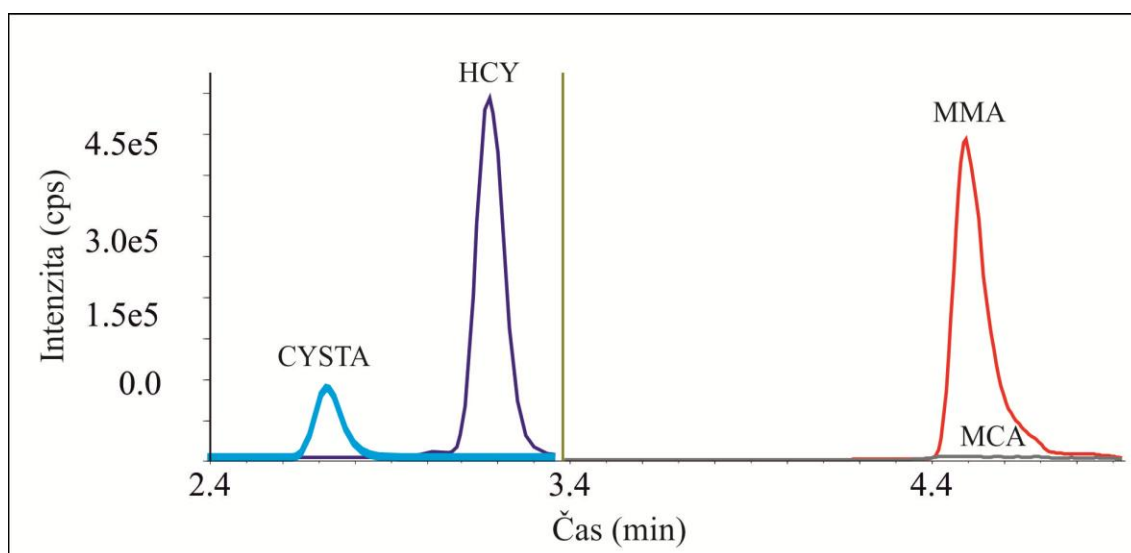
Obr. 10: Separace MET, HCY a CYSTA v pozitivním ionizačním módu.
Poměr MF: 40 % B: 60 %A.

Byla tedy aplikována gradientová eluce (gradient č. 1, Obr. 11) a současně byl zjišťován vhodný čas přepnutí pozitivní ionizace na negativní. Čas přepnutí 3,4 min se neosvědčil – MET, který je detekován v pozitivním módu, se nestačil z kolony eluovat (Obr. 12). Čas přepnutí byl tedy posunut na 4 min. Další aplikovaný gradient (gradient č. 2, Obr. 13) byl nevhodný z důvodu nedostatečného rozdělení methioninu (analýza v pozitivním módu) a MMA s MCA (negativní mód, Obr. 14). Gradient byl tedy znovu upraven a čas přepnutí nastaven na 3,8 min. Finální profil gradientu a konečná separace všech studovaných analytů a značených standardů jsou ukázány na Obr. 15 a 16.

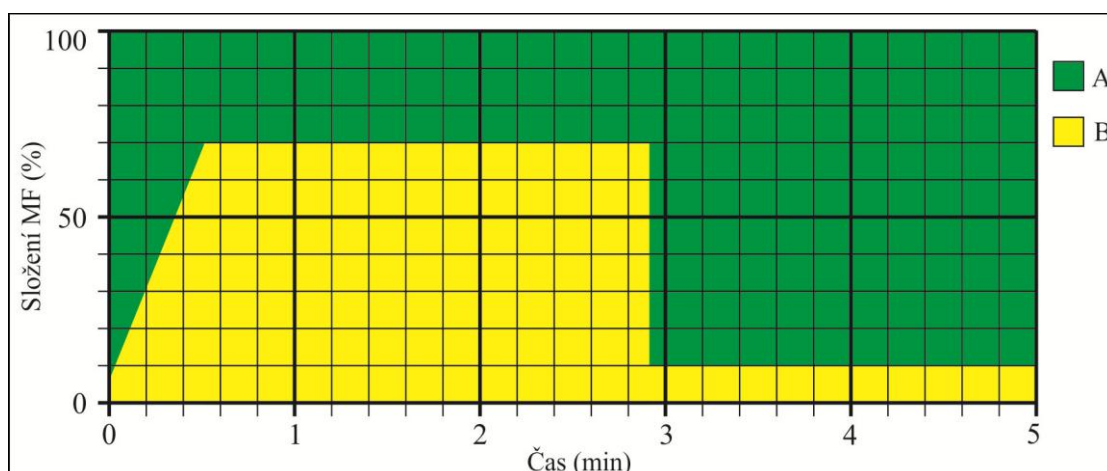


Obr. 11. Gradient č. 1.

MF A – 0,1% kyselina mravenčí ve vodě, MF B – 0,1% kyselina mravenčí v methanolu.

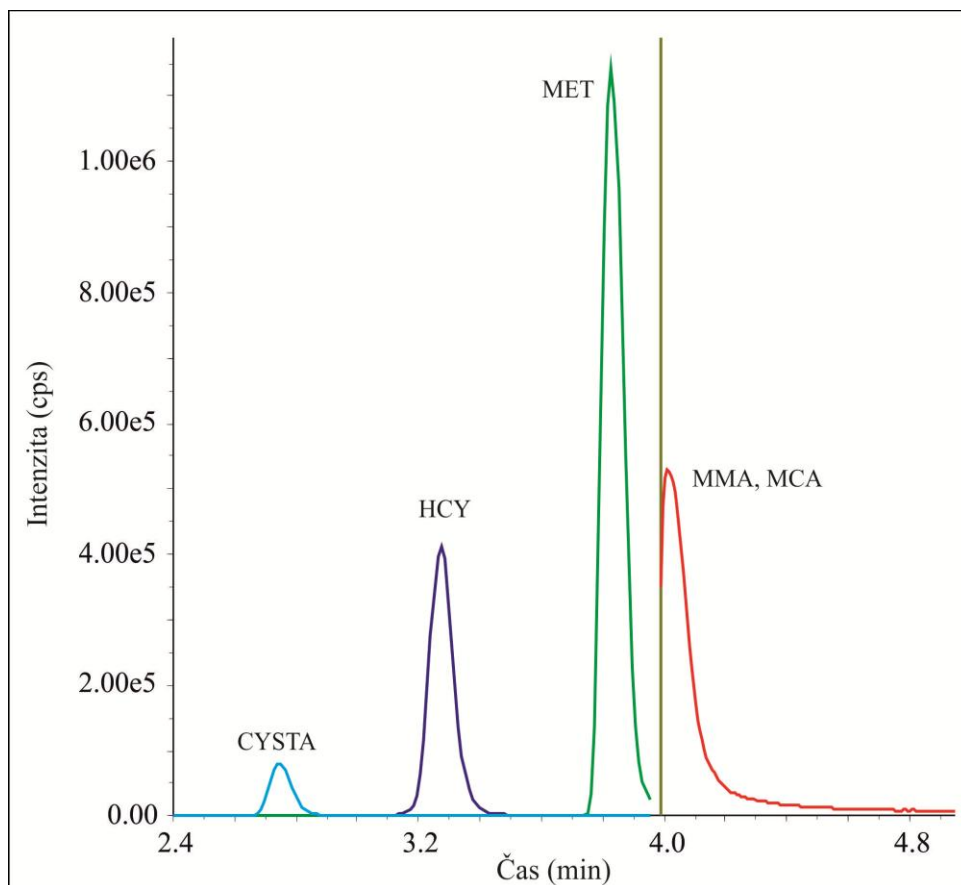


Obr. 12: Separace za použití gradientu č. 1.

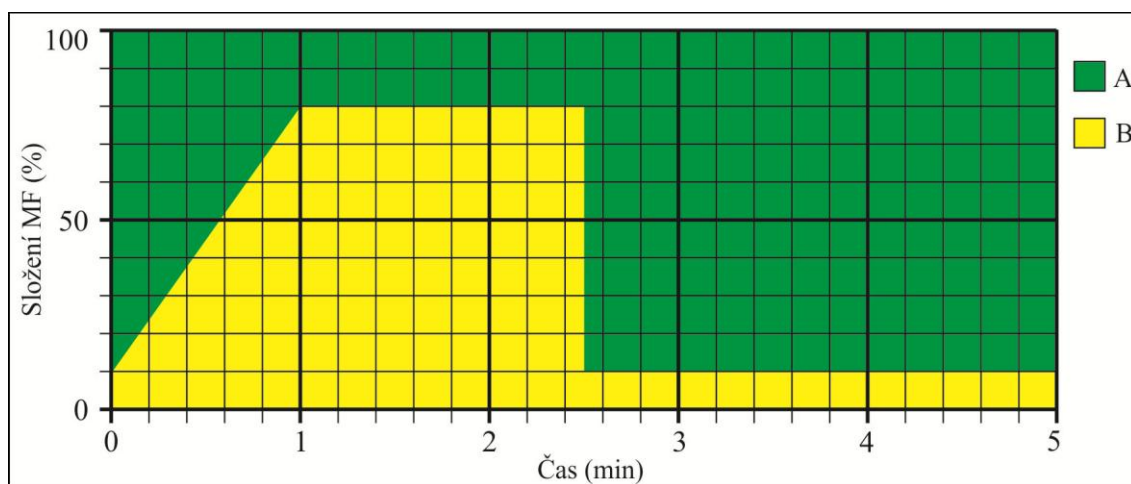


Obr. 13. Gradient č. 2.

MF A – 0,1% kyselina mravenčí ve vodě, MF B – 0,1% kyselina mravenčí v methanolu.

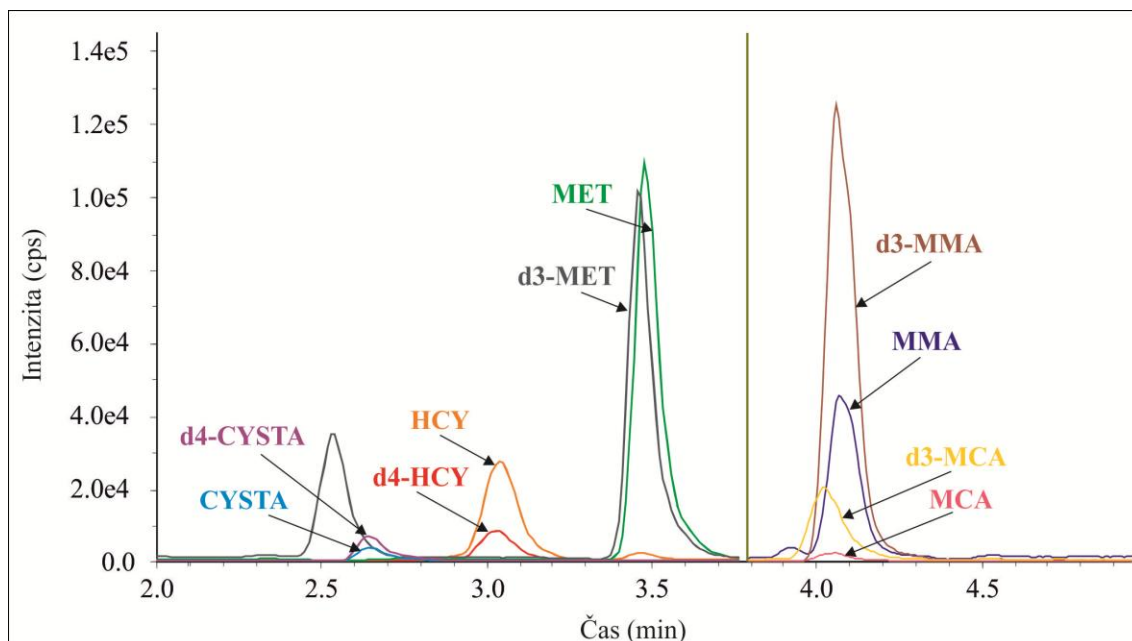


Obr. 14: Separace za použití gradientu č. 2.



Obr. 15: Finální profil gradientové eluce.

MF A – 0,1% kyselina mravenčí ve vodě, MF B – 0,1% kyselina mravenčí v methanolu.



Obr. 16: Finální chromatografická separace všech analytů a jejich značených standardů. Koncentrace ve vzorku: 50 $\mu\text{mol/l}$ MMA, MET, HCY; 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CYSTA, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MCA

4.2 OPTIMALIZACE PODMÍNEK MS/MS

Analyty byly detekovány v režimu skenování produktu rozpadu molekulárního iontu. Hodnoty prekurzorových a fragmentových iontů a optimalizované hodnoty deklasteračních potenciálů, vstupních potenciálů, kolizní energie a potenciálů na výstupu z kolizní cely pro jednotlivé látky a značené standardy jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5: Optimalizované hodnoty MS/MS parametrů

Mód	Analyt/IS	Q1 (Da)	Q3 (Da)	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
POS	HCY	136.0	90.0	36	10	15	8
	d4-HCY	140.0	94.0	36	10	15	8
	MET	150.0	104.0	31	10	15	6
	d3-MET	153.0	107.0	26	10	15	6
	CYSTA	223.1	134.0	51	10	19	8
	d4-CYSTA	227.1	137.9	56	10	19	8
NEG	MMA	116.9	73.0	-35	-10	-12	-3
	d3-MMA	119.9	76.0	-35	-10	-12	-3
	MCA	204.9	125.0	-40	-10	-18	-7
	d3-MCA	207.9	128.0	-40	-10	-18	-7

Zkratky: Q1 – prekurzorový iont, Q3 – fragmentový iont, DP – deklasterační potenciál, EP – vstupní potenciál, CE – kolizní energie, CXP – potenciál na výstupu z kolizní cely, (+) – pozitivní ionizační mód, (-) – negativní ionizační mód.

4.3 VÝPOČET SKUTEČNÝCH KONCENTRACÍ ANALYTŮ V KS

Pro stanovení validačních parametrů a další práci s KS bylo nutné nejprve stanovit skutečnou vnitřní koncentraci jednotlivých analytů v námi připravených KS. Ty byly určeny na základě rozdílu ploch píků jednotlivých analytů ve skvrnách s přídavkem a bez přídavku standardu. Vzorec pro výpočet:

$$C_{\text{vnitřní}} = \frac{C * P_0}{P - P_0}$$

kde C je koncentrace analytu přidaná do KS, P_0 je poměr ploch píku analytu/značenému standardu skvrny bez přídavku a P je poměr ploch píku analytu/značenému standardu skvrny s přidanou koncentrací C_1 .

Pro skvrnu byla tato skutečná koncentrace stanovena na základě pěti různých přídavků a byla vypočtena průměrná hodnota. Výsledky jsou shrnuty v Tab. 6 – 10.

Tab. 6.: Výpočet skutečné vnitřní koncentrace homocysteinu v krevní skvrně.

HCY		P_0 : 0.649	
Bod	$C_{\text{přidaná}}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	P	$C_{\text{vnitřní}}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
1	5	1.09	7.36
2	10	1.58	6.97
3	50	6.27	5.77
4	100	11.10	6.21
5	200	20.00	6.71
Průměr ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)			6.60
Směrodatná odchylka ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)			0.62
CV (%)			9.46

P_0 – poměr ploch píku analytu/značenému standardu skvrny bez přídavku, P – poměr ploch píku analytu/značenému standardu skvrny s přidanou koncentrací C.

Tab. 7.: Výpočet skutečné vnitřní koncentrace methioninu v krevní skvrně.

MET		P_0 : 0.186	
Bod	$C_{\text{přidaná}}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	P	$C_{\text{vnitřní}}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
1	5	0.28	9.69
2	10	0.36	10.63
3	50	1.12	9.96
4	100	2.12	9.62
5	200	3.86	10.13
Průměr ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)			10.00
Směrodatná odchylka ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)			0.41
CV (%)			4.05

P_0 – poměr ploch píku analytu/značenému standardu skvrny bez přídavku, P – poměr ploch píku analytu/značenému standardu skvrny s přidanou koncentrací C.

Tab. 8.: Výpočet skutečné vnitřní koncentrace cystathioninu v krevní skvrně.

CYSTA		$P_0: 0.0192$	
Bod	$C_{\text{přidaná}}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	P	$C_{\text{vnitřní}}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
1	0.5	0.06	0.22
2	1	0.11	0.22
3	5	0.53	0.19
4	10	1.07	0.18
5	20	2.05	0.19
Průměr ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)			0.20
Směrodatná odchylka ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)			0.02
CV (%)			10.08

P_0 – poměr ploch píku analytu/značenému standardu skvrny bez přídavku, P – poměr ploch píku analytu/značenému standardu skvrny s přidanou koncentrací C.

Tab. 9.: Výpočet skutečné vnitřní koncentrace methylmalonátu v krevní skvrně.

MMA		$P_0: 0.0138$	
Bod	$C_{\text{přidaná}}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	P	$C_{\text{vnitřní}}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
1	5	0.03	0.21
2	10	0.07	0.20
3	50	0.38	0.18
4	100	0.72	0.19
5	200	1.49	0.19
Průměr ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)			0.19
Směrodatná odchylka ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)			0.01
CV (%)			6.28

P_0 – poměr ploch píku analytu/značenému standardu skvrny bez přídavku, P – poměr ploch píku analytu/značenému standardu skvrny s přidanou koncentrací C.

Tab. 10.: Výpočet skutečné vnitřní koncentrace methylcitrátu v krevní skvrně.

MCA		$P_0: 0.0034$	
Bod	$C_{\text{přidaná}}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	P	$C_{\text{vnitřní}}$ ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)
1	1	0.02	0.25
2	2	0.03	0.25
3	10	0.14	0.25
4	20	0.29	0.24
5	40	0.56	0.24
Průměr ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)			0.25
Směrodatná odchylka ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)			0.01
CV (%)			2.14

P_0 – poměr ploch píku analytu/značenému standardu skvrny bez přídavku, P – poměr ploch píku analytu/značenému standardu skvrny s přidanou koncentrací C.

10.4 VALIDAČNÍ PARAMETRY

10.4.1 Správnost metody

Byla určena hodnota odchylky (BIAS) pro všechny analyty na základě deseti měření KS, které byly spikované $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCY, MET a MMA, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CYSTA a $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MCA. Odchylka se pohybovala v rozmezí $-0,35$ až $-12,4$ % (viz Tab. 11).

Tab. 11: Odchylka měření (BIAS).

Analyt	HCY	MET	CYSTA	MCA	MMA
Průměr ($\mu\text{mol/l}$)	103.56	109.61	9.61	19.47	87.77
$C_{\text{skutečná}}$ ($\mu\text{mol/l}$)	106.60	110.00	10.20	20.25	110.40
BIAS (%)	-2.85	-0.35	-5.82	-3.84	-12.40

10.4.2 Přesnost metody

Opakovatelnost byla stanovena na základě deseti měření KS spikovanými dvěma různými koncentracemi analytů (L_1 a L_2). L_1 byl spikovaný $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCY, MET a MMA, $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CYSTA a $2 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MCA. L_2 byl spikovaný $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCY, MET a MMA, $10 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CYSTA a $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MCA. Variační koeficient (Tab. 12) byl v rozmezí 4,23 – 13,77 %.

Tab. 12: Opakovatelnost.

Analyt	L_1			L_2		
	Průměrná koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Směrodatná odchylka ($\mu\text{mol/l}$)	CV (%)	Průměrná koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Směrodatná odchylka ($\mu\text{mol/l}$)	CV (%)
HCY	16.55	1.63	9.87	103.56	14.26	13.77
MET	19.91	0.53	2.67	109.61	7.32	6.68
CYSTA	1.05	0.10	9.56	9.61	1.22	12.74
MMA	1.91	0.13	6.80	19.47	1.66	8.51
MCA	7.46	0.32	4.23	87.77	8.69	9.90

* CV – Variační koeficient.

Mezilehlá preciznost byla stanovena na základě deseti měření KS L_1 a L_2 (viz výše) za podmínek mezilehlé preciznosti (10 měření v různých dnech). Variační koeficient (Tab. 13) byl v rozmezí 4,38 – 12,49 %.

Tab. 13: Mezilehlá preciznost.

Analyt	L_1			L_2		
	Průměrná koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Směrodatná odchylka ($\mu\text{mol/l}$)	CV (%)	Průměrná koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Směrodatná odchylka ($\mu\text{mol/l}$)	CV (%)
HCY	16.70	1.93	11.58	115.03	14.36	12.49
MET	19.02	1.69	8.88	107.64	4.72	4.38
CYSTA	1.12	0.11	9.37	9.94	0.66	6.63
MMA	1.96	0.19	9.62	19.65	1.40	7.10
MCA	8.31	0.98	11.73	97.47	5.86	6.01

* CV – Variační koeficient.

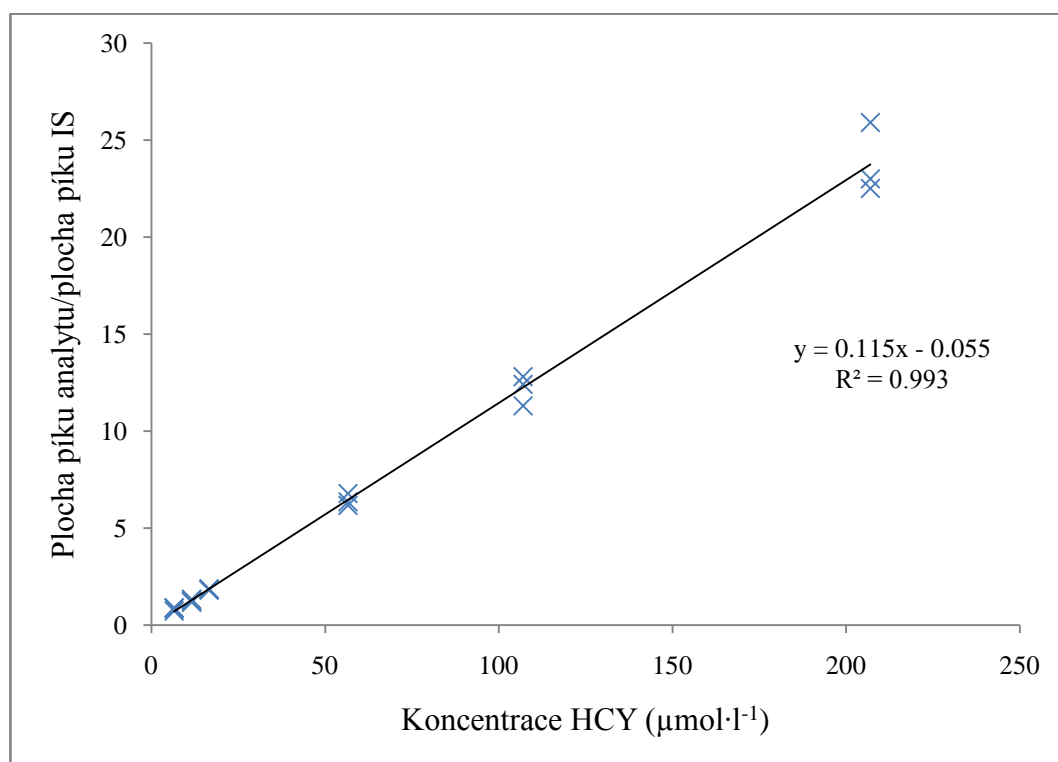
10.4.3 Linearita

Přímka závislosti, rovnice regrese a korelační koeficient (Obr. 17 – 21) byl pro každou látku stanoven na základě měření triplicátů KS spikovaných koncentrací standardů uvedenou v Tab. 14.

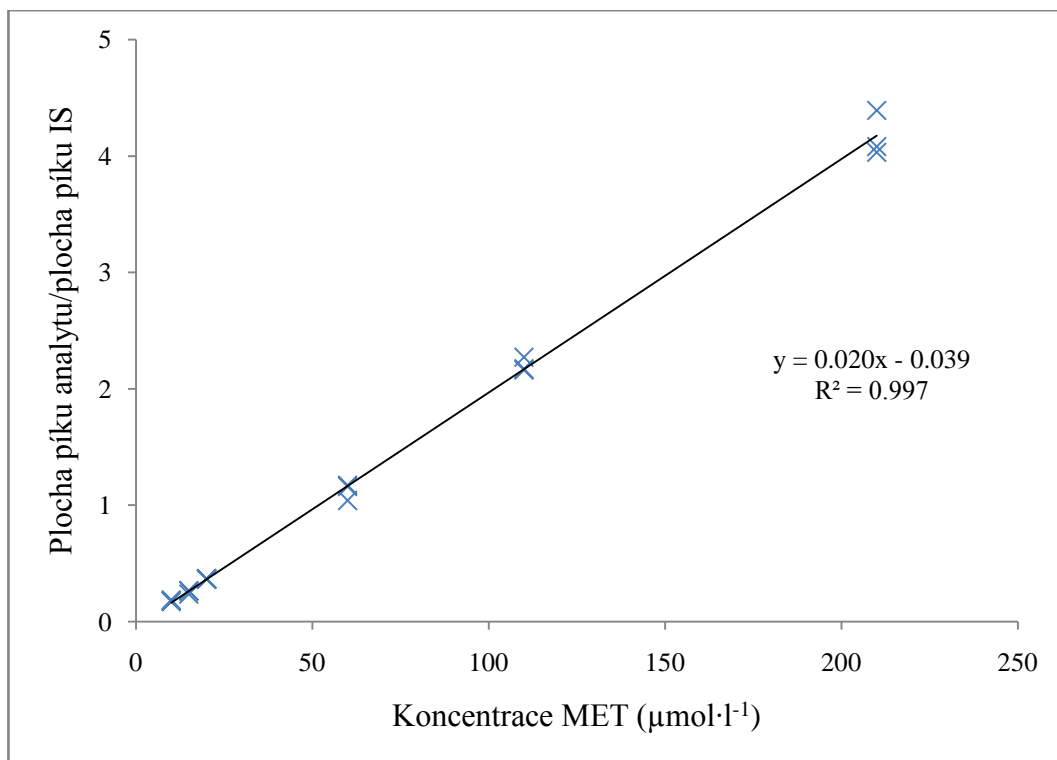
Tab. 14: Koncentrace analytů v KS.

Bod	HCY ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)		MET ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)		CYSTA ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)		MMA ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)		MCA ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	
	$C_{\text{přid.}}$	$C_{\text{celk.}}$	$C_{\text{přid.}}$	$C_{\text{celk.}}$	$C_{\text{přid.}}$	$C_{\text{celk.}}$	$C_{\text{přid.}}$	$C_{\text{celk.}}$	$C_{\text{přid.}}$	$C_{\text{celk.}}$
1	0	6.60	0	10.00	0	0.20	0	0.19	0	0.25
2	5	11.60	5	15.00	0.5	0.70	5	5.19	1	1.25
3	10	16.60	10	20.00	1	1.20	10	10.19	2	2.25
4	50	56.60	50	60.00	5	5.20	50	50.19	10	10.25
5	100	106.60	100	110.00	10	10.20	100	100.19	20	20.25
6	200	206.60	200	210.00	20	20.20	200	200.19	40	40.25

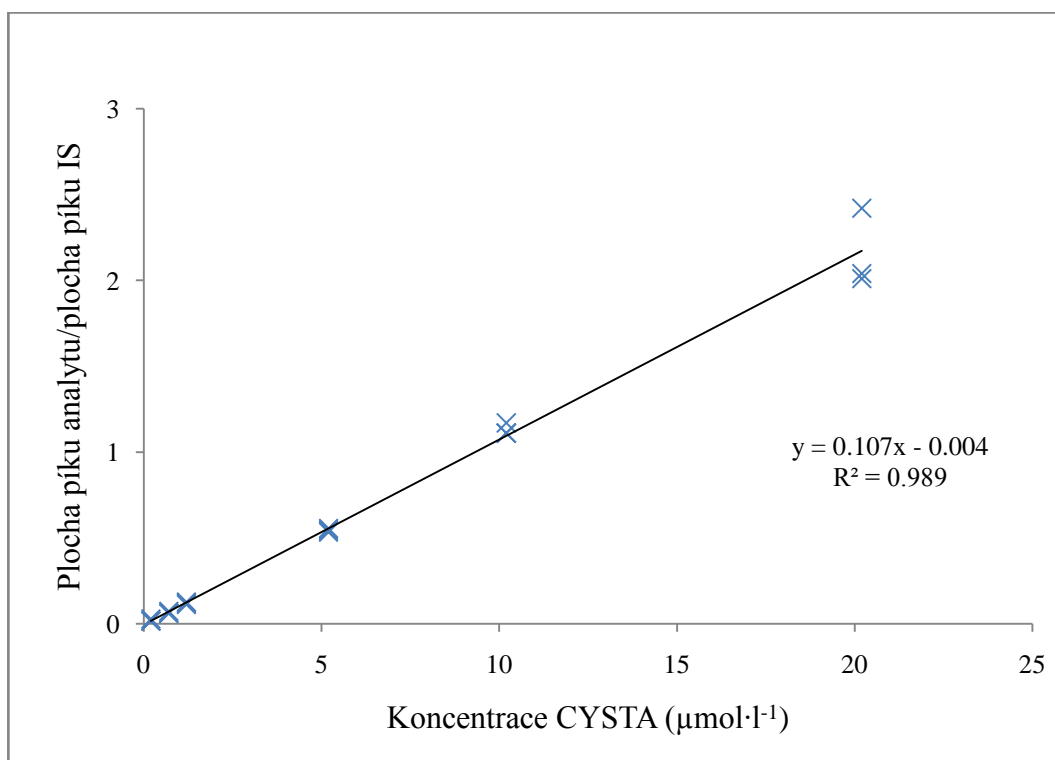
$C_{\text{přid.}}$ – koncentrace standardů přidaná do KS, $C_{\text{celk.}}$ – celková koncentrace analytu v KS.



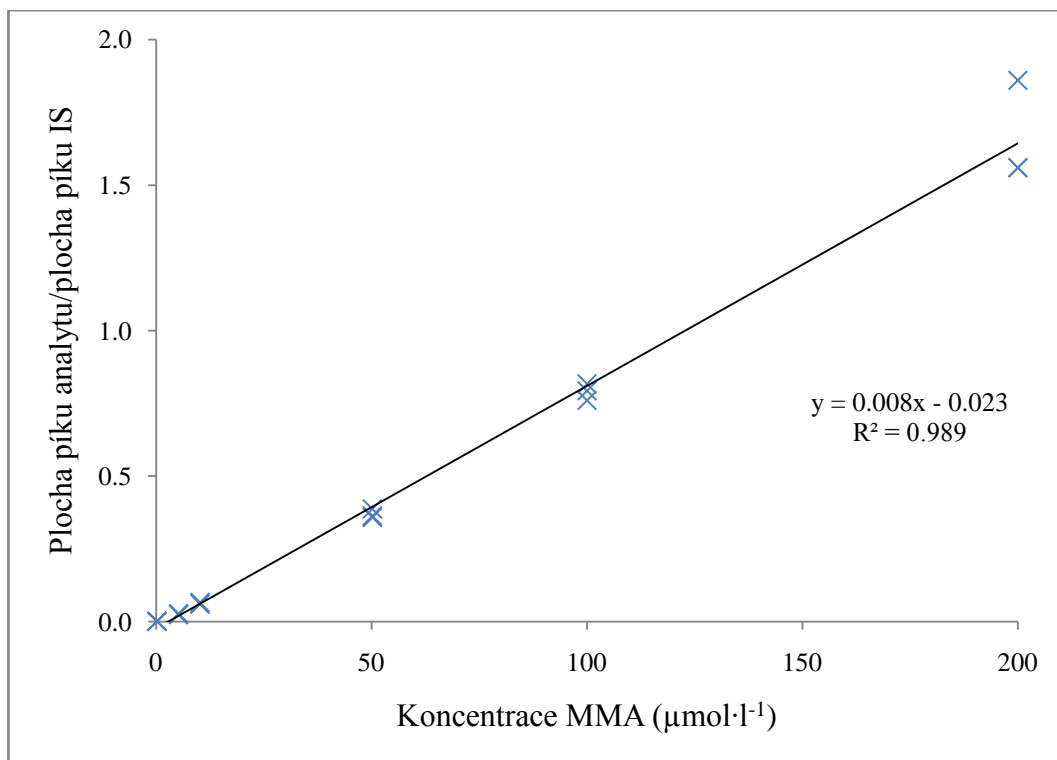
Obr. 17: Linearita, rovnice regrese a korelační koeficient R^2 pro homocystein.



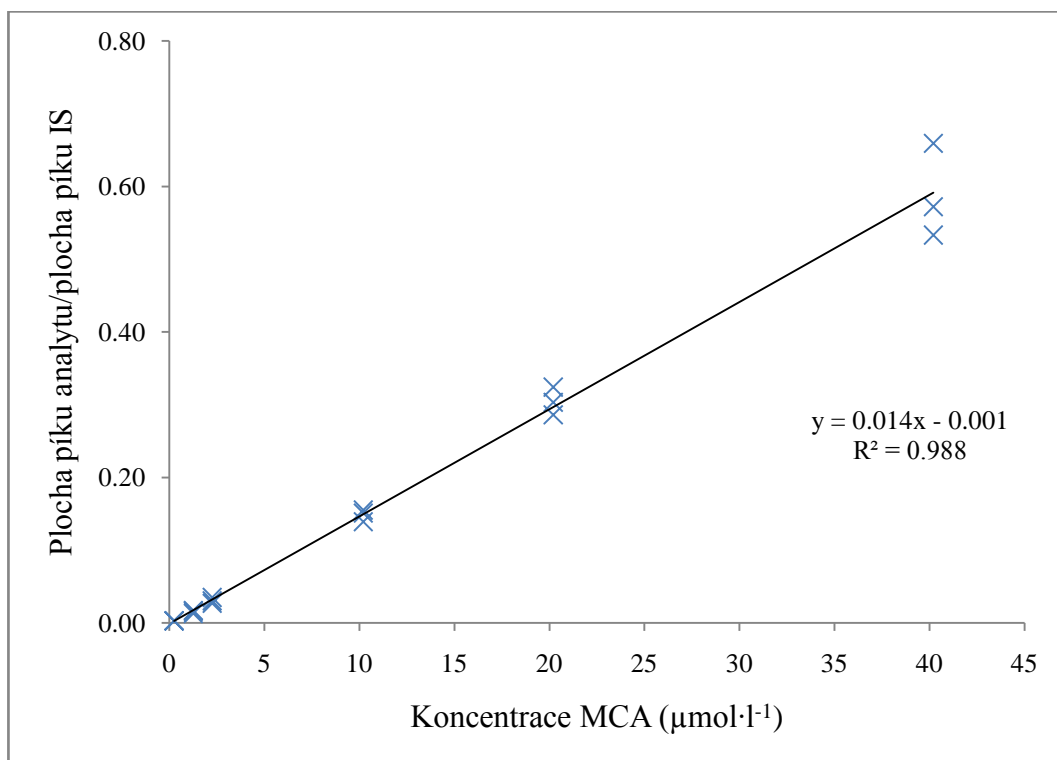
Obr. 18: Linearita, rovnice regrese a korelační koeficient R^2 pro methionin.



Obr. 19: Linearita, rovnice regrese a korelační koeficient R^2 pro cystathionin.



Obr. 20: Linearita, rovnice regrese a korelační koeficient R^2 pro methylmalonát.



Obr. 21: Linearita, rovnice regrese a korelační koeficient R^2 pro methylcitrát.

10.4.4 Mez detekce a mez stanovitelnosti

LOD a LOQ byly zjištěny měřením KS s přidanou koncentrací analytů $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCY, MET a MMA, $0,5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ CYSTA a $1 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ MCA. Byla určena nejnižší koncentrace, při které je intenzita signálu trojnásobkem (LOD), resp. desetinásobkem (LOQ) intenzity šumu (Tab. 15)

Tab. 15: Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ).

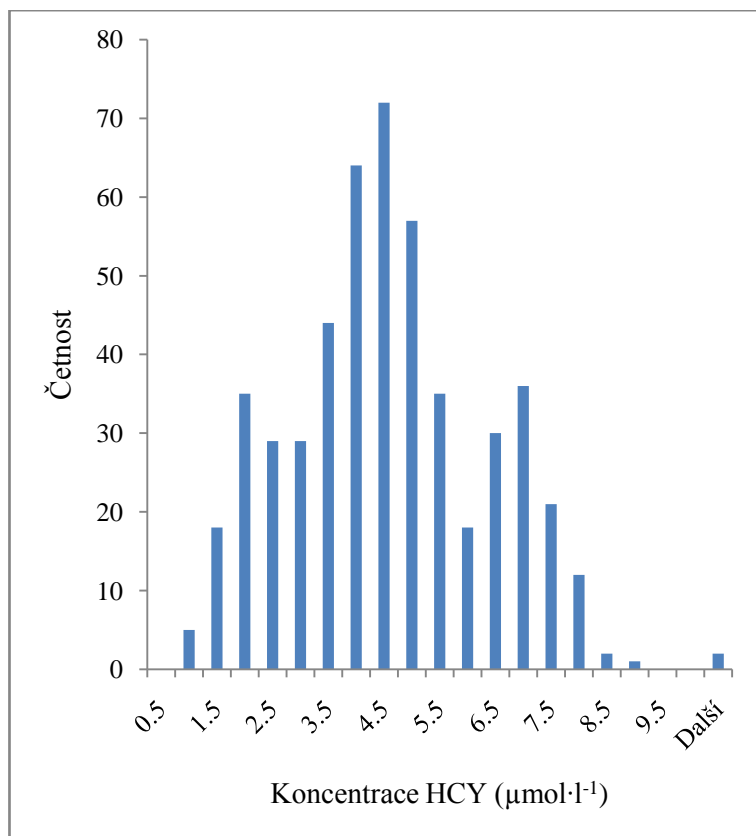
Analyt	LOD ($\mu\text{mol/l}$)	LOQ ($\mu\text{mol/l}$)
HCY	0.94	3.12
MET	0.30	1.01
CYSTA	0.12	0.40
MMA	1.58	5.25
MCA	0.54	1.81

4.4 REFERENČNÍ ROZMEZÍ

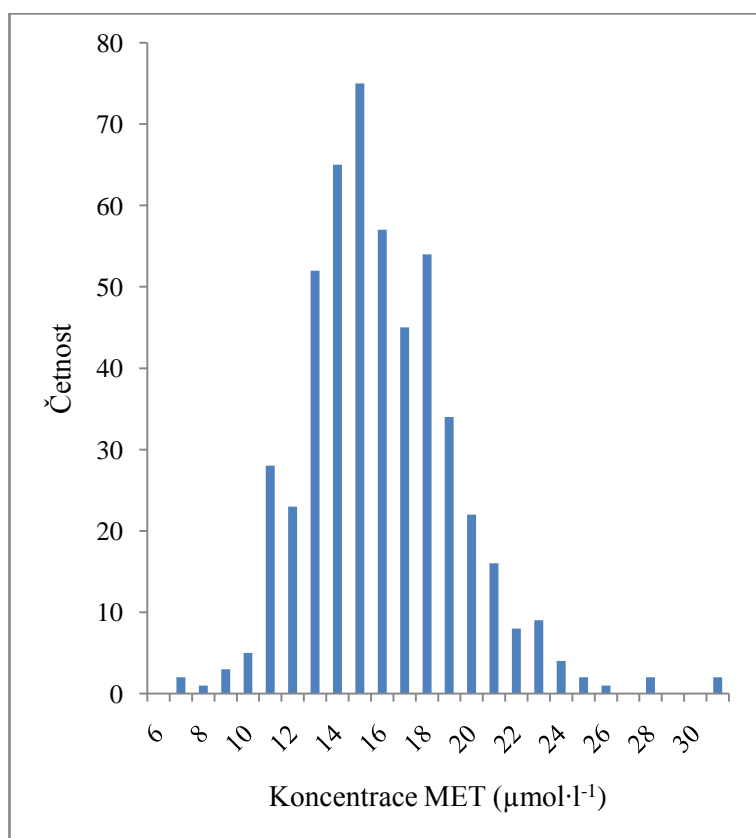
Referenční rozmezí byla stanovena na základě analýzy 510 KS z novorozeneckého screeningu, které nevykazovaly zvýšené hodnoty methioninu. Byl určen 2,5tý a 97,5tý percentil souboru dat pro všechny analyty a také pro poměr koncentrací MET/CYSTA, který je z diagnostického hlediska také důležitý (Tab. 16). Rozložení hodnot pro jednotlivé analyty je znázorněno histogramy (Obr. 22 – 27) a percentilovými grafy (Obr. 28 – 33).

Tab. 16: Referenční rozmezí.

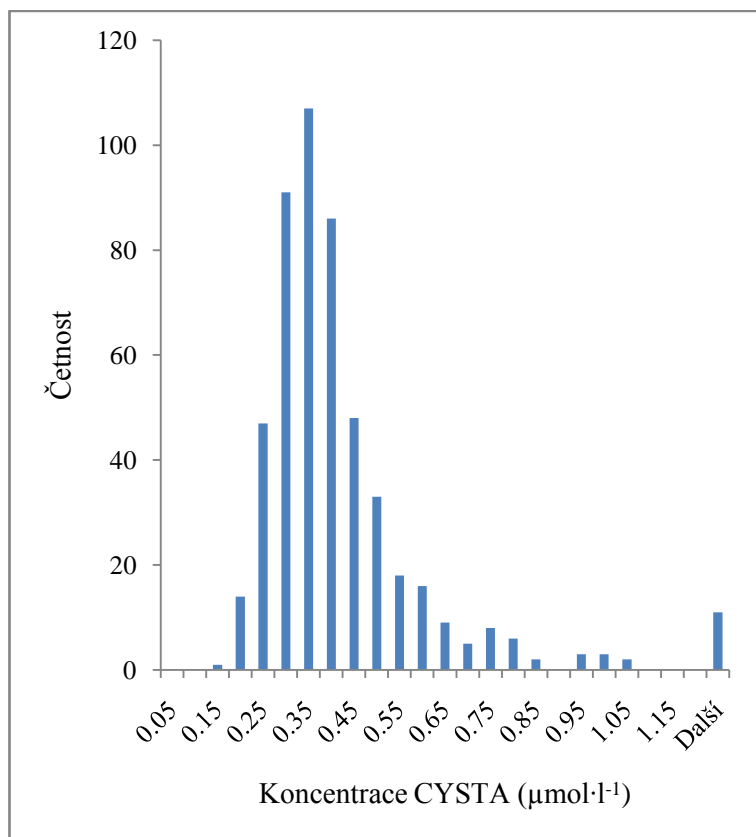
Analyt	Referenční rozmezí ($\mu\text{mol/l}$)
HCY	1.19 - 7.55
MET	10.20 - 23.00
CYSTA	0.20 - 1.00
MMA	0.16 - 3.03
MCA	0.24 - 0.60
MET/CYSTA	15.59 - 74.96



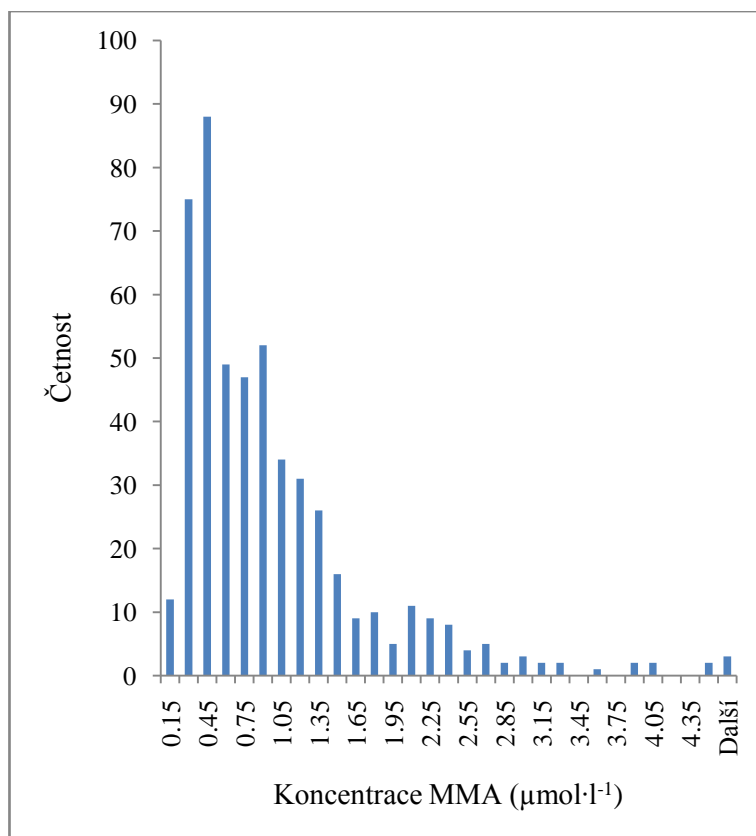
Obr. 22: Histogram pro homocystein.



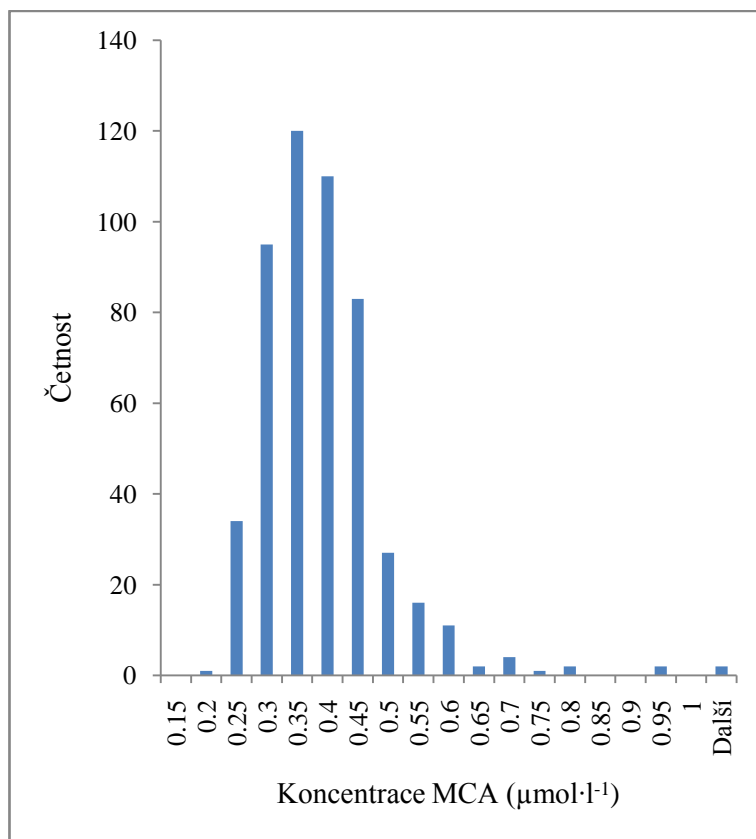
Obr. 23: Histogram pro methionin



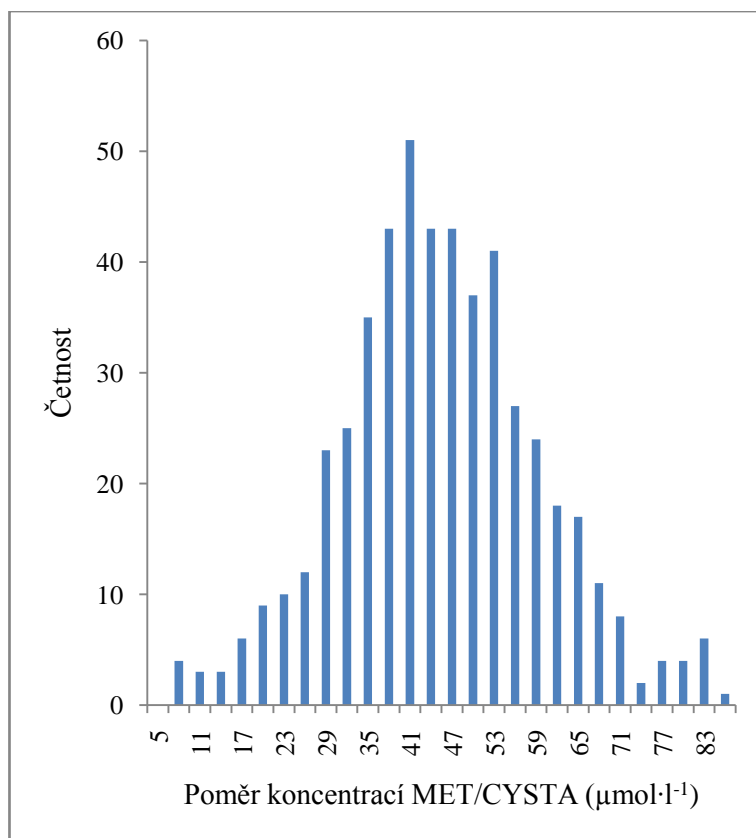
Obr. 24: Histogram pro cystathionin.



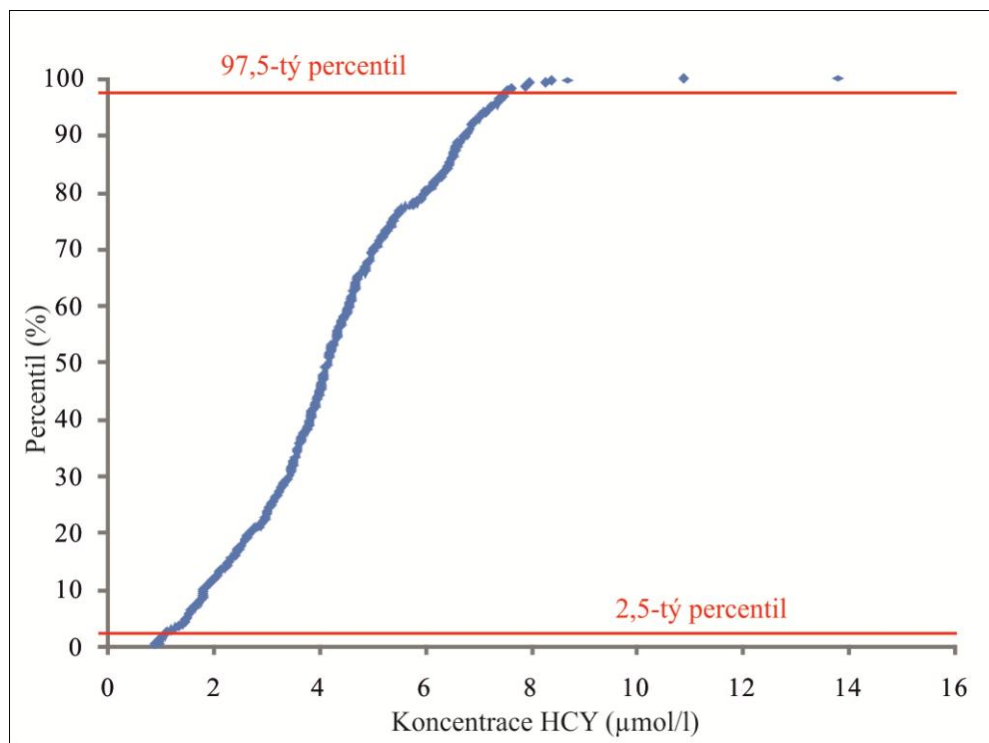
Obr. 25: Histogram pro methylmalonát



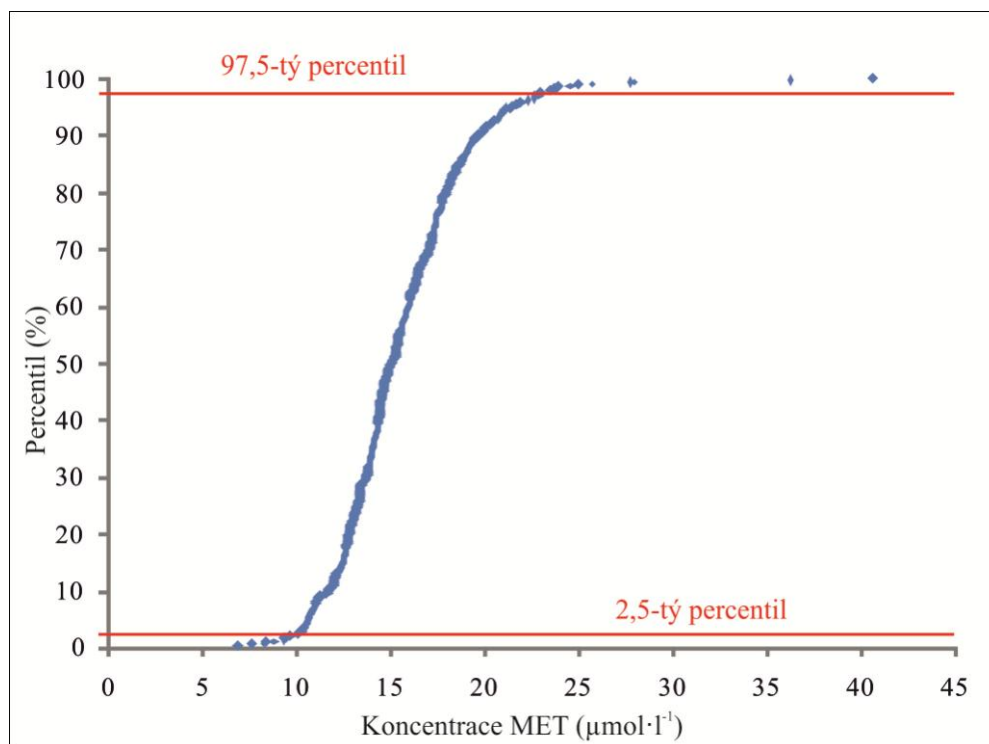
Obr. 26: Histogram pro methylcitrát.



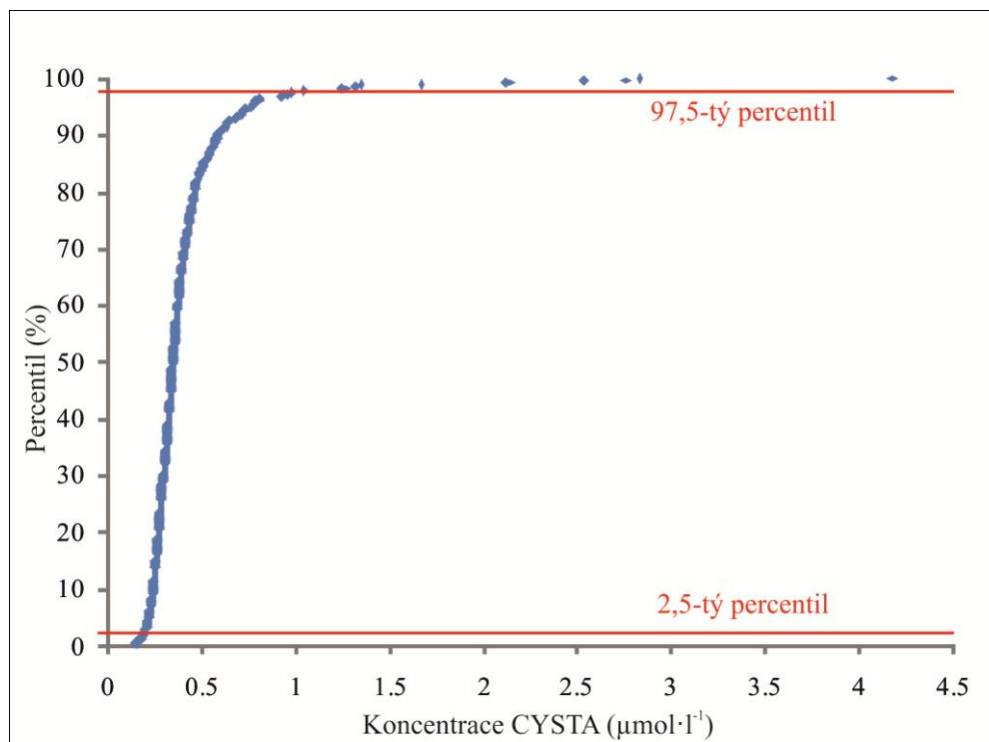
Obr. 27: Histogram pro poměr MET/CYSTA.



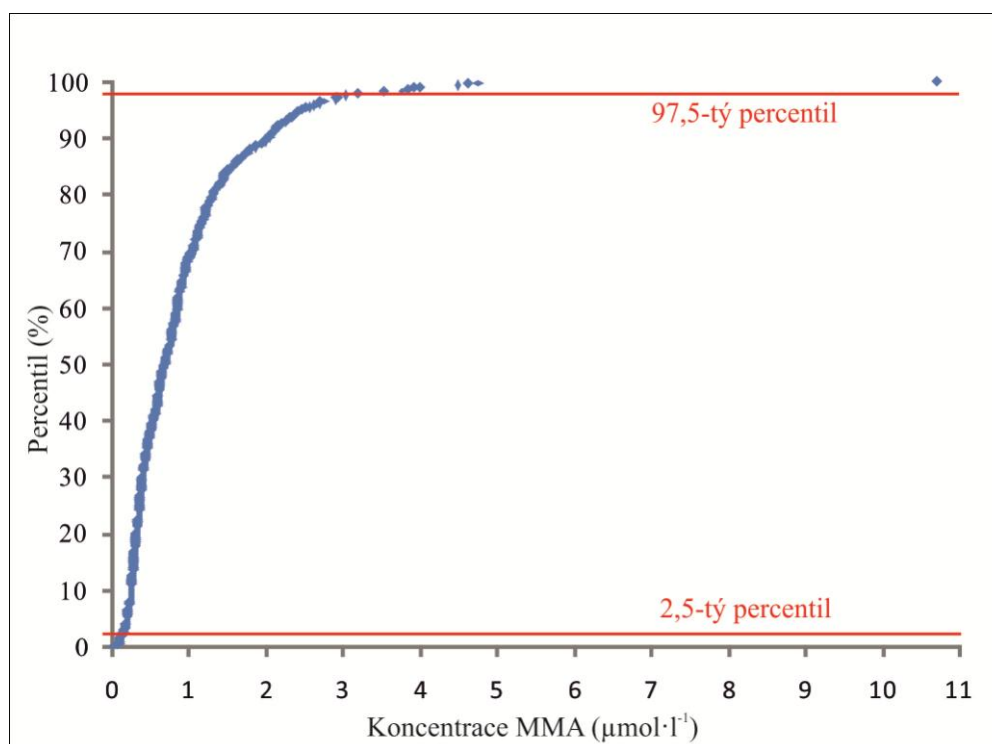
Obr. 28: Percentilový graf pro homocystein.



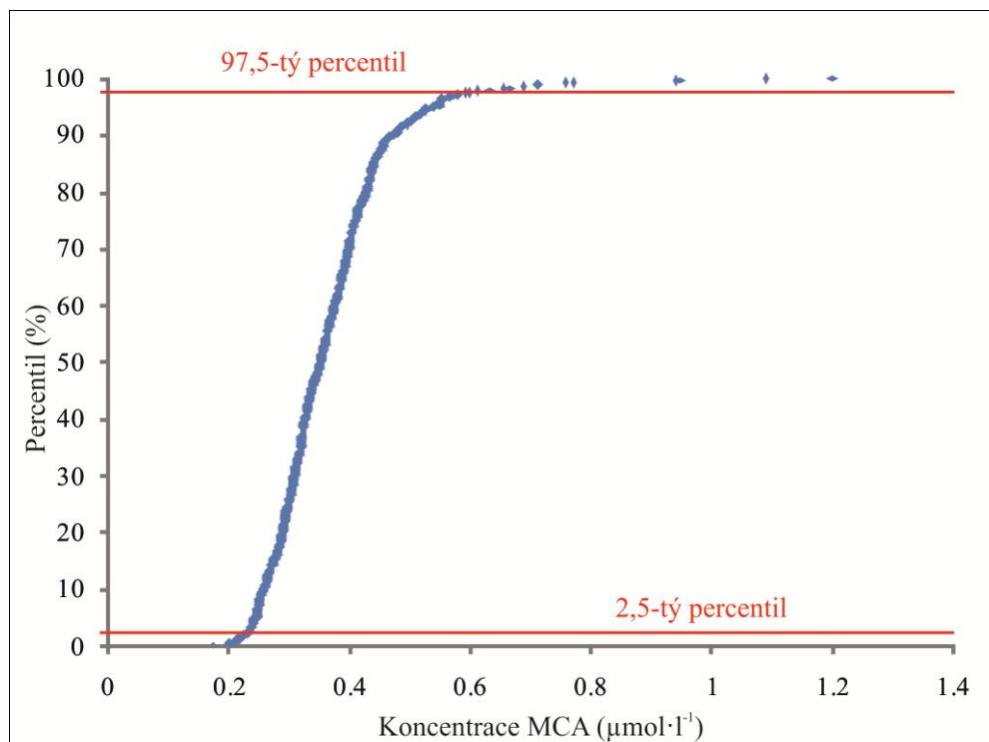
Obr. 29: Percentilový graf pro methionin.



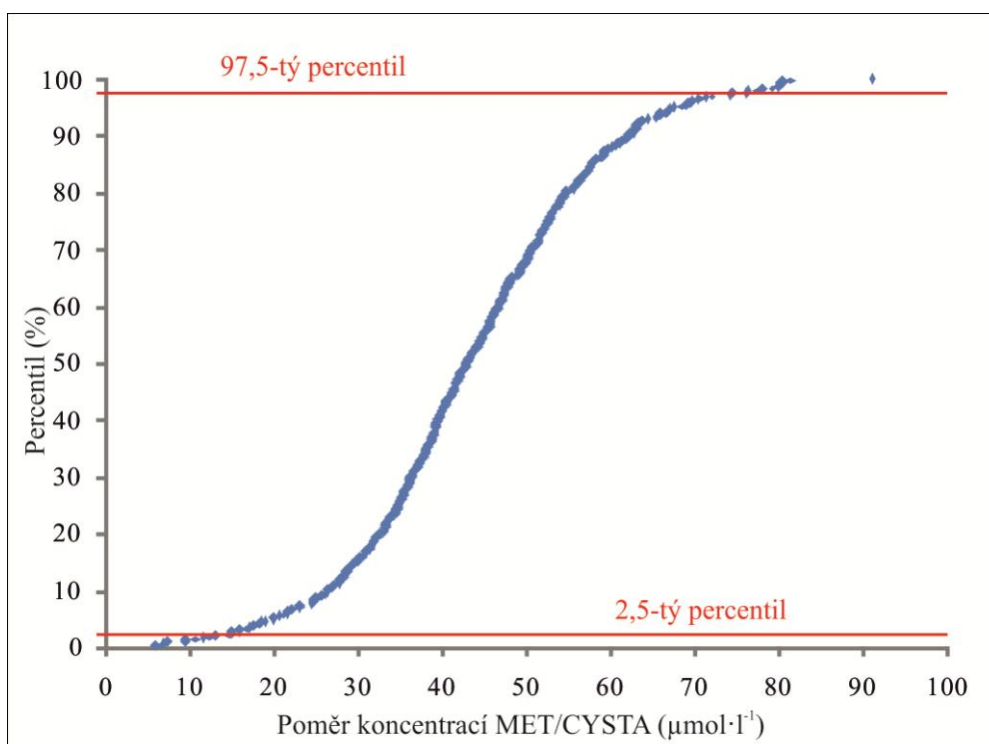
Obr. 30: Percentilový graf pro cystathionin.



Obr. 31: Percentilový graf pro methylmalonát.



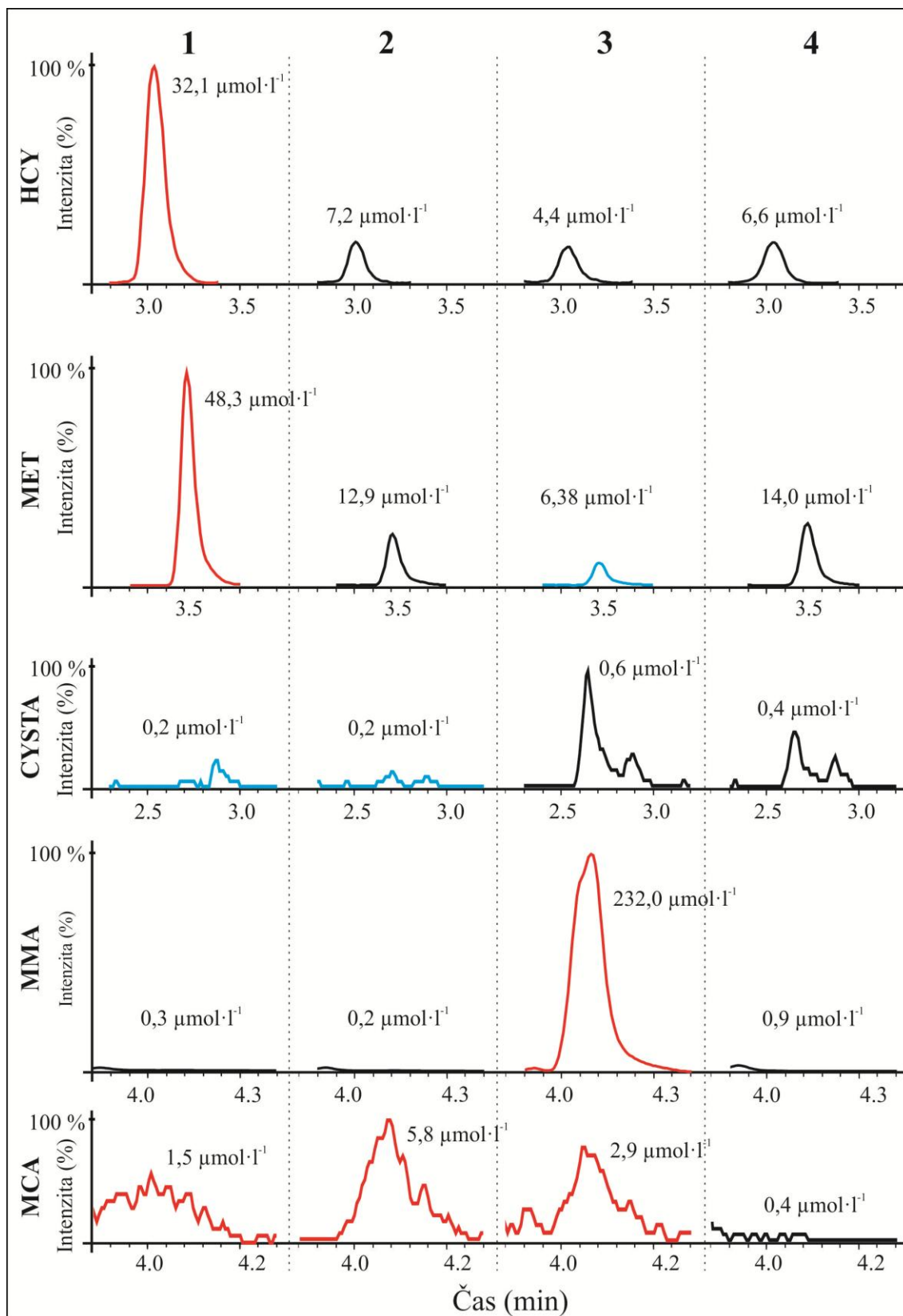
Obr. 32: Percentilový graf pro methyleitrát.



Obr. 33: Percentilový graf pro poměr MET/CYSTA.

4.5 ANALÝZA KREVNÍCH SKVRN S DIAGNOSTIKOVANOU PORUCHOU

Na závěr byla validovaná metoda uplatněna při analýze KS od pacientů, u kterých byla dříve potvrzena některá ze studovaných DMP. Konkrétně byly testovány krevní skvrny od pacientů s homocystinurií, methylmalonovou acidurií a propionovou acidemií. Na Obr. 34 je uvedeno porovnání intenzit píků analytů ve vzorcích pacientů a kontrolního vzorku. Píky byly normalizovány na interní značené standardy.



Obr. 34: Porovnání intenzit pík analytů ve vzorcích pacientů a kontrolním vzorku. 1 – homocysteinurie, 2 – propionová acidemie, 3 – methylmalonová acidurie, 4 – kontrola. Intenzity pík byly normalizovány značené standardy. Červená – zvýšená/velmi zvýšená koncentrace v rámci stanovených referenčních rozmezí, modrá – snížená koncentrace v rámci stanovených referenčních rozmezí, černá – koncentrace ležící v referenčním rozmezí.

5. DISKUZE

Cílem této diplomové práce bylo vyvinout a validovat HPLC-MS/MS diagnostickou metodu pro potvrzení primárních výsledků NBS a také pro využití v selektivním screeningu. Dosud totiž nebyla publikována HPLC-MS/MS metoda, která by umožňovala simultánní analýzu všech popsanych pěti analytů v suchých krevních skvrnách.

Vyvinutá metoda částečně vychází z dříve publikovaných metod, které se ovšem liší použitým diagnostickým materiálem (Fu, et al. (2013) popisuje detekci HCY, MCA, MMA a MET v krevní plasmě) nebo množstvím zahrnutých látek (Bártl et al. (2014) publikoval metodu pro stanovení CYSTA, MET a HCY, Alodaib et al. (2012) metodu pro stanovení HCY). Metoda byla přizpůsobena podmínkám a provozu LDMP FNOL tak, aby mohla být využívána v rámci plánovaného rozšíření NBS.

Jedná se o metodu druhostupňovou. V praxi to znamená, že nebude přímo aplikovaná na veškeré KS novorozenců zaslané do LDMP za účelem vyšetření NBS. Budou jí analyzovány jen ty vzorky pacientů, které budou v primárním MS/MS vyšetření vykazovat abnormální hladinu methioninu. Stanovení MET, HCY a CYSTA povede tedy v rámci rozšířeného NBS ke snížení falešné positivity výsledků v oblasti diagnostiky DMP metabolismu methioninu.

Zároveň bude stanovení MMA a MCA využíváno v rámci selektivního screeningu, kdy bude metoda aplikovaná na vzorky pacientů, u kterých již dochází k manifestaci klinických příznaků DMP. Metoda bude mít opět potvrzovací funkci, a to pro vzorky vykazující abnormální koncentraci propionylkarnitinu.

Původně byla podle Fu et al. (2013) vyvíjena metoda pouze pro čtyři analyty (MET, HCY, MMA a MCA), které byly separovány v systému reversních fází na koloně Waters BEH C18 (5 cm, 1.7 μ m, 2.1 mm). Tato metoda byla validována a byly stanoveny referenční meze. Byla také aplikována na 340 vzorků z NBS, které vykazovaly abnormální koncentraci MET a více než 100 vzorků, které vykazovaly abnormální koncentraci propionylkarnitinu. Nebyl zachycen žádný pozitivní nebo falešně pozitivní výsledek.

Poté bylo na základě publikace Stabler et al. (2013) rozhodnuto o zařazení CYSTA do metody. Autoři článku popisují diagnostický význam CYSTA a poměru MET/CYSTA v rozlišení hyperhomocysteinemie z důvodu deficitu cystathion- β -sythasy a z důvodu poruchy remethylace. Vyvinutou metodou na koloně C 18 se nám ovšem nepodařilo CYSTA téměř detekovat, problém se nedařilo vyřešit ani úpravou

gradientu, ani úpravou postupu přípravy vzorků. Nakonec bylo metodou postkolonové infuze zjištěno, že se CYSTA na koloně C 18 eluuje v mrtvém čase kolony. Podle publikace Bártl et al. (2014) byla tedy zvolena kolona C 8, na které byla optimalizována analýza všech pěti analytů včetně CYSTA. Po úpravě gradientu, nastavení optimálního přepnutí pozitivní a negativní ionizace, které je použito z důvodu úspory času, a všech dalších podmínek byla metoda znovu úspěšně validována. Zařazení přepnutí pozitivního a negativního módu ionizace bylo umožněno technickými parametry použitého tandemového hmotnostního analyzátoru.

Pro optimalizaci a validaci byly manuálně připraveny kalibrátory – krevní skvrny se známou přidanou koncentrací analytů. Kalibrovaný materiál – tedy KS s definovanou koncentrací analytů byly totiž komerčně dostupné pouze pro HCY. Tyto komerční kalibrátory byly rovněž analyzovány. Výsledky externí kalibrace byly srovnatelné s manuálně připravenou kalibrační řadou.

V průběhu analýz jsme zaznamenali neznámý pík s MRM přechodem odpovídajícím značenému MET s retenčním časem 2,6 min (Obr. 16). Značený methionin se ale začíná eluovat až v čase 3,4 min, proto neznámý pík nezpůsobil interferenci.

Pro stanovení referenčních rozmezí bylo změřeno 510 suchých krevních skvrn, které byly do LDMP zaslány za účelem vyšetření NBS a které v tomto vyšetření nevykazovaly abnormální koncentraci methioninu.

Metoda byla úspěšně uplatněna při analýze vzorků pacientů s diagnostikovanou DMP. Koncentrace markerů využívaných pro diagnostiku jednotlivých poruch byly pozorovány signifikantně mimo referenční meze.

Po zavedení metody do rutinního provozu budou metodou vyšetřovány vzorky pravděpodobně jednou týdně.

6. ZÁVĚR

V úvodních kapitolách byly uvedeny základní informace o novorozeneckém screeningu, vybraných dědičných metabolických poruchách a využití suchých krevních skvrn jako diagnostického materiálu. Také zde byly shrnuty validační parametry, které je nutné stanovit při zavádění diagnostických metod.

Druhá část práce se věnuje vývoji druhostupňové HPLC-MS/MS metody pro analýzu krevních skvrn, která bude využívána v LDMP FNOL v rámci novorozeneckého a selektivního screeningu. Byl popsán postup vývoje metody a stanovení validačních parametrů. Dále byly uvedeny získané referenční meze. Metoda byla rovněž aplikována na vzorky pacientů s homocystinurií, methylmalonovou acidurií a propionovou acidémií.

Metoda bude v průběhu roku 2015 uvedena do rutinního provozu.

LITERATURA

- Adam B. W., Hall E. M., Sternberg M., Lim T. H., Flores S.R. et al. (2011): The stability of markers in dried-blood spots for recommended newborn screening disorders in the United States. *Clinical Biochemistry* **44**, 1445 – 1450.
- Alodaib A. N., Carpenter K., Wiley V., Wotton T., Christodoulou J. et al. (2012): Homocysteine measurement in dried blood spot for neonatal detection of homocystinurias. *Journal of Inherited Metabolic Disease Reports* **5**, 1 – 6.
- Andria G., Fowler B., Sebastio G. (2008): Poruchy metabolismu sirných aminokyselin. In: *Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch*. 4.vyd., (Fernandes J., Saudubray J.-M., van den Berghe G., Walter J. H.), TRITON, Praha, 309 – 318.
- Augoustides-Savvopoulou P., Luka Z., Karyda S., Stabler S. P., Allen R. H. et al. (2003): Glycine N-methyltransferase deficiency: A new patient with a novel mutation. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **26**, 745 – 759.
- Azzabi S., Barhoumi A., Omar S., Ben Hassine L., Chérif E. et al. (2009): Homocystéinurie à revelation tardive: aspect clinique, biologique et évolutif. *Pathologie Biologie* **57**, 451 – 455.
- Barić I., Fumić K., Glenn B., Čuk M., Schulze A. et al. (2004): S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency in a human: A genetic disorder of methionine metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 4234 – 4239.
- Barić I., Čuk M., Fumić K., Vugrek O., Allen R. H. et al. (2005): S-adenosylhomocysteine hydrolase deficiency: A second patient, the younger brother of the index patient, and outcomes during therapy. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **28**, 885 – 902.
- Bártl J., Chrastina P., Krijt J., Hodík J., Pešková K. et al. (2014): Simultaneous determination of cystathionine, total homocysteine, and methionine in dried blood spots by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its utility for the management of patients with homocystinuria. *Clinica Chimica Acta* **437**, 211 – 217.
- Burgard P., Cornel M., Di Filippo F., Haeghe G., Hoffmann G. F. et al. (2011) EU Tender: Evaluation of population newborn screening practices for rare disorders in member states of the European Union – Short executive summary of the Report on the practices of newborn screening for rare disorders implemented in member states of the European Union, candidate, potential candidate and EFTA countries. International Society for Neonatal Screening.
- Carrillo-Carrasco N., Venditti Ch. P. (2012): Combined methylmalonic acidemia and homocystinuria cblC type II. Complications, pathophysiology, and outcomes. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **35**, 103 – 114.
- Carroll A. E., Downs S. M. (2006): Comprehensive cost-utility analysis of newborn screening strategies. *Pediatrics* **117**, 287 – 295.
- Demirev P. A. (2013) Dried blood spots: Analysis and applications. *Analytical Chemistry* **85**, 779 – 789.
- Diekman E. F., de Koning T. J., Verhoeven-Duif N. M., Rovers M. M., van Hasselt P. M. (2014): Survival and psychomotor development with early betaine treatment in patients with severe methylenetetrahydrofolate reductase deficiency. *JAMA Neurology* **71**, 188 – 194.
- Fisher S., Huemer M., Baumgartner M., Deodato F., Ballhausen D. et al. (2014): Clinical presentation and outcome in a series of 88 patients with the CblC defect. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **37**, 831 – 840.
- Fu X., Xu Y. K., Chan P., Pattengale P. K. (2013): Simple, fast and simultaneous detection of plasma total homocysteine, methylmalonic acid, methionine and 2-methylcitric acid using liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Inherited Metabolic Disease Reports*, **10**, 69 – 78.
- Gahl W. A., Bernardini I., Finkelstein J. D., Tangerman A., Martin J. J. et al. (1998): Transsulfuration in an adult with hepatic methionine adenosyltransferase deficiency. *The Journal of Clinical Investigation* **81**, 390 – 397.

- Guez S., Chiarelli G., Menni F., Salera S., Principi N., Esposito S. (2012): Severe vitamin B₁₂ deficiency in an exclusively breastfed 5-month-old Italian infant born to a mother receiving multivitamin supplementation during pregnancy. *BMC Pediatrics* **12**:85, doi: 10.1186/1471-2431-12-85.
- Hoffman G. F., Nyhan W. L., Zshocke J., Kahler S. G., Mayatepek E. (2006): *Dědičné metabolické poruchy*. Grada Publishing, a.s., Praha, 416 stran.
- Honzík T. (2011): Klinické příznaky dědičných metabolických poruch u dětí. *Pediatric pro praxi* **12**, 314 – 319.
- Chamberlin M. E., Ubagai T., Mudd S. H., Wilson W. G., Leonard J. V., Chou J. Y. (1996): Demyelination of the brain is associated with methionine adenosyltransferase I/III deficiency. *The Journal of Clinical Investigation* **98**, 1021 – 1027.
- Isa Y., Tsuge H., Hayakawa T. (2006): Effect of vitamin B₆ deficiency on S-adenosylhomocysteine hydrolase activity as a target point for methionine metabolic regulation. *Journal of nutritional science and vitaminology* **52**, 302 – 306.
- JCGM 200 (2012): *International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms* (VIM), 3. vydání. Joint Committee for Guides and Metrology. (108 stran)
- Kaliaperumal S., Kumar K. P., Bhuvaneshwari (2014): Varied phenotypic presentations of homocystinuria in two siblings. *Indian Journal of Ophthalmology* **62**, 93 – 94.
- Kožich V. (2010): Dědičné metabolické poruchy v pediatrii. *Postgraduální medicína* **12**, 793 – 800.
- Lehmann S., Delaby C., Vialaret J., Ducos J., Hirtz Ch. (2013): Current and future use of „dried blood spot“ analyses in clinical chemistry. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* **51**, 1897 – 1909.
- Martásek P., Svačina Š. (2010): Genetické příčiny poruch metabolismu. In: *Poruchy metabolismu a výživy*. (Svačina Š.), Galén, Praha, 11 – 16.
- Martínez-Gutiérrez J. D., Mencía-Gutiérrez E., Gracia-García-Miguel T., Gutiérrez-Díaz E., López-Tizón E. (2011): Classical familial homocystinuria in an adult presenting as an isolated lens subluxation. *International Ophthalmology* **31**, 227 – 232.
- Mudd S. H., Cerone R., Schiaffino M. C., Fantasia A. R., Minniti G. et al. (2001): Glycine N-methyltransferase deficiency: A novel inborn error causing persistent isolated hypermethioninaemia. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **24**, 448 – 464.
- Mudd S. H., Skovby F., Levy H. L., Pettigrew K. D., Wilcken B. et al. (1985): The natural history of homocystinuria due to cystathione β-synthase deficiency. *The American Journal of Human Genetics* **37**, 1 – 31.
- Nevoral J., Čepová, J., Feber J., Hyánek J., Janda J. et al. (2003): *Výživa v dětském věku*. Nakladatelství H&H, Jinočany, 434 stran.
- Nováková L., Douša M., Blatný P., Jandera P., Planeta J. et al. (2013): *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Vydali Nováková L. (Hradec Králové) a Douša M. (Klatovy), výroba publikace Europrint a.s., Praha, 235 stran.
- Pitt J. J. (2010): Newborn screening. *Clinical Biochemist Reviews* **31**, 57 – 68.
- Prasad A. N., Rupa Ch. A., Prasad Ch. (2011): Methylentetrahydrofolatreductase (MTHFR) deficiency and infantile epilepsy. *Brain & Development* **33**, 758 – 769.
- van der Put N. M. J., Gabreels F., Stevens E. M. B., Smeitink J. A. M., Trijbels F. J. M. et al. (1998): A second common mutation in the methylenetetrahydrofolate reductase gene: an additional risk factor for neural-tube defects? *The American Journal of Human Genetics* **62**, 1044 – 1051.
- Rosenblatt D. S., Fowler B. (2008): Poruchy transportu a metabolismu kobalaminu a folátů. In: *Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch*. 4.vyd., (Fernandes J., Saudubray J.-M., van den Berghe G., Walter J. H.), TRITON, Praha, 379 – 395.
- Roumeliotis N., Dix D., Lipson A. (2012): Vitamin B₁₂ deficiency in infants secondary to maternal causes. *Canadian Medical Association Journal* **184**, 1593 – 1598.
- Sista R. S., Eckhardt A. E., Wang T., Graham C., Rouse J. L. et al. (2011): Digital microfluidic platform for multiplexing enzyme assays: Implications for lysosomal storage disease screening in newborns. *Clinical Chemistry* **57**, 1444 – 1451.

- Scolamiero E., Villani G. R. D., Ingenito L., Pecce R., Albano L. et al. (2014): Maternal vitamin B₁₂ deficiency in expanded newborn screening. *Clinical Biochemistry* **47**, 312 – 317.
- Stabler S. P., Korson M., Jethwa R., Allen R. H., Kraus J. P. et al (2013): Metabolic profiling of total homocysteine and related compounds in hyperhomocysteinemia: utility and limitations in diagnosing the cause of puzzling thrombophilia in a family. *Journal of Inherited Metabolic Disease Reports*, **11**, 149 – 163.
- Strunecká A. (2011): Homocystein jako rizikový faktor v psychiatrii. *Psychiatrie* **2**, 79 – 83.
- Tanna S., Lawson G. (2011): Analytical method used in conjunction with dried blood spots. *Analytical Methods* **3**, 1709 – 1718.
- Turgeon C. T., Magera M. J., Cuthbert C. D., Loken P. R., Gavrilov D. K. et al. (2010): Determination of total homocysteine, methylmalonic acid, and 2-methylcitric acid in dried blood spots by tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry* **56**, 1686 – 1695.
- Věstník Ministerstva zdravotnictví České Republiky, ročník 2009, částka 6.
- Wendel U., Ogier de Baulny H. (2008): Organické acidurie z poruch metabolismu větvených aminokyselin. In: *Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch*. 4.vyd., (Fernandes J., Saudubray J.-M., van den Berghe G., Walter J. H.), TRITON, Praha, 309 – 318.
- Žák A., Zeman M. (2010): Význam hyperhomocysteinémie. In: *Poruchy metabolismu a výživy*. (Svačina Š.), Galén, Praha, 298 – 306.

Národní sdružení PKU a jiných dědičných metabolických poruch:
<http://www.nspku.cz/potraviny/zakazane-a-povolene-potraviny/hcu.html> (21. 3. 2014)

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AdoCbl	adenosinkobalamin
Cbl	kobalamin
CE	kolizní energie
CXP	výstupní potenciál kolizní cely
CYSTA	cystathionin
DMP	dědičné metabolické poruchy
DP	deklasterační potenciál
EP	vstupní potenciál
FIA-TMS	flow-injection analysis – tandem mass spektrometry (přímý nástřik ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií)
FNOL	Fakultní nemocnice Olomouc
HCY	homocystein
KS	krvní skvrna
LDMP	Laboratoř dědičných metabolických poruch
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
MCA	methylcitrát
MeCbl	methylkobalamin
MET	methionin
MMA	methylmalonát, methylmalonová kyselina
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NBS	novorozenecký screening
OHCB1	hydroxykobalamin
SAH	S-adenosyl-homocystein
SAM	S -adenosyl-methionin
THF	tetrahydrofolát
HPLC	kapalinová chromatografie