

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
LÉKAŘSKÁ FAKULTA



NOVÉ ANALYTICKÉ PLATFORMY PRO DIAGNOSTIKU
DĚDIČNÝCH METABOLICKÝCH PORUCH A JEJICH
APLIKACE V KLINICKÉ PRAXI

DISERTAČNÍ PRÁCE

Mgr. Eliška Ivanovová

Školitel: prof. RNDr. David Friedecký, Ph.D.

Studijní program: Lékařská genetika

Olomouc 2024

Prohlašuji, že jsem disertační práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Davida Friedeckého, Ph.D. s použitím uvedené literatury, kterou cituji.

V Olomouci dne 26. 6. 2024

.....
Mgr. Eliška Ivanovová

Poděkování

Děkuji vedoucímu práce, prof. RNDr. Davidovi Friedeckému, Ph.D., za jeho rady, ochotu a podporu během celého postgraduálního studia. Dále bych chtěla poděkovat za spolupráci svým kolegům a celému kolektivu z Laboratoře dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc. V neposlední řadě děkuji všem, kteří mě ve studiu podporovali.

Abstrakt

Diagnostika dědičných metabolických poruch (DMP) vyžaduje komplexní hodnocení napříč různými obory, které zahrnuje klinické posouzení stavu pacienta lékařem, biochemické a zobrazovací vyšetření, stanovení enzymové aktivity či genetické testování. Včasná diagnosa a zahájení vhodné léčby jsou klíčovými faktory pro dobrou prognosu onemocnění.

Laboratorní diagnostika založená na analýze specifických metabolitů je součástí diferenciální diagnostiky těchto onemocnění. Pro dosažení detailního přehledu o metabolickém profilu je nepostradatelné analyzovat co nejširší spektrum diagnosticky významných biomarkerů. Nejen z tohoto důvodu se v laboratořích v poslední době uplatňují pokročilé analytické techniky, mezi něž se řadí také kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Pro svou univerzálnost, robustnost, citlivost a rychlost odpovídá požadavkům urgentní medicíny.

V této práci jsou popsány dvě nové analytické platformy pro diagnostiku DMP, které byly otestovány a úspěšně zavedeny do klinické praxe v Laboratoři dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie Fakultní nemocnice Olomouc. První platforma je založená na hydrofilní interakční chromatografii ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií, která byla primárně vyvinuta za účelem stanovení purinů a pyrimidinů. V průběhu rutinní praxe byla metoda rozšířena o další diagnosticky významné analyty (celkem 65), jako jsou vybrané acetylované aminokyseliny, acylglyciny, cukry a další. Jedná se tak o metodu, která je jedinečná v pokrytí široké škály metabolitů. Součástí přístupu je jednoduchý diagnostický pracovní postup, jehož cílem bylo dosáhnout snadného vyhodnocení a interpretace komplexních dat.

V druhé části práce je popsána nová rychlá a účinná LC-MS/MS metoda pro stanovení vybraných organických kyselin a acylkarnitinů ve vzorcích suchých krevních skvrn (DBS). Tato metoda je aplikována jako druhostupňová u vzorků DBS, u nichž byl pozorován abnormální nález v koncentraci C3-, C4- nebo C5-karnitinů v rámci novorozeneckého a selektivního screeningu DMP, které jsou prováděny metodou přímého nástřiku.

Aplikace nových analytických platform do rutinního provozu laboratoře přinesla zjednodušení, zrychlení a zefektivnění diagnostiky vybraných DMP.

Klíčová slova: dědičné metabolické poruchy, diagnostika, hmotnostní spektrometrie, kapalinová chromatografie

Abstract

Diagnosis of inherited metabolic disorders (IMD) requires a comprehensive evaluation across multiple disciplines, including a clinical assessment of the patient's condition by a physician, biochemical and imaging testing, enzyme activity assays, and genetic testing. Early diagnosis and initiation of appropriate treatment are key factors for a good prognosis of the disease.

Laboratory diagnosis based on the analysis of specific metabolites is a part of the differential diagnosis of these disorders. To achieve a detailed overview of the metabolic profile, it is essential to analyse as wide a spectrum of diagnostically relevant biomarkers as possible. Not only for this reason, advanced analytical techniques have recently been applied in laboratories, including liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Due to its versatility, robustness, sensitivity and rapidness, it meets the requirements of emergency medicine.

This thesis presents two new analytical platforms for the diagnosis of IMD which have been tested and successfully introduced into clinical practice in the Laboratory of Inherited Metabolic Disorders, Department of Clinical Biochemistry, Olomouc University Hospital. The first platform is based on hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry, which was primarily developed for the determination of purines and pyrimidines. During the routine practice, the method has been extended to other diagnostically important analytes (65 in total), such as selected acetylated amino acids, acylglycines, sugars and others. Therefore, it is a method that is unique in its coverage of a wide range of metabolites. The approach includes a simple diagnostic workflow that was designed to achieve easy evaluation and interpretation of complex data.

In the second part of the paper, a new rapid and efficient LC-MS/MS method for the determination of selected organic acids and acylcarnitines in samples of dried blood spots (DBS) is described. The method is applied as a second-tier to DBS samples in which abnormal findings in C3-, C4- or C5-carnitines levels have been observed in the context of newborn and selective screening of IMD performed by direct injection.

The application of the new analytical platforms to routine practice of the laboratory simplified, speeded and streamlined the diagnosis of selected IMD.

Keywords: inherited metabolic disorders, diagnosis, mass spectrometry, liquid chromatography

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	11
3	TEORETICKÁ ČÁST	12
3.1	Dědičné metabolické poruchy	12
3.2	Vývoj diagnostiky vybraných dědičných metabolických poruch	14
3.2.1	Poruchy metabolismu purinů a pyrimidinů	14
3.2.2	Organické acidurie	18
3.2.2.1	Analýza organických kyselin	19
3.2.2.2	Analýza acylkarnitinů	19
3.2.2.3	Analýza acylglycinů	20
3.3	Kapalinová chromatografie (LC)	21
3.4	Hmotnostní spektrometrie (MS)	23
3.5	Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS)	24
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
4.1	Stanovení široké škály metabolitů v moči pomocí nové LC-MS/MS metody pro diagnostiku dědičných metabolických poruch	27
4.1.1	Materiál a metody	27
4.1.1.1	Přístrojové vybavení	27
4.1.1.2	Chemikálie	27
4.1.1.3	Biologický materiál	28
4.1.1.4	Příprava zásobních roztoků standardů	28
4.1.1.5	Příprava směsi interních standardů	29
4.1.1.6	Příprava standardů kalibrační křivky	29
4.1.1.7	Příprava vzorků kontroly kvality	29
4.1.1.8	Příprava vzorku vnitřní kontroly kvality	30
4.1.1.9	Příprava směsného vzorku moče zdravých kontrol	30
4.1.1.10	Příprava vzorků moči zdravých kontrol, pacientů a externího hodnocení kvality	30
4.1.1.11	Vývoj LC-MS/MS metody	30
4.1.1.12	LC-MS/MS analýza	31
4.1.1.13	Validace metody	31
4.1.1.14	Diagnostika pacientů	33
4.1.1.15	Analýza dat	34
4.1.2	Výsledky	34

4.1.2.1	Vývoj LC-MS/MS metody	34
4.1.2.2	Validace metody	36
4.1.2.3	Diagnostika pacientů	39
4.1.2.4	Externí hodnocení kvality	45
4.1.3	Diskuze	48
4.2	Rychlá a účinná LC-MS/MS metoda pro screening vybraných organických kyselin a acylkarnitinů v suché krevní skvrně	51
4.2.1	Materiál a metody	51
4.2.1.1	Přístrojové vybavení	51
4.2.1.2	Chemikálie	52
4.2.1.3	Příprava zásobních roztoků standardů	52
4.2.1.4	Příprava směsi interních standardů	52
4.2.1.5	Biologický materiál	52
4.2.1.6	Příprava vzorků suchých krevních skvrn	53
4.2.1.7	Vývoj LC-MS/MS metody	53
4.2.1.8	LC-MS/MS analýza	53
4.2.1.9	Analýza vybraných organických kyselin a acylkarnitinů ve vzorcích suchých krevních skvrn	54
4.2.1.10	Analýza dat	54
4.2.2	Výsledky	54
4.2.2.1	Vývoj LC-MS/MS metody	54
4.2.2.2	Analýza vybraných organických kyselin a acylkarnitinů ve vzorcích suchých krevních skvrn	55
4.2.3	Diskuze	61
5	ZÁVĚR	64
5.1	Stanovení široké škály metabolitů v moči pomocí nové LC-MS/MS metody pro diagnostiku dědičných metabolických poruch	64
5.2	Rychlá a účinná LC-MS/MS metoda pro screening vybraných organických kyselin a acylkarnitinů v suché krevní skvrně	64
6	VÝHLEDY	65
6.1	Stanovení široké škály metabolitů v moči pomocí nové LC-MS/MS metody pro diagnostiku dědičných metabolických poruch	65
6.2	Rychlá a účinná LC-MS/MS metoda pro screening vybraných organických kyselin a acylkarnitinů v suché krevní skvrně	65
7	SEZNAM ZKRATEK	66
8	LITERATURA	70
9	SEZNAM PRACÍ	82
9.1	Publikace s IF vztahující se k disertaci	82

9.2	Ostatní publikace s IF	82
9.3	Příspěvky na konferencích vztahující se k disertaci	83
9.4	Ostatní příspěvky na konferencích	84
10	PŘÍLOHY	86
10.1	Příloha 1: Detailní charakteristika vzorků pacientů s DMP	86
10.2	Příloha 2: Pracovní rozsah kalibrační křivky a nominální koncentrace QC vzorků	89
10.3	Příloha 3: MS/MS parametry analytů a interních standardů ve vyvinuté LC-MS/MS metodě	91
10.4	Příloha 4: Parametry kalibračních křivek, LOD a LOQ	94
10.5	Příloha 5: Vnitrodenní správnost a přesnost ($n = 5$)	99
10.6	Příloha 6: Mezidenní správnost a přesnost ($n = 15$)	106
10.7	Příloha 7: MS/MS parametry analytů a interních standardů ve vyvinuté LC-MS/MS metodě	109

1 ÚVOD

Dědičné metabolické poruchy (DMP) představují velkou skupinu geneticky podmíněných onemocnění, které ovlivňují klíčové metabolické dráhy v lidském organismu. Jsou spojeny s vysokou morbiditou a mortalitou zejména v novorozeneckém období. Rozvíjí se v důsledku mutací v genech, které kódují důležité enzymy či transportní proteiny nezbytné pro fyziologický metabolismus látek. Normální průběh látkové výměny spočívá v přeměně substrátu na produkt za účasti specifického proteinu. V případě narušení rovnováhy v tomto systému dochází k hromadění látek (v nadbytku toxických) v tkáních a tělních tekutinách, nedostatku základních molekul a vzniku alternativních produktů. Vzájemné propojení metabolických drah pak může vést k multisystémovému selhání.

Klinické projevy těchto onemocnění mohou být různé, navíc často nespecifické. Nejen tyto charakteristiky, nýbrž také např. variabilní expresivita či penetrance, poukazují na komplexnost onemocnění. Ačkoliv z těchto důvodů není diagnostika jednoduchá, v prognose onemocnění hraje vysokou roli. Vyžaduje však mezioborový přístup zahrnující klinickou medicínu, biochemii a genetiku.

Současná diferenciální diagnostika využívá různých laboratorních metod pro stanovení specifických metabolitů. Jednou z klíčových technik posledních dvou desetiletí se stala kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS), která našla své uplatnění zejména v rámci multikomponentních analýz. Definitivní diagnosa je však vždy stanovena pouze pomocí genetického či enzymového testování, což je časově a finančně náročnější. Pro rychlý screening je proto vyšetřování biomarkerů pomocí LC-MS/MS nepostradatelnou součástí diferenciální diagnostiky.

Tato práce popisuje dvě nové analytické platformy pro diagnostiku DMP, které byly otestovány a úspěšně zavedeny do klinické praxe v Laboratoři dědičných metabolických poruch, Oddělení klinické biochemie FN Olomouc. Jejich aplikace v rutinním provozu přinesla zjednodušení, zrychlení a zefektivnění diagnostiky vybraných DMP.

První LC-MS/MS metoda umožňuje simultánní analýzu 65 biomarkerů ze spektra purinů, pyrimidinů, *N*-acylglycinů, *N*-acetylovaných aminokyselin, cukrů, cukerných

alkoholů a dalších diagnosticky významných biomarkerů v moči. Analýzu těchto látek bylo doposud nezbytné provádět za pomoci různých technik a metod, což bylo časově a finančně náročné. Nový přístup zahrnuje pracovní postup, který představuje poloautomatické vyhodnocení pomocí robustního škálování za využití pokročilých vizualizačních nástrojů.

Druhá analytická platforma slouží ke stanovení vybraných organických kyselin a acylkarnitinů ve vzorcích suchých krevních skvrn (DBS). Umožňuje analýzu všech isomerů C4- a C5-karnitinů a organických kyselin, které jsou spjaté s elevací C3-karnitinu. Je využívána jako druhostupňová metoda u vzorků DBS, u nichž byl zjištěn metodou přímého nástřiku abnormální nález v koncentraci C3-, C4- nebo C5-karnitinů v rámci novorozeneckého a selektivního screeningu DMP.

2 CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

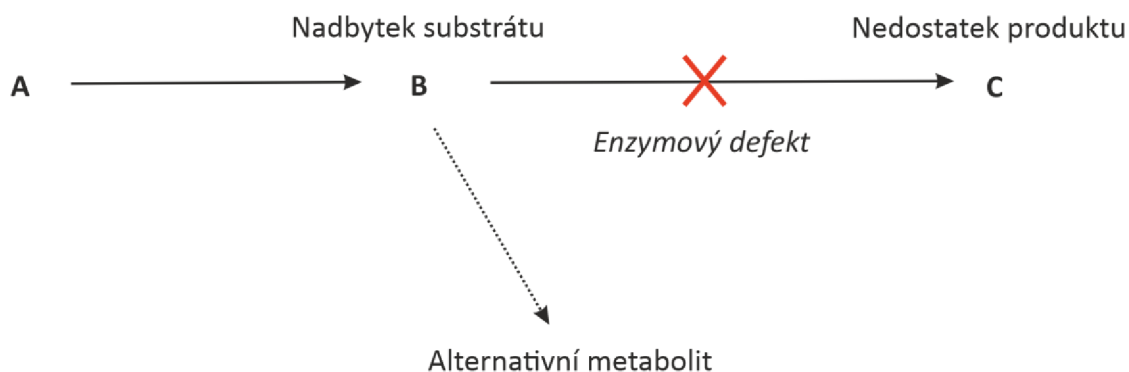
- Poskytnout přehled o dědičných metabolických poruchách a vývoji diagnostiky poruch metabolismu purinů a pyrimidinů a organických acidurií.
- Vynout nové analytické platformy pro diagnostiku dědičných metabolických poruch.
- Aplikovat vyvinuté analytické platformy do klinické praxe.

3 TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Dědičné metabolické poruchy

Koncept vrozených metabolických poruch poprvé navrhl v roce 1908 anglický lékař Archibald Garrod, dnes uznávaný jako průkopník studia vrozených vad metabolismu a lékařské genetiky. Jeho empirické zkoumání je spojováno se čtyřmi poruchami – alkaptonurie (OMIM #203500), pentosurie (OMIM #260800), cystinurie (OMIM #220100) a albinismus (OMIM #203100) (1). Rostoucí význam biochemie v medicíně na počátku minulého století vedl k významnému milníku v rozvíjejícím se oboru, a to k objevu fenylketonurie (PKU, OMIM #261600). Popis PKU byl přelomovou událostí v historii studia metabolismu, jelikož se ukázalo, že tato porucha je zodpovědná za poměrně frekventované mentální postižení na celém světě. V průběhu let byl koncept omezení stravy zaveden jako standard léčby vybraných dědičných metabolických poruch (DMP), což v případě PKU spočívalo v omezení fenylalaninu ve stravě (2).

Za posledních 20 let bylo objeveno dalších více než 1900 DMP (3). Jedná se obvykle o monogenní poruchy, pro které je typická zejména autosomálně recesivní dědičnost, méně pak dědičnost autosomálně dominantní či s vazbou na chromosom X (4). Pro tuto heterogenní skupinu onemocnění jsou charakteristické mutace v genomové nebo mitochondriální DNA, které jsou spojeny s morbiditou a mortalitou zejména v novorozeneckém období a dětství (5). V důsledku změny v genetické informaci dochází k defektu v enzymu/specifickém proteinu, jehož nesprávná funkce vede ke změnám v určité metabolické dráze (6). Každá enzymová dráha závisí na určitých substrátech a specifických enzymech, které zajišťují fyziologický průběh reakce. Narušení enzymové reakce se projevuje toxickou akumulací substrátů před metabolickým blokem a/nebo nedostatkem produktů. Za určitých okolností může být substrát přesměrován do alternativní dráhy za vzniku alternativních metabolických produktů (Obr. 1). Právě obnovení homeostázy narušené metabolické dráhy je podstatou úspěšné léčby těchto onemocnění (7).



Obr. 1: Garrodova hypotéza. Převzato a upraveno podle Rajappa et al. (6).

První příznaky DMP se nejčastěji objevují po narození, často po několika dnech či týdnech života. Ve fetálním období jsou hromaděné molekuly snadno vylučovány placentou matky, z čehož vyplývá, že k propuknutí klinických potíží je nezbytná inicializace vlastního metabolismu. Ačkoliv se DMP rozvíjí spíše v novorozeneckém a dětském věku, některé z nich se mohou projevit až v dospělosti (8). Klinická prezentace těchto onemocnění může být různá, což souvisí se závažností enzymového postižení. Nejčastěji se jedná o neurologické (např. opožděný vývoj, hypotonie, záchvaty) a gastrointestinální (např. hepatomegalie, zvracení, průjem, potravinová intolerance) abnormality. Nespecifičnost těchto příznaků často komplikuje diagnostiku DMP, a tím včasnou léčbu. U každého dítěte s neurologickými a/nebo gastrointestinálními symptomy by proto měly být DMP součástí diferenciální diagnostiky (9). Nespecifické příznaky mohou být doprovázeny akutními metabolickými krizemi, které lze překonat okamžitou aplikací intravenosní glukosy jakožto energetického metabolického substrátu, dále rehydratací a korekcí iontových abnormalit (10).

Vzácnost jednotlivých onemocnění přispívá ke komplexitě DMP. Některá onemocnění jsou pro svůj nízký výskyt doposud neprobádaná. Léčba takových onemocnění je často nejistá v souvislosti s absencí klinických poznatků. Velká část DMP způsobuje nevratné poškození již v raném stadiu onemocnění, a proto hraje včasná diagnosa a vhodná léčba klíčovou roli v progresi onemocnění (6).

Diagnostika velké skupiny DMP představuje pro lékaře velkou výzvu vzhledem k charakteristice onemocnění, a proto v rámci diferenciální diagnostiky hraje zcela zásadní roli laboratorní diagnostika založená na měření specifických metabolitů v tělních

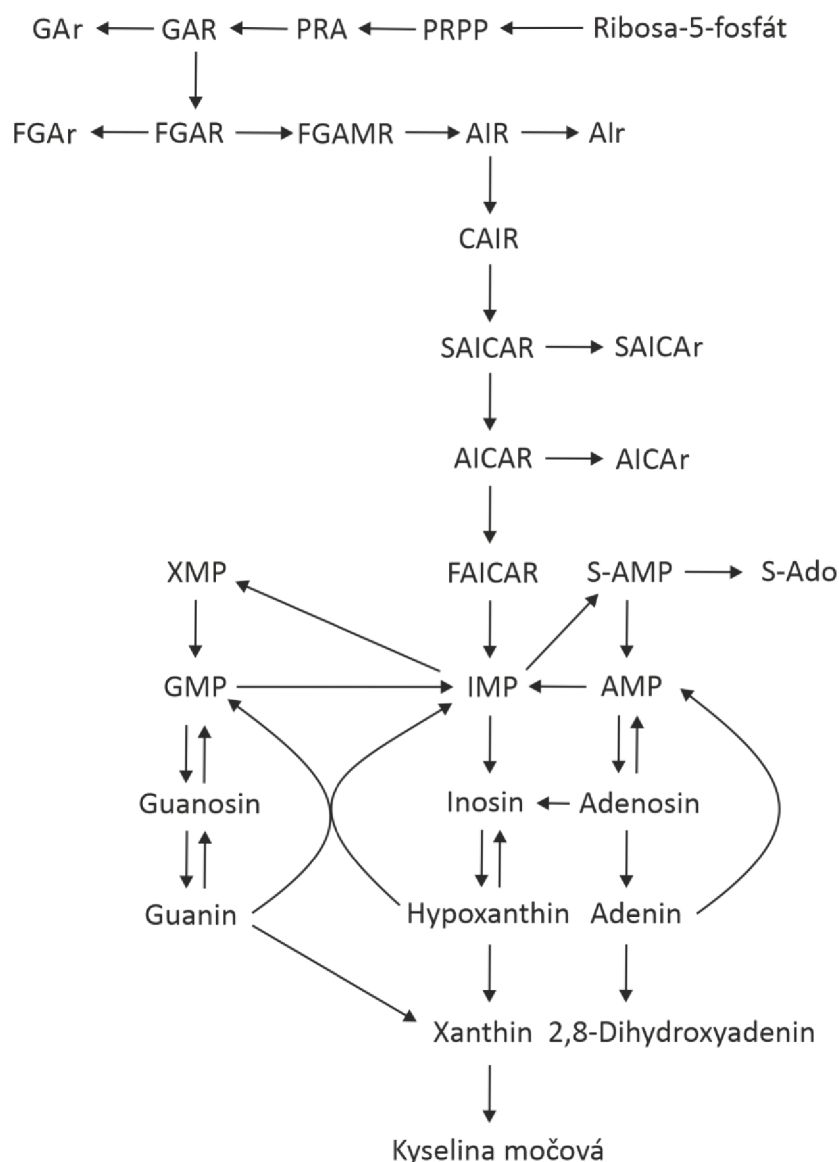
tekutinách. Analýza širokého spektra biomarkerů, která by alespoň částečně pokrývala hlavní skupiny DMP, však není snadná. Multikomponentní analýzy biologických vzorků vyžadují pokročilé analytické techniky, přičemž jednou z nich je kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (z angl. *Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, LC-MS/MS). Starší analytické techniky jsou v laboratořích postupně nahrazovány LC-MS/MS metodami pro jejich univerzálnost, robustnost, citlivost a rychlost (10, 11).

3.2 Vývoj diagnostiky vybraných dědičných metabolických poruch

3.2.1 Poruchy metabolismu purinů a pyrimidinů

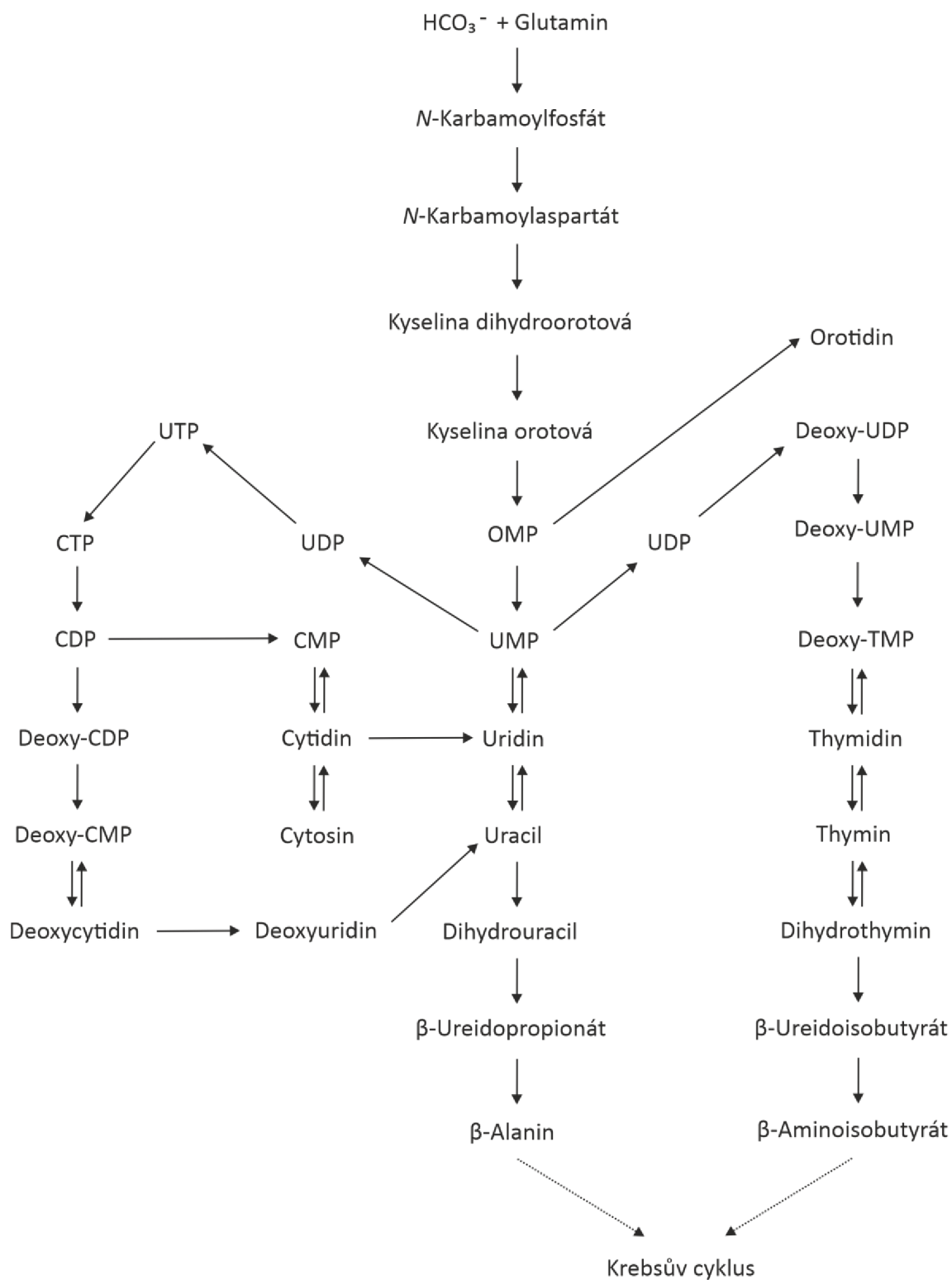
Puriny a pyrimidiny patří mezi základní buněčné složky, které se podílejí na mnoha důležitých biologických procesech (12). Tyto dusíkaté báze jsou stavebními jednotkami nukleotidů, jejichž spojení dává vznik nukleovým kyselinám (DNA a RNA), které ve své struktuře uchovávají genetickou informaci. Kromě toho se podílejí např. na regulaci metabolismu, přenosu energie, transdukci signálu nebo tvorbě koenzymů, fosfolipidů a glykolipidů.

V případě, že je metabolismus purinů (Obr. 2) a pyrimidinů (Obr. 3) narušen enzymovým defektem, dochází k rozvoji onemocnění, jehož klinická prezentace může být vážná (13). V současné době je známo více než 35 enzymových defektů v metabolismu purinů a pyrimidinů (13, 14). Incidence takových onemocnění je různá. V literatuře se uvádí incidence 1:50 000 pro deficit adeninfosforibosyltransferasy (APRTD, OMIM #102600) (15), zatímco pro hereditární orotovou acidurii (HOA, OMIM #258900) je to 1:1 000 000 (16).



Obr. 2: Zjednodušené schéma purinového metabolismu. Převzato a upraveno podle Cremonesi et al. (17).

Zkratky: AICAR, aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid; AICAr, aminoimidazol-4-karboxamid ribosid; AIR, aminoimidazol ribonukleotid; Alr, aminoimidazol ribosid; AMP, adenosinmonofosfát; CAIR, karboxyaminoimidazol ribonukleotid; FAICAR, 5'-fosforibosyl-5-formamido-4-imidazolkarboxamid; FGAMR, N-formylglycinamidin ribonukleotid; FGAR, formylglycinamid ribonukleotid; FGAr, formylglycinamid ribosid; GAR, N-glycinamid ribonukleotid; GAR, N-glycinamid ribosid; GMP, guanosinmonofosfát; IMP, inosinmonofosfát; PRA, fosforibosylamin; PRPP, fosforibosyldifosfát; S-Ado, sukcinyladenosin; SAICAR, N-sukcinokarboxamid-5-aminoimidazol-4-ribonukleotid; SAICAr, N-sukcinokarboxamid-5-aminoimidazol-4-ribonukleosid; S-AMP, sukcinyladenosinmonofosfát; XMP, xanthosinmonofosfát.



Obr. 3: Zjednodušené schéma pyrimidinového metabolismu. Převzato a upraveno podle Cremonesi et al. (17).

Zkratky: CDP, cytidindifosfát; CMP, cytidinmonofosfát; CTP, cytidintrifosfát; TMP, thymidinmonofosfát; OMP, orotidinmonofosfát; UDP, uridindifosfát; UMP, uridinmonofosfát; UTP, uridintrifosfát.

Až do roku 2000 se pro screening poruch metabolismu purinů a pyrimidinů používaly metody založené převážně na technice vysokoúčinné kapalinové chromatografie (z angl. *High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC) ve spojení s UV detekcí, které však byly časově náročné. V roce 2000 Ito a jeho kolektiv představili novou metodu, která je založená na kapalinové chromatografii s reverzní fází ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (z angl. *Reversed-Phase Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry*, RPLC-MS/MS). Tato metoda sloužila k rychlému screeningu více než 15 purinů a pyrimidinů v moči (18).

V průběhu dalších let byly vyvinuty LC-MS/MS metody ke stanovení pyrimidinů (19, 20). V roce 2005 Schmidt a jeho kolektiv představili novou RPLC-MS/MS metodu rozšířenou o β -aminokyseliny (β -alanin a β -aminoisobutyryát), degradační produkty pyrimidinového metabolismu, kterou aplikovali na 450 močí od dětí s nespecifickými neurologickými příznaky a 200 močí od zdravých dětí (20).

Následně byly vyvinuty další LC-MS/MS metody umožňující simultánní analýzu purinů a pyrimidinů (21, 22). V roce 2019 Monostori a jeho kolektiv představili novou LC-MS/MS metodu (23) rozšířenou o další diagnosticky významné markery, jako jsou sukcinylaminoimidazolkarboxamid ribosid (SAICAr), aminoimidazol-4-karboxamid ribosid (AICAr), β -ureidoisomáselná kyselina, 2,8-dihydroxyadenin a orotidin, což usnadnilo diagnostiku několika dalších onemocnění, a to zejména deficitu adenylosukcinátlyasy (ADSLD, OMIM #103050), AICA-ribosidurie (OMIM #608688), APRTD, HOA a deficitu β -ureidopropionasy (OMIM #613161). Vzhledem k tomu, že SAICAr nebyl v dřívějších LC-MS/MS metodách (18, 21, 22) zahrnut, bylo nezbytné jej v laboratořích vyšetřovat samostatně pomocí Bratton-Marshallova testu. Rozšíření LC-MS/MS metody o SAICAr lze považovat za významný pokrok v analýze purinů a pyrimidinů.

V roce 2019 se Krijt *et al.* zaměřili na RPLC-MS/MS stanovení defosforylovaných meziproduktů purinové *de novo* syntesy (PDNS) a umožnili tak diagnostiku nově popsaných onemocnění v této dráze. Konkrétně se jednalo o deficit fosforibosylaminoimidazolkarboxylasy (OMIM #172439) a fosforibosylformylglycinamidinsyntasy (PFASD, OMIM #602133). V této studii analýzou více než 1400 vzorků močí od pacientů s různými formami neurologického postižení odhalili tři vzorky močí s mírně zvýšenou koncentrací aminoimidazol ribosidu

(Alr) a jeden vzorek moči s enormně zvýšenou koncentrací formylglycinamid ribosidu (FGAr) svědčící pro suspektní PFASD. Stanovení meziproduktů PDNS u pacientů s neurologickými příznaky může hrát klíčovou roli pro odhalení příčiny závažných buněčných a funkčních poruch (24, 25).

Jedna z nejnovějších LC-MS/MS metod byla vyvinuta v roce 2023 v laboratoři Cremonesi *et al.* s cílem rozšířit běžně analyzovaný panel purinů a pyrimidinů o několik dalších diagnosticky významných biomarkerů (celkem 41) jako jsou kyselina dihydroorotová, kyselina močová, vybrané degradační produkty pyrimidinů a nové biomarkery „upstream“ dráhy před SAICAr (17).

3.2.2 Organické acidurie

Organické acidurie jsou heterogenní skupina DMP, jejichž společným biochemickým znakem je hromadění neaminových mono-, di- a trikarboxylových kyselin, které označujeme jako organické kyseliny. Jejich akumulace v tělních tekutinách může vést k poškození orgánů, přičemž často je postižen mozek (26). Rozvoj organické acidurie souvisí s narušením metabolické homeostázy, což často ústí v metabolickou acidosu, ketosu a jiné metabolické následky (8, 27).

Klinické příznaky se u těchto poruch objevují již během prvních týdnů života novorozence. U pacientů se může rozvinout akutní encefalopatie, v jiném případě dochází k progresivním neurologickým projevům, které vedou k trvalému mozkovému poškození. Patofyziologie mozkové dysfunkce je zatím v současnosti u většiny organických acidurií stále nejasná (28).

Organické kyseliny jsou ve vodě rozpustné sloučeniny obsahující jednu nebo více karboxylových nebo jiných funkčních skupin. V případě organických acidurií se toxické acyl-CoA nahromaděné v těle vylučují jako organické kyseliny nebo se také v rámci detoxikačního mechanismu v mitochondriích konjugují s glycinem/karnitinem. Vzniklé konjugáty, acylglyciny a acylkarnitiny, se z těla vylučují močí spolu s ostatními organickými kyselinami. Jedná se o klíčové metabolity v diagnostice organických acidurií (29).

3.2.2.1 Analýza organických kyselin

První pacient s organickou acidurií, přesněji isovalerovou acidurií (IVA, OMIM #243500), byl popsán již v 60. letech minulého století (30). Analýza organických kyselin v moči pacienta byla v té době provedena pomocí techniky plynové chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií (z angl. *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*, GC-MS), která se dodnes v rutinních laboratořích používá pro diagnostiku organických acidurií (31, 32). Tato technika uživatelům nabízí zejména vysokou separační účinnost a selektivitu (33). Celkově se však jedná o časově náročnou a pracnou techniku kvůli nezbytné extrakci a derivatizaci vzorku. Různá extrakční účinnost může ovlivňovat výtěžnost analytů. K analýze je navíc potřeba velký objem vzorku moči (cca 2 ml), který v některých případech nemusí být snadné získat. Samotné vyhodnocení je zdlouhavé a vyžaduje personál s dlouholetými zkušenostmi. S ohledem na tyto limitace se v posledních letech tato technika nahrazuje kapalinovou chromatografií ve spojení s hmotnostní spektrometrií (z angl. *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*, LC-MS) (34-39) nebo nukleární magnetickou rezonanční spektroskopií (40, 41).

V roce 2018 byla Korver-Keularts *et al.* představena nová RPLC-MS/MS metoda pro analýzu 71 diagnosticky významných biomarkerů pro poruchy metabolismu aminokyselin, neurotransmiterů, mastných kyselin, purinů a pyrimidinů a dalších. Metoda byla aplikována na 99 vzorků močí pacientů s 32 různými DMP a 88 kontrolních vzorků. Všechny DMP byly vyvinutou metodou potvrzeny (37).

Analýzu organických kyselin je v současné době také možné provádět pomocí komerčně dostupných kitů (42, 43). Jedním z nich je kit „ZIVAK Quantitative Organic Acid LC-MS/MS“, který umožňuje kvantitativní analýzu 73 organických kyselin v moči za 20 min (42).

3.2.2.2 Analýza acylkarnitinů

Hlavní úlohou karnitinu je transport mastných kyselin přes vnitřní mitochondriální membránu do matrix, kde dochází k jejich oxidaci (44). V případě organických acidurií a poruch β -oxidace nedochází k degradaci acyl-CoA v matrix. Na jeho eliminaci se proto podílí alternativní metabolické dráhy, jako je např. konjugace acyl-CoA s karnitinem (45, 46).

Stanovení acylkarnitinů včetně rozlišení jejich isomerů bylo ještě před pár lety pro analytiku velkou výzvou. V roce 2007 Maeda *et al.* vyvinuli novou RPLC-MS/MS metodu, která umožňuje rozlišit jednotlivé formy isomerů vybraných acylkarnitinů. Touto metodou byly poprvé přesně stanoveny dikarboxylové acylkarnitiny, jako je methylmalonylkarnitin a glutarylkarnitin (47).

O šest let později byla vyvinuta nová LC-MS/MS metoda bez derivatizace pro analýzu 112 acylkarnitinů v plasmě (48). V této studii Peng *et al.* vyvinutou metodu aplikovali na 176 vzorků plasem od pacientů suspektních pro DMP, přičemž u 49 z nich byla DMP diagnostikována a následně potvrzena genetickým či enzymovým testem.

V dalších letech byla na pracovišti Minkler *et al.* vyvinuta nová metoda s derivatizací pro analýzu 65 acylkarnitinů, která našla mimo jiné své uplatnění v klinickém výzkumu (49). Svou důležitost má v laboratořích taktéž přesné stanovení isomerů C5-karnitinů (isovaleryl-, 2-methylbutyryl-, pivaloyl-, valerylkarnitin) pomocí LC-MS/MS metody (50), která umožňuje rychle a efektivně rozlišit IVA od deficitu 2-methylbutyryl-CoA dehydrogenasy, známého též jako deficit acyl-CoA dehydrogenasy s krátkým/rozvětveným řetězcem (SBCADD, OMIM #610006), či interference způsobené antibiotickou léčbou pivmecilinamem (Pivinorm).

3.2.2.3 Analýza acylglycinů

Acylglyciny jsou sekundární metabolity, které vznikají například při β -oxidaci mastných kyselin. Jejich syntéza probíhá v játrech procesem konjugace toxického acyl-CoA s glycinem (45, 46). Zvýšená koncentrace acyl-CoA vede k vyšší produkci specifických acylglycinů, které jsou vylučovány močí. Analýza acylglycinů pomocí GC-MS je však obtížná vzhledem k nízké analytické senzitivitě.

Acylglyciny jsou důležitou skupinou metabolitů, které přispívají ke správné diagnostice organických acidurií. Z tohoto důvodu bylo cílem vyvinout dostatečně citlivou a selektivní metodu pro jejich detekci. To se povedlo v roce 2010 týmu Lewis-Stanislause (51), kteří představili novou RPLC-MS/MS metodu pro analýzu acylglycinů v moči bez derivatizace. Vyvinutá metoda byla následně aplikována na vzorky zdravých jedinců, u nichž bylo detekováno a identifikováno pomocí standardů 18 různých acylglycinů. Dalších 47 acylglycinů bylo identifikováno pouze na základě fragmentačního a retenčního chování.

V dalších letech byly popsány nové metody využívající metodiku LC-MS/MS s derivatizací, což přispělo ke zlepšení citlivosti a účinnosti separace (52, 53, 54). V roce 2012 Fong *et al.* vyvinuli RPLC-MS/MS metodu pro kvantifikaci 9 acylglycinů v moči (52), jež byly před analýzou extrahovány na pevné fázi a derivatizovány *n*-butanolem. V rámci této studie byl popsán vybraný profil acylglycinů u pacienta s deficitem holokarboxylasy (OMIM #253270) a deficitem β -ketothiolasy (3-KTD, OMIM #203750) a bylo analyzováno 204 vzorků močí zdravých jedinců pro stanovení referenčních mezí. Derivatizace *n*-butanolem byla rovněž popsána u LC-MS/MS metody pro kvantifikaci 15 acylglycinů v suchých krevních skvrnách (z angl. *Dried Blood Spots*, DBS) zdravých jedinců a pacientů s DMP (53).

3.3 Kapalinová chromatografie (LC)

Kapalinová chromatografie (z angl. *Liquid Chromatography*, LC) je jednou z nejrozšířenějších a nejuniverzálnějších analytických technik ve výzkumných a rutinních laboratořích. Nejčastěji se vyskytuje v uspořádání HPLC (55), avšak pro lepší účinnost, vysoké rozlišení a citlivost se mnohdy využívá modernější technika, a to ultra-vysokoúčinná kapalinová chromatografie (z angl. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC). Ta pracuje při vyšších tlacích (15 000 psi) než HPLC (max. 6000 psi) za použití kolon s menší velikostí částic. Výhodou UHPLC vůči HPLC je také nižší průtok a tím menší spotřeba rozpouštědel (nižší finanční náklady) a kratší doba analýzy (56, 57).

Princip této techniky spočívá v separaci látek ve směsi na základě jejich rozdílné distribuce mezi dvěma různými nemísitelnými fázemi. Mobilní (pohyblivou) fází tvoří kapalina, přičemž stacionární (nepohyblivá) fáze je tuhá látka nebo kapalina na pevném nosiči, která je ve formě sorbentu (tzv. chromatografické lože) ukotvena v chromatografické koloně. Vzorek je po nastříknutí do systému LC unášen spolu s mobilní fází na kolonu, kde dochází k interakci jednotlivých složek vzorku se stacionární fází. Látky, které jsou stacionární fází zadržovány více, jsou eluovány později než látky méně interagující (58).

K separaci látek dochází pomocí tzv. fázového rozhraní, jehož podstatou je opakované ustalování rovnováhy dělených látek mezi fázemi. Distribuci složky mezi

dvěma fázemi lze popsat distribuční konstantou K_D , což označuje poměr rovnovážné koncentrace analytu ve stacionární a mobilní fázi (59).

Při optimalizaci HPLC podmínek hraje klíčovou roli eluční síla mobilní fáze, protože pouze při jejíž správném nastavení je možné dosáhnout požadované separace látek ve vzorku. V případě, že je po celou dobu separace použito konstantní složení rozpouštědel, jedná se o isokratickou eluci. Tento přístup může být využit pro separaci látek s podobnými distribučními konstantami (podobné fyzikálně-chemické vlastnosti). Po takových analýzách je však nezbytné kolonu pravidelně promývat rozpouštědlem o vyšší eluční síle, aby byly vymyty látky, které se v koloně hromadí. Jelikož je isokratická eluce pro separaci látek s výrazně odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi časově náročná, je vhodné v těchto případech využít gradientové eluce, při které se složení rozpouštědel během analýzy programově mění ve prospěch silnější eluční složky. Gradientová eluce ve srovnání s isokratickou elucí poskytuje ostřejší eluční křivky (tzv. píky) na chromatogramu (59, 60).

Chromatografické systémy se dělí dle principu retence látek na koloně na systémy s reverzní fází (z angl. *Reversed-Phase Liquid Chromatography*, RP-HPLC), které tvoří až 90 % HPLC separací, systémy s normální fází (z angl. *Normal-Phase Liquid Chromatography*, NP-HPLC) a jejich modifikace (61). Mechanismus RP-HPLC využívá nepolární stacionární fázi a polární mobilní fázi. Nejběžnější stacionární fází je kolona s oktadecylovou vazbou (C18) či oktylsilanem (C8) (62). Obecně jsou však k dispozici hydrofobní fáze s alkylovou vazbou C1-C30 (63). Současný trh nabízí více než 600 kolon založených na RP, jejichž variabilita může být ovlivněna čistotou média použitého při výrobě fáze či způsobem balení kolon (64, 65). Mobilní fáze obsahuje vodu (příp. pufr) a s vodou mísitelný organický modifikátor (methanol, acetonitril). RP-HPLC se využívá zejména pro separaci středně polárních a nepolárních látek. V tomto režimu jsou eluovány polárnější látky dříve než hydrofobní (61, 66).

Naopak tomu je při uspořádání NP-HPLC, které pracuje s polární stacionární fází (např. silikagel) a nepolární mobilní fází (např. hexan). Separace NP-HPLC se využívá zřídka, avšak své zastoupení stále má např. u analytů, které jsou limitovány svou rozpustností v rozpouštědlech používaných v RP-HPLC (59).

Silně hydrofilní sloučeniny, které nelze analyzovat v systému NP-HPLC a RP-HPLC kvůli jejich ireverzibilní adsorpci a nedostatečné rozpustnosti v nepolárních nebo slabě

polárních mobilních fázích, je možné analyzovat v systému hydrofilní interakční chromatografie (z angl. *Hydrophilic Interaction Chromatography*, HILIC) (67). Tento alternativní způsob chromatografie využívá polární stacionární fázi, stejně jako NP-HPLC, avšak mobilní fáze je podobná těm, které se využívají v režimu RP-HPLC. Typická mobilní fáze tedy obsahuje polární organická rozpouštědla mísitelná s vodou, jako je acetonitril s malým množstvím vody. Přidaný podíl vodné složky v mobilní fázi utváří na povrchu stacionární fáze hydratovanou vrstvu („water-rich layer“), která umožňuje lepší separaci látek (68).

3.4 Hmotnostní spektrometrie (MS)

Hmotnostní spektrometrie (z angl. *Mass Spectrometry*, MS) je jednou z nejvhodnějších technik jak pro kvalitativní (struktura), tak kvantitativní (koncentrace) analýzu molekul. Svou velkou úlohu plní v oblasti identifikace nových látek (69). Přestože byla MS vyvinuta před více než 100 lety, stále se vyvíjí, a to jak s ohledem na její přednosti (např. citlivost), tak na její využití v různých oblastech vědy a techniky. Její princip spočívá v interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu. V současné době je na trhu dostupných několik různých technických provedení MS, pro které jsou však společné 3 základní elementy - iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor (70).

MS analýza vzorku je podmíněna jeho ionizací. Jedná se o proces odehrávající se v iontovém zdroji, při kterém molekuly přecházejí do plynného skupenství za zisku kladného či záporného náboje. Univerzální ionizační technika pro všechny látky neexistuje, proto je vždy třeba vybrat optimální způsob ionizace s ohledem na charakteristiku zkoumaných látek. Při spojení LC-MS má největší praktický význam elektrosprejová ionizace (z angl. *Electrospray Ionisation*, ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku a fotoionizace za atmosférického tlaku (71, 72). Jednou z nejužívanějších technik je ESI, která uplatňuje elektrickou energii pro přenos iontů z roztoku do plynné fáze. Při tomto typu ionizace nejdříve dochází k rozptýlení kapaliny se zkoumanými analyty do podoby aerosolu. V další fázi se prudce odpařuje rozpouštědlo, což vede ke zvýšení hustoty povrchového náboje a zmenšení poloměru kapek rozpouštědla. Optimálním rozpouštědlem pro ESI je z tohoto důvodu voda s těkavou organickou sloučeninou (např. methanol nebo acetonitril). V poslední fázi

ionizace dochází k tzv. Coulombické explozi, což je proces, kdy intenzita elektrického pole uvnitř nabitě kapky nabere takové síly, že jsou ionty na povrchu kapek uvolněny do plynné fáze. Emitované ionty přecházejí z atmosférického tlaku do vysokého vakua hmotnostního analyzátoru, kde jsou separovány podle poměru hmotnosti k náboji (m/z) (73, 74, 75).

Výběr analyzátoru závisí na vlastnostech analytu po ionizaci a na požadavcích prováděného experimentu (76). Rozlišujeme analyzátory skenující (např. kvadrupól), průletové (např. analyzátor doby letu) a zachycující ionty v cele či pasti (např. iontová past, Orbitrap). Každý z těchto hmotnostních analyzátorů lze používat samostatně nebo v kombinaci (z angl. *Tandem Mass Spectrometry, MS/MS*) (77, 78). Velmi rozšířený je v současnosti kvadrupólový analyzátor, který funguje na principu pohybu iontu po stabilní trajektorii v oscilujícím elektrickém poli. Skládá se ze čtyř tyčových elektrod v rovnoběžném uspořádání, přičemž protilehlé tyče nesou shodný náboj. Na elektrody je přiváděno střídavé a stejnosměrné napětí, které zodpovídá za pohyb iontů s vybranou hodnotou m/z po stabilní trajektorii na detektor. Předností kvadrupólového analyzátoru je nízká pořizovací cena, vysoká skenovací rychlost a mechanická jednoduchost, nevýhodou pak nízké rozlišení. V tandemovém uspořádání (trojitý kvadrupól, viz kapitola 3.5) vykazuje vysokou citlivost.

Ionty vycházející z analyzátoru jsou buď s ohledem či bez ohledu na jejich velikost m/z v podobě signálů zaznamenávány detektorem, který je transformuje do digitálního formátu (70, 79).

3.5 Kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS)

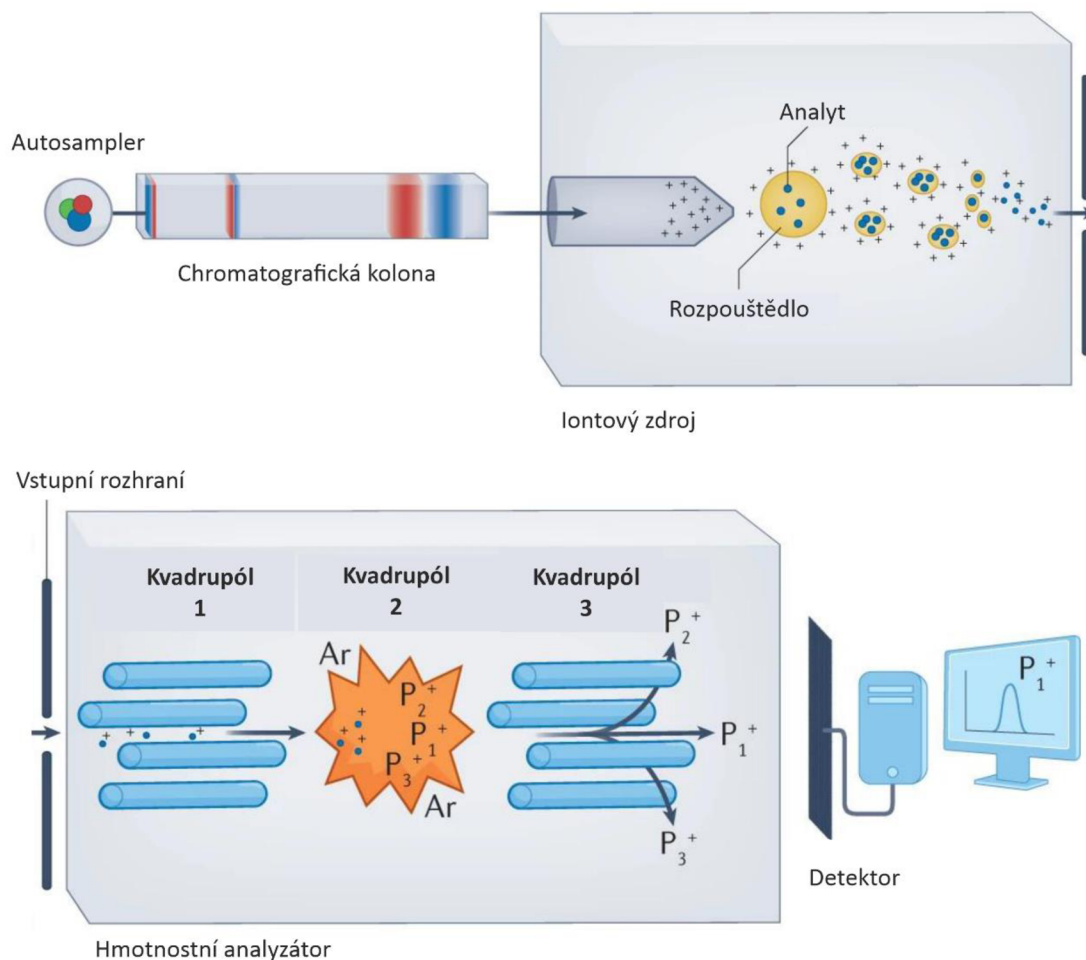
Chromatografické techniky ve spojení s MS nabízí vysokou citlivost a specifitu ve srovnání s jinými typy analyzátorů. Od roku 1970 je na trhu dostupná technika GC-MS, která se v průběhu let stala nepostradatelnou v mnoha laboratořích klinické biochemie v rámci analýzy komplexních směsí (80). Spojení LC-MS se celosvětově rozšířilo s rozvojem ESI v 80. letech, která umožnila efektivně využít sílu a eleganci MS pro analýzu biologických molekul (81).

LC-MS/MS je výkonná analytická technika, která kombinuje separační schopnost LC s vysoce citlivou a selektivní schopností MS/MS. Každé analýze předchází preanalytická fáze, která zahrnuje odběr vzorku pacienta, skladování a transport vzorku z místa odběru do laboratoře a přípravu vzorku před analýzou. Dodržení správného postupu v preanalytické fázi je stěžejní pro poskytnutí správných a spolehlivých výsledků (82).

Příprava vzorku může představovat jeho naředění nebo purifikaci, aby byly odstraněny interferující složky ve směsi. Poté je vzorek pomocí autosampleru nastříknut do systému LC, kde je unášen mobilní fází na chromatografickou kolonu. Na základě rozdílné distribuce mezi těmito dvěma fázemi dochází k separaci látek ve směsi. Chromatografický eluát, který unáší analyt, je zaveden do iontového zdroje hmotnostního spektrometru, kde jsou vytvářeny ionty v plynné fázi (83).

Vzniklé ionty vstupují do hmotnostního analyzátoru, který v současné době představuje spíše jejich kombinaci, tedy MS/MS. Mezi nejrozšířenější techniky se řadí trojitý kvadrupól (QqQ), kvadrupól s iontovou pastí a analyzátor doby letu. V kombinaci tří kvadrupólů dochází v prvním kvadrupólu (Q1, první hmotnostní analyzátor) k filtraci přicházejících iontů a následné izolaci prekurzorových iontů, které směřují ke kolizní cele (q2). V té jsou prekurzorové ionty fragmentovány na produktové ionty v důsledku kolize iontů s atomy kolizního plynu (dusík, argon). Jedná se o tzv. kolizně indukovanou disociaci. Analýza specifických produktových iontů probíhá ve třetím kvadrupólu (Q3, druhý hmotnostní analyzátor). Detektor zpracovává data z analýzy, přičemž výsledkem je hmotnostní spektrum, které zobrazuje relativní četnost signálů iontů dle m/z (83, 84). Uspořádání výše popsaného LC-MS/MS systému za využití ESI je znázorněno na Obr. 4.

Trojité kvadrupól může pracovat ve 4 režimech skenování, přičemž pro kvantitativní analýzu se využívá zejména režim selektivního monitorování reakce (z angl. *Selected Reaction Monitoring*, SRM) vzhledem k vysoké citlivosti a selektivitě módu. V rámci jedné SRM analýzy je možné změřit až stovky analytů (z angl. *Multiple Reaction Monitoring*, MRM). V tomto režimu je v Q1 vybrán prekurzorový ion, který je v kolizní cele (q2) fragmentován za podmínek optimální kolizní energie (z angl. *Collision Energy*, CE) na specifický fragment (produktový ion), jenž je vybrán pomocí Q3. Parametr definovaný hodnotou m/z prekurzorového a produktového iontu se nazývá hmotnostní přechod (70).



Obr. 4: Schéma systému kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací (LC-ESI-MS/MS). Převzato a upraveno podle Thomas et al. (83).

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Stanovení široké škály metabolitů v moči pomocí nové LC-MS/MS metody pro diagnostiku dědičných metabolických poruch

Za vývojem nové HILIC-MS/MS metody pro analýzu širokého spektra metabolitů diagnosticky významných pro DMP stály mnohé zkušenosti Laboratoře dědičných metabolických poruch (LDMP), Oddělení klinické biochemie (OKB) Fakultní nemocnice (FN) Olomouc s metabolomickou analýzou (85–88). Odborná publikace s názvem „Wide metabolite coverage LC-MS/MS assay for the diagnosis of inherited metabolic disorders in urine“ byla publikována v roce 2024 v časopise *Talanta* (89).

4.1.1 Materiál a metody

4.1.1.1 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy Kern ABT 120-5 DM (Kern, Německo)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Třepačka MS 3 basic (IKA, Německo)
- Ultrazvuková lázeň Elmasonic S 100 H (Elma, Německo)
- pH metr Orion Star A111 (Thermo Fisher Scientific, USA)
- LC-MS/MS: Kapalinový chromatograf UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem Triple Quad 6500 (Sciex, Framingham, MA, USA)
- Kolona Luna NH₂ 3 μm, 100 × 2 mm (Phenomenex, Torrance, USA)

4.1.1.2 Chemikálie

Standardy látek minimálně analytické čistoty byly zakoupeny u obchodních společností Sigma-Aldrich, ICN Biochemicals, Toronto Research Chemicals, Santa Cruz Biotechnology, Calbiochem, Cambridge Isotope Laboratories a CDN Isotopes. Většina standardů acylglycinů byla obdržena od VU Medical Center (Amsterdam, Nizozemsko) a SAICAr byl získán od Dr. Marie Zikánové (Univerzita Karlova, Praha, Česká republika).

Rozpouštědla (voda, acetonitril) vhodná pro LC-MS analýzu byla dodána společností Honeywell Riedel-de Haën (Seelze, Německo). Močový diluent Sigmatrix (MDS), stejně jako kyselina octová, hydroxid amonný a dimethylsulfoxid (DMSO) byly obdrženy od Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). Hydroxid sodný byl získán od CentralChem (Bratislava, Slovensko).

4.1.1.3 Biologický materiál

Pro tuto studii byly použity vzorky moči zdravých kontrol ($n = 140$), pacientů ($n = 22$) a externího hodnocení kvality (EHK) programu ERNDIM kontrolního schématu diagnostického testování způsobilosti (z angl. *Diagnostic Proficiency Testing*, DPT, $n = 25$). Pro analytickou validaci byl připraven směsný vzorek moči od zdravých kontrol ($n = 38$). Všechny vzorky zdravých jedinců byly získány z LDMP, OKB FN Olomouc. Jako zdravé kontroly byly použity vzorky, u kterých nebyla prokázána žádná z testovaných DMP. Základní klinické informace zdravých kontrol a pacientů jsou shrnuty v Tab. 1. Detailní charakteristika vzorků pacientů s DMP (včetně jejich původu) je sumarizována v Příloze 1.

Dvě koncentrační úrovně kalibračního standardu purinů a pyrimidinů (z angl. *Purines and Pyrimidines in Urine*, PP-Cal) a kalibračního standardu pro speciální vyšetření (z angl. *Special Assays in Urine*, SA-Cal) byly obdrženy od ERNDIM (MCA Laboratory, BN Winterswijk, Nizozemsko).

Tab. 1: Základní klinické informace zdravých kontrol a pacientů.

Vzorky	<i>n</i>	Muži	Ženy	Věk	Medián věku
Směsný vzorek moči	38	19 (50,0 %)	19 (50,0 %)	0–48 let	1 rok
Kontroly <1 rok	39	18 (46,2 %)	21 (53,8 %)	0–11 měsíců	6 měsíců
Kontroly >1 rok	101	61 (60,4 %)	40 (39,6 %)	1–43 let	6 let
Pacienti <1 rok	9	2 (22,2 %)	7 (77,8 %)	0–11 měsíců	4 měsíce
Pacienti >1 rok	38	22 (57,9 %)	16 (42,1 %)	2–78 let	12 let

4.1.1.4 Příprava zásobních roztoků standardů

Zásobní roztoky standardů byly připraveny o koncentracích 1–52 mmol/l v různých rozpouštědlech (voda, roztok hydroxidu amonného, roztok hydroxidu sodného, 25% DMSO) podle jejich rozpustnosti. Roztoky byly uchovávány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.1.5 Příprava směsi interních standardů

Směs interních standardů (IS) byla připravena smícháním 10 zásobních roztoků isotopicky značených IS podle Tab. 2. Vzniklá směs byla doplněna na konečný objem 50 ml octanem amonným (20 mmol/l, pH 9,75) a poté byla rozdělena na alikvoty, které byly skladovány při -20 °C.

Tab. 2: Příprava směsi interních standardů a jejich koncentrace v objemu 50 ml.

Interní standard (IS)	Objem zásobního roztoku ve směsi (μl)	Koncentrace IS ve směsi (μmol/l)
Adenosin- ¹³ C ₅	133	10
Kreatin-D ₃	364	47
Kreatinin-D ₃	180	187
Galaktitol- ¹³ C ₆	376	100
Kyselina guanidinoctová-D ₂	292	50
N-Hexanoylglycin- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	25	5
Kyselina orotová- ¹⁵ N ₂	80	10
Kyselina sialová- ¹³ C ₃	366	24
Uracil- ¹⁵ N ₂	58	10
Xanthin- ¹⁵ N ₂	77	10

4.1.1.6 Příprava standardů kalibrační křivky

Desetibodové kalibrační řady ($n = 3$) byly připraveny binárním ředěním pracovního roztoku o známém množství analytů (30 μl) v MDS nebo octanu amonném (20 mmol/l, pH 9,75) (30 μl) a přidavkem směsi IS (10 μl) podle Přílohy 2.

4.1.1.7 Příprava vzorků kontroly kvality

Vnitrodenní ($n = 5$) a mezidenní ($n = 15$) správnost a přesnost byly stanoveny pomocí vzorků kontroly kvality (QC) o nízké, střední a vysoké koncentrační hladině (tj. LQC, MQC a HQC) podle Přílohy 2. Směsný vzorek moče zdravých kontrol (30 μl, kapitola 4.1.1.9) byl ve vialce smíchán s 30 μl pracovního roztoku se známým množstvím analytů a 10 μl směsi IS.

4.1.1.8 Příprava vzorku vnitřní kontroly kvality

Vzorek vnitřní kontroly kvality byl připraven smícháním stejných objemů 4 vzorků z kontrolního schématu „*Purines and Pyrimidines in Urine*“ 2021 a 4 vzorků ze schématu „*Special Assays in Urine*“ 2021.

4.1.1.9 Příprava směsného vzorku moče zdravých kontrol

Směsný vzorek moče zdravých kontrol byl připraven z 38 močí, které byly naředěny na koncentraci kreatininu 2 mmol/l a poté byly stejné objemy vzorků smíchány. Vzorky s koncentrací kreatininu <2 mmol/l byly použity bez ředění. Alikvoty směsného vzorku moče byly uchovávány při -20 °C.

4.1.1.10 Příprava vzorků močí zdravých kontrol, pacientů a externího hodnocení kvality

Vzorky močí zdravých kontrol, pacientů a EHK programu ERNDIM DPT byly v laboratoři průběžně uchovávány při -80 °C. Před LC-MS/MS analýzou byly vzorky po rozmražení naředěny na koncentraci kreatininu 1 mmol/l. Do vialky bylo následně pipetováno 25 µl naředěné moče a 25 µl směsi IS. Moč s koncentrací kreatininu <1 mmol/l byla analyzována bez ředění.

4.1.1.11 Vývoj LC-MS/MS metody

Nově vyvinutá HILIC-MS/MS metoda byla převzata od Bajad *et al.* (90) a optimalizována podle Yuan *et al.* (91) a dalších (92, 93). Metoda byla průběžně rozšiřována o nové analyty s cílem pokrýt biomarkery co nejširšího spektra DMP.

Automatická optimalizace MS/MS podmínek byla provedena u všech analytů. Ze zásobních roztoků standardů byly připraveny roztoky o koncentraci 10–100 µmol/l, které byly ředěny mobilními fázemi A a B (1:1, v/v). Roztoky standardů byly postupně pomocí přímé infúze zavedeny do hmotnostního spektrometru, kde byla u získaných hmotnostních přechodů provedena optimalizace deklasteračního potenciálu (z angl. *Declustering Potential*, DP), vstupního potenciálu (z angl. *Entrance Potential*, EP), CE a výstupního potenciálu (z angl. *Collision Cell Exit Potential*, CXP). Do finální metody byl

pro každý analyt vybrán pouze jeden hmotnostní přechod s nejvyšším poměrem signálu k šumu (z angl. *Signal to Noise, S/N*), kde zároveň nebyly pozorovány žádné interference.

4.1.1.12 LC-MS/MS analýza

LC-MS/MS analýza byla provedena pomocí kapalinového chromatografu UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) a hmotnostního spektrometru Triple Quad 6500 (Sciex, Framingham, MA, USA). Pro separaci na principu HILIC byla použita kolona Luna NH₂ (3 μm, 100 × 2 mm, Phenomenex, Torrance, USA). Mobilní fáze A obsahovala octan amonný (20 mmol/l, pH = 9,75) a mobilní fáze B 100% acetonitril. Byla nastavena gradientová eluce při průtoku 0,4 ml/min: t = 0 min 95 % B, t = 6 min 30 % B, t = 7 min 30 % B, t = 7,5 min 95 % B, t = 11,5 min 95 % B. Kolona byla temperována na 30 °C, nástřík byl nastaven na 0,5 μl a autosampler byl udržován při teplotě 10 °C.

Za využití ESI byly analyty měřeny v režimu MRM současně v pozitivním a negativním módu pomocí přepínání polarit („polarity switching“). Parametry iontového zdroje byly nastaveny následovně: napětí na sprejovací kapiláře ± 4500 V, teplota 400 °C, tlak clonícího plynu 35 arb, tlak kolizního plynu (dusík) 6 arb a tlaky obou zmlžujících plynů 40 arb.

4.1.1.13 Validace metody

Vyvinutá LC-MS/MS metoda byla validována podle pokynů pro validaci bioanalytických metod, kterou vydala Evropská agentura pro léčivé přípravky (z angl. *European Medicines Agency, EMA*) (94).

4.1.1.13.1 Linearita

Kalibrační rozsah byl stanoven podle fyziologických koncentrací analytů v moči, k čemuž byly využity volně dostupné databáze (95, 96). Kalibrační křivka, která zahrnovala blank, nulový kalibrátor (blank se směsí IS) a deset kalibračních bodů, byla analyzována ve třech nezávislých opakováních. Počet kalibračních bodů pro každý analyt byl stanoven podle dosažené linearity, nejméně však bylo definováno šest kalibračních bodů (dle pokynů EMA).

Linearita jednotlivých analytů byla vyhodnocena pomocí regresních křivek a vyjádřena koeficientem determinace (R^2). Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) byly vyhodnoceny podle následujících rovnic (1) a (2):

$$LOD = 3 \times \frac{c}{S/N} \quad (1),$$

kde c je koncentrace analytu v kalibračním standardu a S/N je poměr signálu k šumu,

$$LOQ = 3,33 \times LOD \quad (2).$$

4.1.1.13.2 Správnost a přesnost

Vnitrodenní ($n = 5$) a mezidenní ($n = 15$) správnost a přesnost byly stanoveny analýzou QC vzorků na třech koncentračních hladinách (LQC, MQC a HQC) v pentaplikátech ve třech nezávislých opakováních. V každé sérii byla současně s QC vzorky analyzována sada kalibračních standardů. Nominální koncentrace QC vzorků byly nastaveny tak, aby LQC odpovídalo 5 %, MQC 25 % a HQC 75 % hodnoty nejvyššího kalibračního standardu (ULOQ). Akceptační kritérium pro správnost bylo dle pokynů EMA nastaveno na 85–115 % (s výjimkou LQC, pro které je povoleno 80–120 %). Pro přesnost byla akceptačním kritériem hodnota variačního koeficientu (CV) ≤ 15 % (LQC ≤ 20 %).

4.1.1.13.3 Matricové efekty

Matricové efekty byly stanoveny pomocí postkolonové infúze adenosinu- $^{13}C_5$ (-/+ MRM mód). Pro tento experiment bylo připraveno 10 vzorků močí zdravých kontrol, které byly naředěny na koncentraci kreatininu 1 mmol/l. Spolu s těmito vzorky byl analyzován taktéž blank (voda), a to pomocí kontinuálního přídavku adenosinu- $^{13}C_5$ ($c = 2 \mu\text{mol/l}$) injekční pumpou s průtokem 7 $\mu\text{l/min}$. Porovnáním celkových iontových chromatogramů vzorků močí s blankem byly identifikovány oblasti s potlačením („iontová suprese“) či zvýšením („iontový enhancement“) ionizace.

4.1.1.13.4 Carry-over (Přenos vzorku)

Pro stanovení carry-over efektů byl analyzován vzorek blanku (voda) po vzorku ULOQ. Carry-over (%) byl hodnocen jako poměr plochy analytu v blanku k ploše analytu

v ULOQ. Carry-over byl považován za nevýznamný, pokud byla interference pozorovaná v blanku <5 % ULOQ.

4.1.1.14 Diagnostika pacientů

Diagnostický pracovní postup zahrnoval sestrojení multikomponentního krabicového grafu s robustně standardizovanými (RS) hodnotami analytů (97, 98) a vytvoření sítě DMP s odpovídajícími biomarkery, které jsou označeny různě velkými a barevnými uzly v závislosti na RS hodnotě.

Pro výpočet RS hodnot byly použity koncentrace analytů podle následující rovnice (3):

$$X' = (c_i - \bar{c}) / (Q_3 - Q_1) \quad (3),$$

kde X' je robustně standardizovaná hodnota, c_i je hodnota i -tého pozorování, \bar{c} je medián koncentrace zdravé kontrolní populace a $Q_3 - Q_1$ je interkvartilové rozpětí zdravé kontrolní populace.

Kontrolní populace byla rozdělena do dvou skupin dle věku (<1 rok a >1 rok). Referenční rozmezí RS hodnot jednotlivých analytů byla stanovena zvlášť pro tyto věkové kategorie na základě analýzy 39 vzorků (<1 rok) a 101 vzorků (>1 rok). S ohledem na věk byly poté automaticky vypočteny RS hodnoty jednotlivých analytů u pacientů s DMP. Získané RS hodnoty zdravých kontrol a pacientů byly vizualizovány pomocí multikomponentních krabicových grafů v softwaru GraphPad Prism.

Tvorba metabolické sítě zahrnovala import RS hodnot příslušného pacienta do softwaru Cytoscape. Síť spojuje DMP, které jsou rozděleny do samostatných skupin podle zasaženého metabolismu (puriny a pyrimidiny, aminokyseliny, mastné kyseliny, sacharidy, atd.). Další větve jsou příslušné DMP, označené zkratkou podle nomenklatury OMIM nebo plným názvem (99). Koncové uzly představují příslušné diagnostické biomarkery (95, 96, 100) jednotlivých DMP. V závislosti na RS hodnotě mění koncové uzly a jejich popisky barvu a velikost.

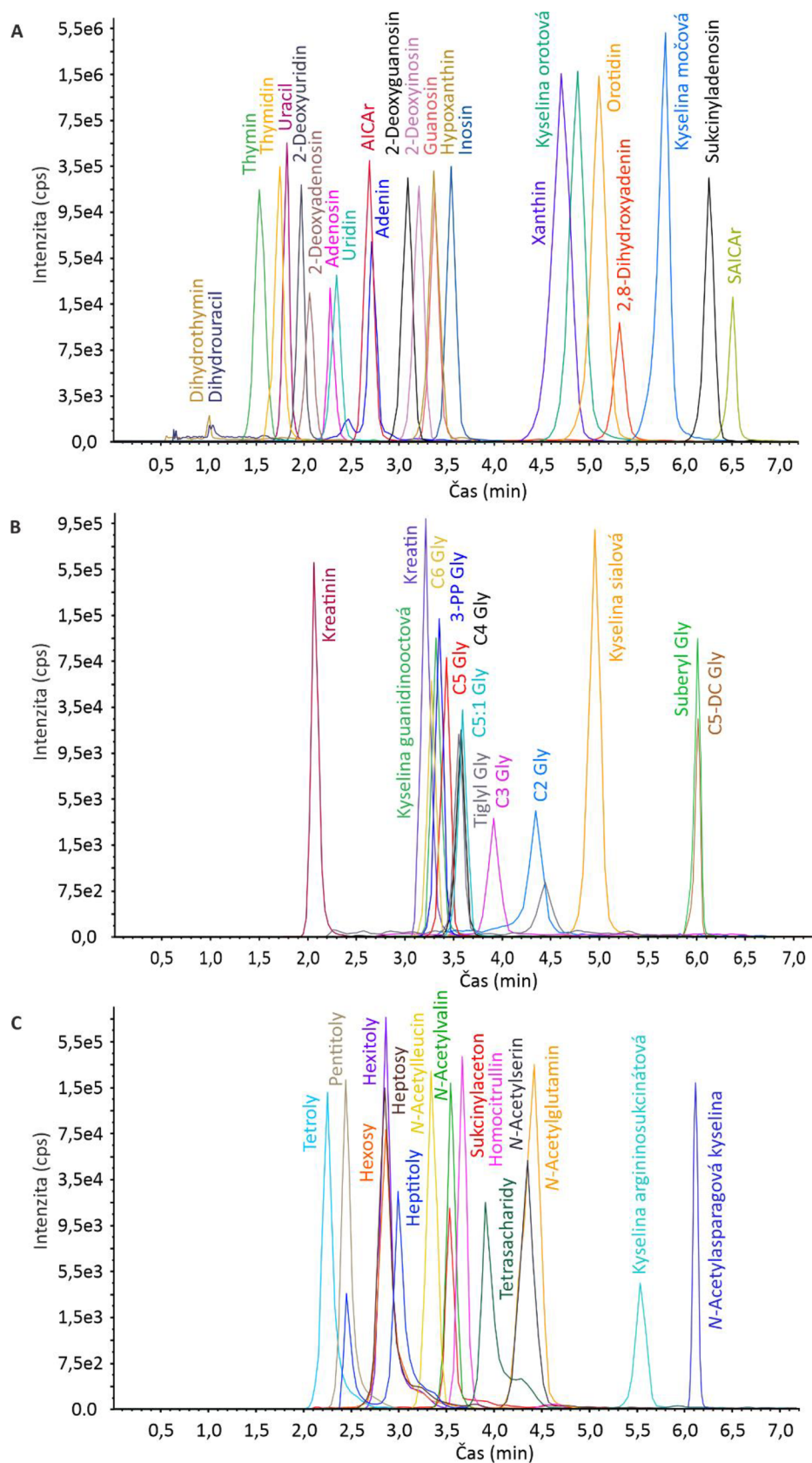
4.1.1.15 Analýza dat

Sběr MS dat byl prováděn pomocí softwaru Analyst 1.6.2, zatímco pro zpracování dat byl použit software SciexOS 2.0 (Sciex, Framingham, MA, USA). Koncentrace analytů byly vypočteny pomocí kalibračních standardů PP-Cal a SA-Cal. Analyty, které nebyly přítomny v těchto komerčně dostupných standardech, byly kalkulovány na „in-house“ kalibrační standard. Spolehlivost kvantifikace byla zajištěna použitím 10 IS. Nejvhodnější IS k příslušnému analytu byl vybrán především na základě podobnosti chemické struktury a retenčního času. Získané koncentrace byly transformovány na RS hodnoty v programu Microsoft Excel 365 (Redmond, Washington, USA). Transformovaná data byla importována do programů GraphPad Prism 9.3.1 (San Diego, CA, USA) a Cytoscape 3.8.2 (Bethesda, MD, USA) (101) pro grafické znázornění pacientů s DMP.

4.1.2 Výsledky

4.1.2.1 Vývoj LC-MS/MS metody

Vyvinutá metoda umožňuje analýzu 75 analytů ze skupiny purinů a pyrimidinů ($n = 23$), aminokyselin ($n = 8$), acylglycinů ($n = 13$), cukrů a cukerných alkoholů ($n = 17$), kyseliny guanidinoctové, kyseliny sialové, kreatinu, kreatininu a 10 IS. Většina analytů je detekována v negativním ionizačním režimu, a to právě z důvodu minimálních interferencí ve srovnání s pozitivním režimem. Přestože je absolutní signál v negativním režimu obvykle nižší, kvantitativní parametry jsou díky nižšímu šumu lepší. Optimalizované MS/MS parametry analytů a IS ve vyvinuté metodě jsou uvedeny v Příloze 3. Extrahované iontové chromatogramy (\pm MRM mód) standardů v MDS/octanu amonném (20 mmol/l, pH 9,75) při koncentraci odpovídající úrovni MQC jsou zobrazeny na Obr. 5.

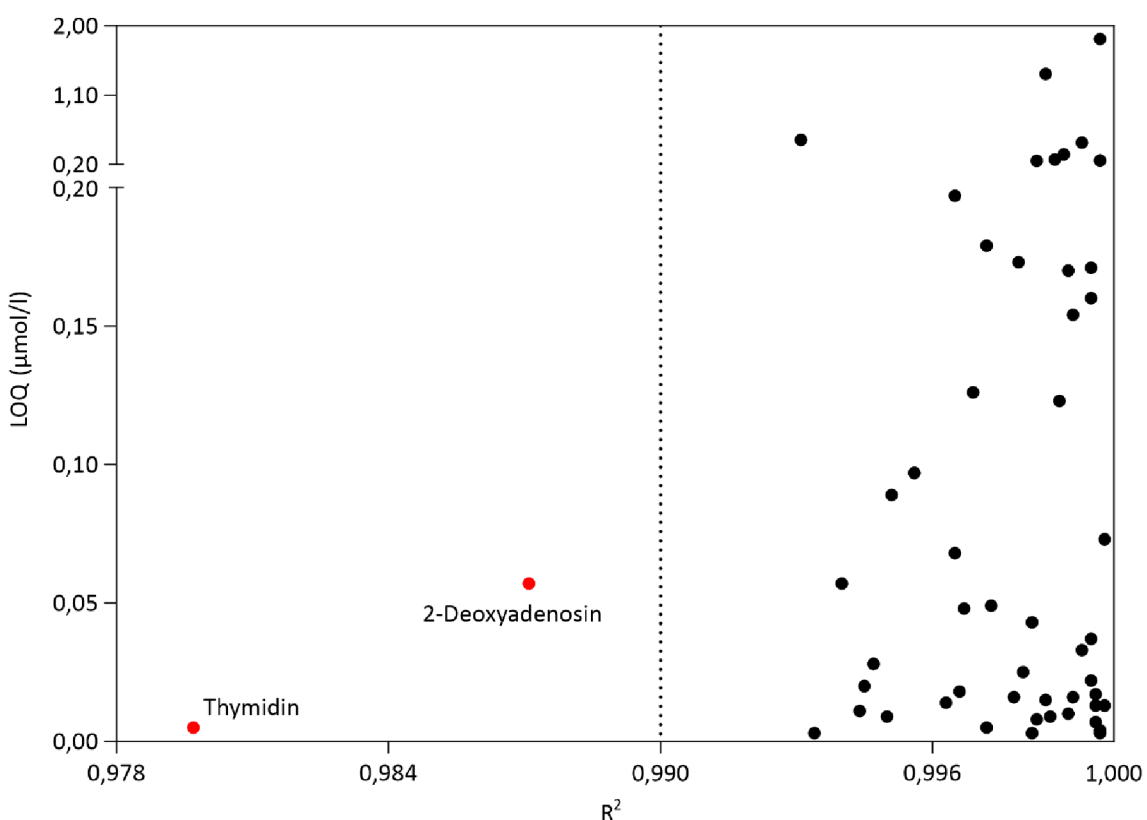


Obr. 5: Extrahované iontové chromatogramy standardů v močovém diluentu Sigmatrix (MDS)/octanu amonném (20 mmol/L, pH 9,75) při koncentraci odpovídající úrovni MQC. Profil purinů a pyrimidinů **(A)**, N-acylglycinů, kyseliny guanidinoctové, kreatinu, kreatininu a kyseliny sialové **(B)**, aminokyselin, cukrů a cukerných alkoholů **(C)**.

4.1.2.2 Validace metody

4.1.2.2.1 Linearita

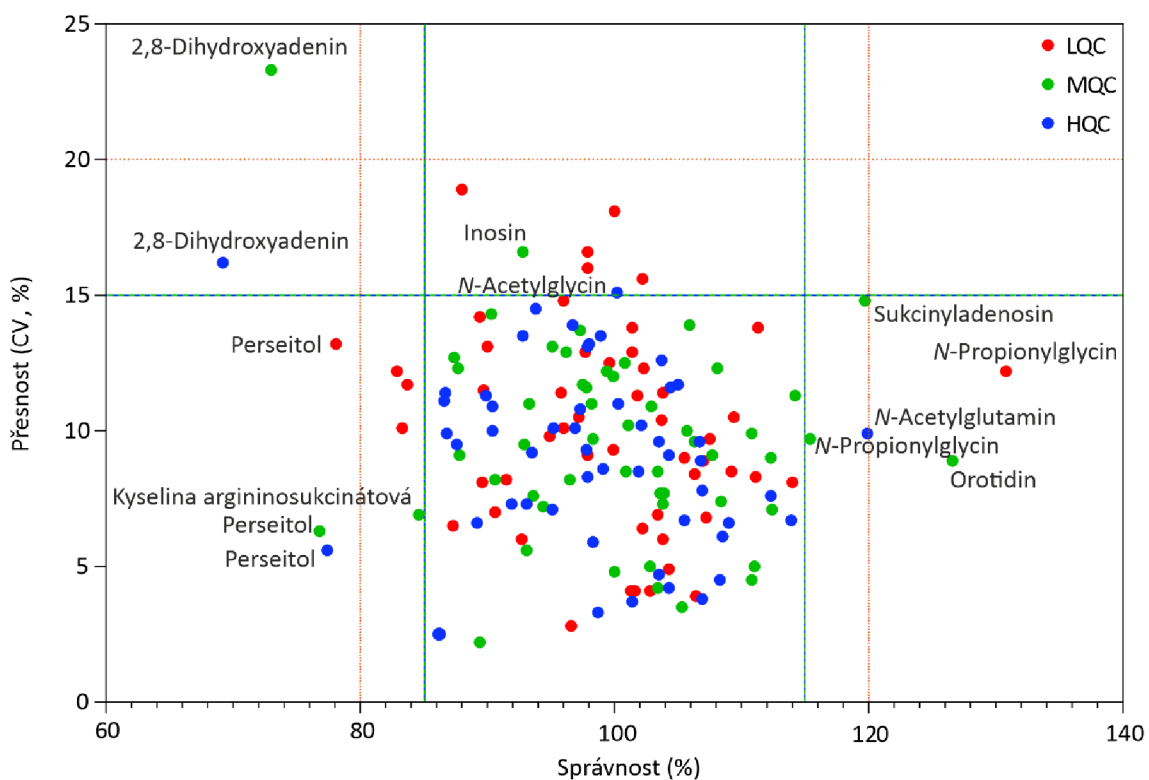
Kalibrační křivky analytů vykazovaly převážně kvadratickou závislost vzhledem k širokému koncentračnímu rozsahu, podobně jako uvádí Zheng *et al.* (102) ve své práci zaměřené na cílenou metabolomiku moči. Lineární závislosti dosáhly pouze adenosin, guanosin, SAICAr, uracil, xanthin, *N*-acetylvalin, sukcinylaceton, sedoheptulosa, kyselina guanidinoctová a kreatinin. Kalibrační křivky zahrnovaly nejméně šest kalibračních bodů pro každý analyt a byly vyhodnoceny pomocí vážení $1/y$. Proměnné a , b a c definující sklon a průsečík regresních rovnic jsou popsány v Příloze 4. Koeficienty determinace (R^2) byly $>0,9934$ s výjimkou 2-deoxyadenosinu ($R^2 = 0,9871$) a thymidinu ($R^2 = 0,9797$) (Obr. 6). Parametry kalibračních křivek, LOD a LOQ jsou shrnuty v Příloze 4.



Obr. 6: Mez stanovitelnosti (LOQ) a koeficient determinace (R^2) měřených analytů, kde přerušovaná čára znázorňuje akceptační kritérium ($R^2 >0,99$). Červeně zbarvené analyty, které nesplňují kritérium, jsou označeny názvem.

4.1.2.2.2 Správnost a přesnost

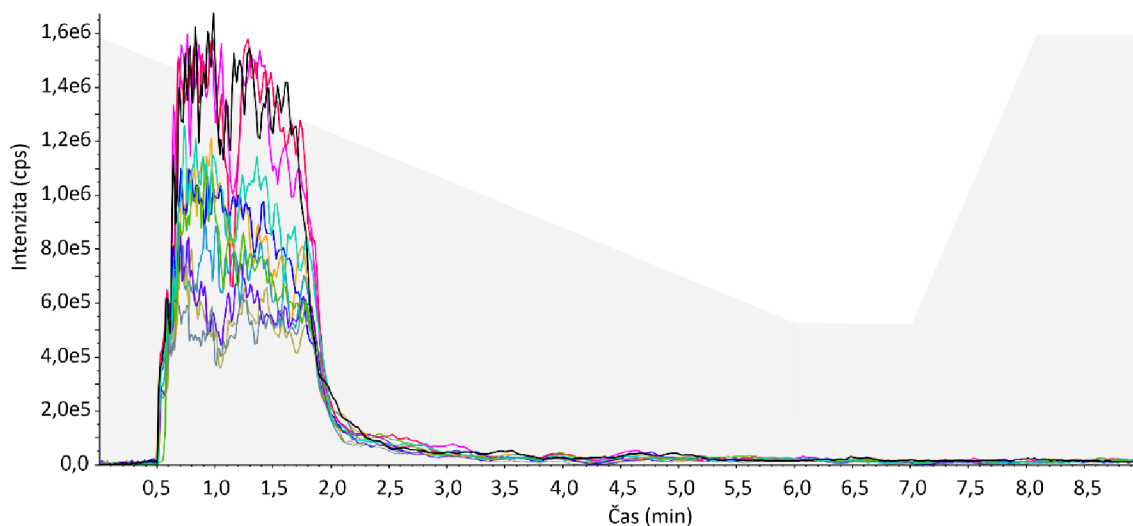
Vnitrodenní a mezidenní správnost (%) a přesnost (CV, %) QC vzorků jsou shrnuty v Příloze 5–6. Většina analytů splnila akceptační kritéria. Pouze mírné odchylky byly pozorovány v rámci mezidenní správnosti a přesnosti pro 2,8-dihydroxyadenin, inosin, *N*-acetylglycin, perseitol, kyselinu argininosukcinátovou, *S*-Ado, *N*-acetylglutamin, *N*-propionylglycin a orotidin, jak je znázorněno na Obr. 7. Mírné odchylky v rámci vnitrodenní správnosti a přesnosti byly pozorovány u 2,8-dihydroxyadeninu, orotidinu, *S*-Ado, *N*-acetylasparagové kyseliny, *N*-acetylglutaminu, kyseliny argininosukcinátové, *N*-propionylglycinu a perseitolu.



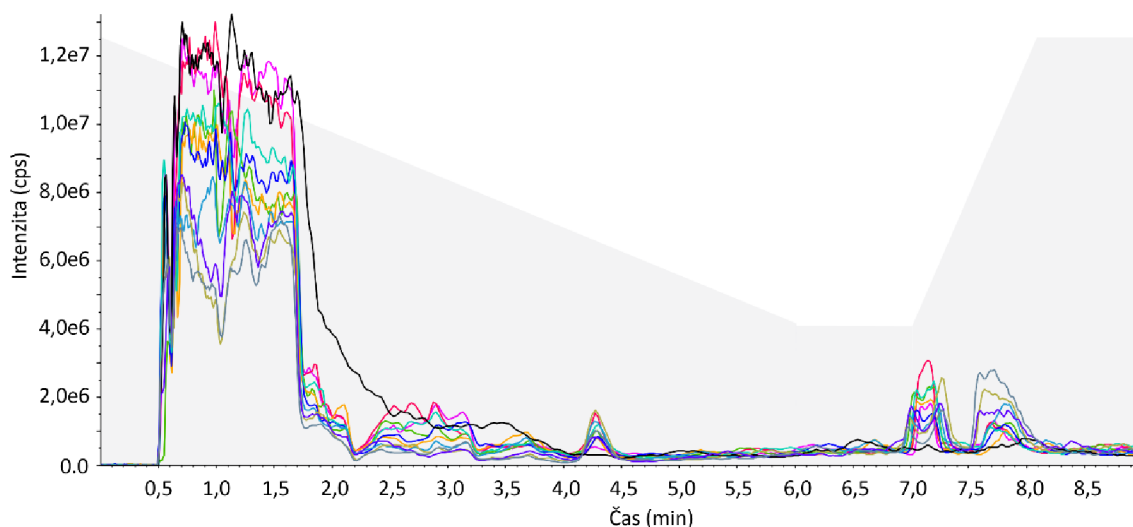
Obr. 7: Mezidenní správnost a přesnost ($n = 15$), kde každý analyt je znázorněn barevnou značkou, přičemž každá barva představuje odpovídající koncentrační úroveň QC vzorku. Červená přerušovaná čára označuje akceptační kritérium pro LQC, zelenomodrá pro MQC a HQC. Analyty, které nesplňují kritérium, jsou označeny názvem.

4.1.2.2.3 Matricové efekty

Matricové efekty byly hodnoceny na základě rozdílů v intenzitě signálu v elučních oblastech píků analytů. Iontová suprese/zvýšení ionizace jsou znázorněny na Obr. 8 (-MRM mód) a Obr. 9 (+MRM mód), kde je porovnána odezva analyzovaných močí se vzorkem blanku. V negativním režimu byla pozorována iontová suprese v retenčním čase 0,5–2,0 min. V pozitivním režimu nebyly patrné žádné interference v retenčním čase eluujících analytů, a to *N*-propionylglycinu (RT 3,6 min), *N*-valerylglycinu (RT 3,8 min) a *N*-glutarylglycinu (RT 6,0 min).



Obr. 8: Celkové iontové chromatogramy vzorků močí ($n = 10$, barevně) a blanku (černě) znázorňující iontovou supresi/zvýšení ionizace (-MRM mód). Šedá zóna zobrazuje procentuální podíl mobilní fáze B (100% acetonitril) během analýzy.



Obr. 9: Celkové iontové chromatogramy vzorků moči ($n = 10$, barevně) a blanku (černě) znázorňující iontovou supresi/zvýšení ionizace (+MRM mód). Šedá zóna zobrazuje procentuální podíl mobilní fáze B (100% acetonitril) během analýzy.

4.1.2.2.4 Carry-over (Přenos vzorku)

Pomocí experimentu cíleného na stanovení carry-over efektů nebyly nalezeny žádné významné interference, které by ovlivňovaly kvantifikaci látek. U všech analytů byla interference nižší než 5 % ULOQ.

4.1.2.3 Diagnostika pacientů

Vyvinutá metoda byla několik let v klinické praxi aplikována na vzorky pacientů s podezřením na DMP, díky níž bylo odhaleno široké spektrum diagnos. U pacientů byly vytvořeny multikomponentní krabicové grafy a sítě DMP s použitím RS hodnot. Na základě změn v hladinách biomarkerů pacientů ve srovnání se zdravými kontrolami bylo diagnostikováno celkem 47 pacientů s 24 různými DMP.

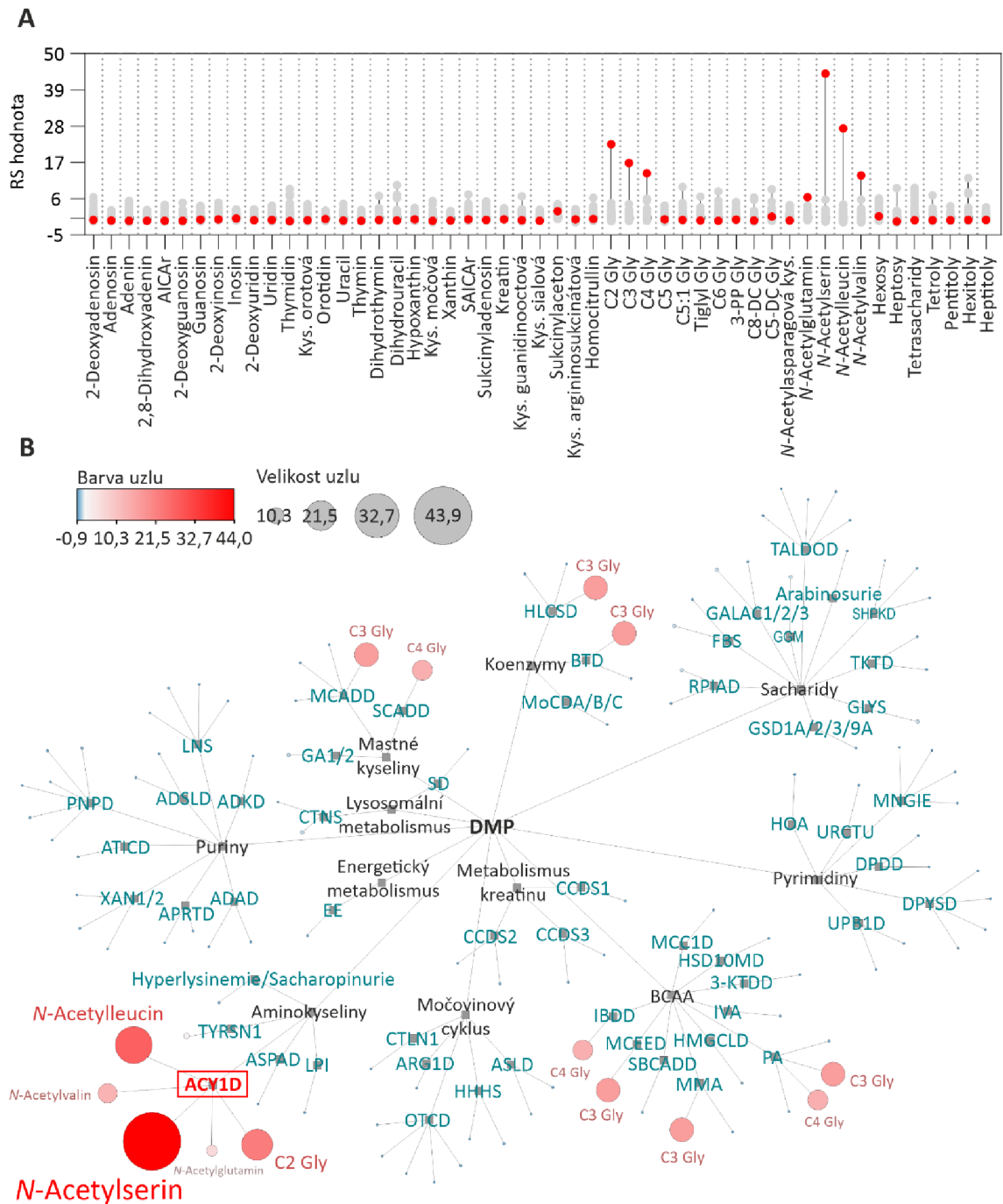
V následujících podkapitolách jsou popsány dvě kazuistiky pacientů, jejichž diagnosa byla detekována vyvinutou metodou. Kazuistiky zahrnují názornou ukázkou diagnostického pracovního postupu, tedy tvorbu grafu a metabolické sítě.

4.1.2.3.1 Pacient s deficitem aminoacylasy

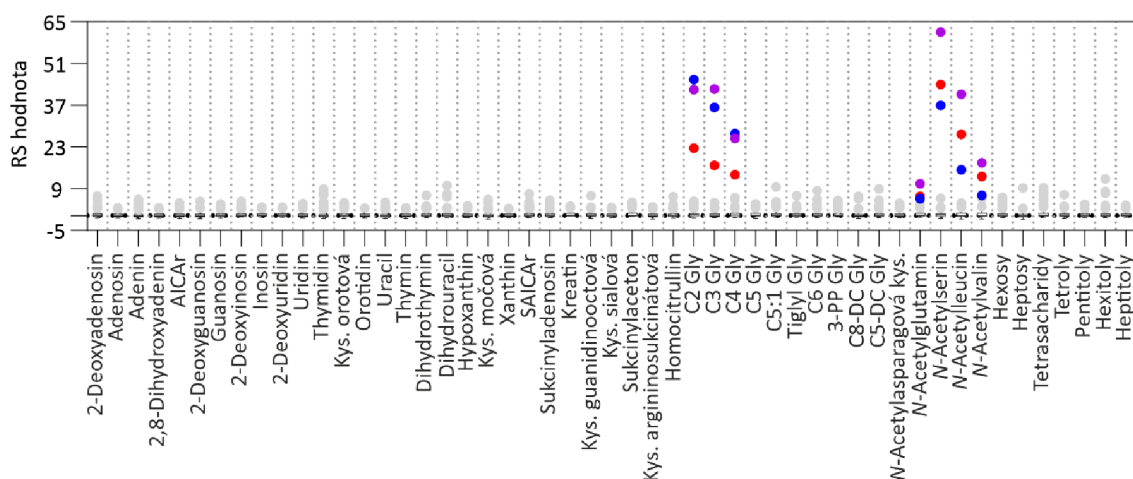
Probandem (Pacient 21) byl 15letý chlapec české národnosti z 2. gravidity, jehož porod proběhl spontánně a bez komplikací v termínu. Nebyly pozorovány žádné problémy v rámci poporodní adaptace. Novorozenecký screening (z angl. *Newborn Screening*, NBS) byl negativní a psychomotorický vývoj chlapce odpovídal normě. Chlapec navštěvoval logopedii pro poruchu výslovnosti. Při nástupu do školy byl považován za sociálně nezralého a v 10 letech mu byla diagnostikována dysgrafie. Dále měl problémy s koordinací těla a rovnováhou. V 15 letech byl vyšetřen na dětské klinice pro hepatopatii a obezitu, což vedlo k odhalení nealkoholické steatosy jater s neúplně vyjádřeným metabolickým syndromem.

Chlapci bylo doporučeno podstoupit psychologické vyšetření a screening DMP. Podle psychologů se jeho kognitivní schopnosti pohybovaly na horní hranici podprůměru. Screening DMP pomocí této vyvinuté LC-MS/MS metody odhalil zvýšenou exkreci *N*-acetylovaných derivátů serinu, leucinu, valinu, glutaminu a glycinu v moči (Obr. 10), která je charakteristická pro deficit aminoacylasy (ACY1D, OMIM #609924). Kromě toho byly v tomto vzorku pozorovány zvýšené acylglyciny, a to propionylglycin (C3 Gly) a (iso)butyrylglycin (C4 Gly), které již dříve byly asociovány s tímto onemocněním v práci Sass *et al.* (103).

Podezření na ACY1D potvrdila molekulárně genetická analýza, která odhalila patogenní missense variantu v genu *ACY1* c.1057C > T (p.Arg353Cys; rs21912698, MAF 0,06 %) v homozygotním stavu. V souvislosti s tímto nálezem následná genetická analýza u obou rodičů odhalila missense mutaci v heterozygotní formě a mutace byla potvrzena také u dvou mladších bratrů v homozygotní formě. Screening DMP pomocí vyvinuté metody rovněž prokázal zvýšené hladiny charakteristických aminokyselin v moči bratrů (Pacient 2 a 22, Obr. 11).



Obr. 10: Deficit aminoacylasy: Multikomponentní krabicový graf RS hodnot Pacienta 21 (červeně) a zdravých kontrol (šedě) (A) a odpovídající síť DMP (B). Na základě zvýšených biomarkerů svědčících pro ACY1D byl pacient správně diagnostikován.



Obr. 11: Multikomponentní krabicový graf RS hodnot pacientů s ACY1D a zdravých kontrol (šedě). Pacienti jsou rozlišeni barevně - Pacient 21 (červeně), Pacient 2 (fialově) a Pacient 22 (modře).

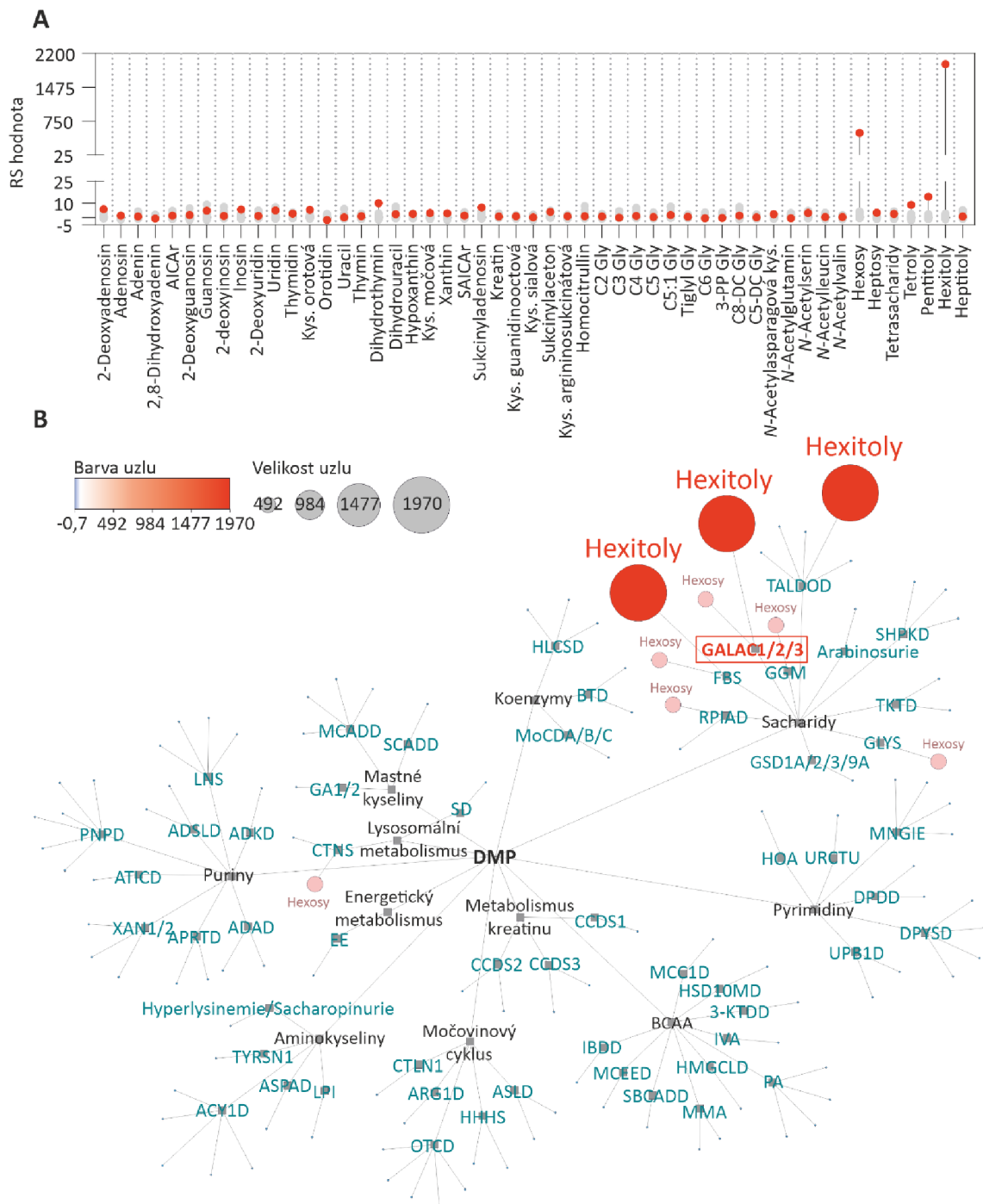
4.1.2.3.2 Pacientka s galaktosémií typu I (Duarte variantou)

Probandem (Pacient 1) byla dvouměsíční holčička české národnosti z 1. gravidity s výraznou růstovou restrikcí. Těhotenství bylo ukončeno císařským řezem z důvodu patologického nálezu při kardiotokeografii. Po neuspokojivé saturaci byla nasazena oxygenoterapie, díky níž byla následná adaptace bezproblémová. Novorozenec byl po porodu standardně kojen. Z důvodu prolongované žloutenky a nízké tělesné hmotnosti byl sledován na neonatologii. Pro nízkou hmotnost byla novorozenci podávána umělá výživa, po které však vždy následovalo zvracení. Výsledky NBS byly negativní a rodinná anamnéza nenasvědčovala žádnému genetickému onemocnění.

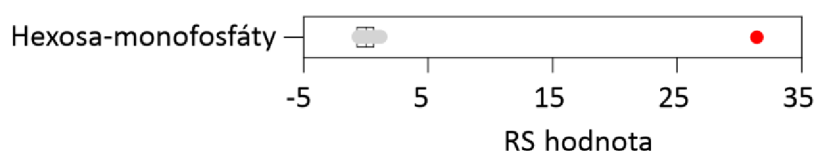
O několik týdnů později se však u pacientky začaly projevovat nespecifické projevy (neprospívání, nafouklé břicho, odmítání potravy). Dále se u ní objevily nažloutlé skléry a známky subikteru. Ultrazvuk břicha odhalil výrazný ascites, zvýšenou echogenitu jater a perikardiální výpotek (3 mm). Tyto symptomy se nezlepšovaly, což vyústilo v akutní selhání jater. Součástí diferenciální diagnostiky byl screening DMP vyvinutou metodou, který odhalil zvýšenou exkreci hexitolů a hexos v moči (Obr. 12). V tuto chvíli bylo lékařům sděleno podezření na galaktosémii. Avšak vzhledem k tomu, že pík galaktitolu a galaktosy není vyvinutou metodou rozlišitelný od ostatních hexitolů a hexos, bylo následně nezbytné vyloučit přítomnost mannitolu/sorbitolu pomocí GC-MS metody. Jelikož se u pacientů s galaktosémií hromadí v erytrocytech

galaktosa-1-fosfát, diagnosa byla dále potvrzena analýzou zvýšených hexosa-monofosfátů v DBS odebrané v rámci NBS za stejných LC-MS/MS podmínek (Obr. 13).

Na základě laboratorních nálezů matka neprodleně přestala kojit, což vedlo již po pár hodinách k výraznému zlepšení akutního stavu pacientky. DNA analýza genu *GALT* odhalila mutaci v heterozygotní formě: c.37C >T (p.Gln 13*) a c.200G >A (p.Arg67His). U probanda tak byla definitivně diagnostikována galaktosémie typu I, Duarteho varianta (*GALAC1*, OMIM #230400). Pacientka byla předána do péče specialistů a byla jí předepsána celoživotní bezgalaktosová dieta. Dnes jsou dívce 3 roky a její stav je stabilizovaný.



Obr. 12: Galaktosémie typu I, Duarteho varianta: Multikomponentní krabicový graf RS hodnot Pacienta 1 (červeně) a zdravých kontrol (šedě) (A) a odpovídající síť DMP (B). Na základě zvýšených biomarkerů svědčících pro GALAC1/2/3 byla pacientka správně diagnostikována.



Obr. 13: Elevace hexosa-monofosfátů (RS hodnota = 31,4) v suché krevní skvrně (DBS) pacientky suspektní pro galaktosémii (červeně) v porovnání se zdravými kontrolami (šedě, $n = 12$, RS hodnota = -0,8–1,4).

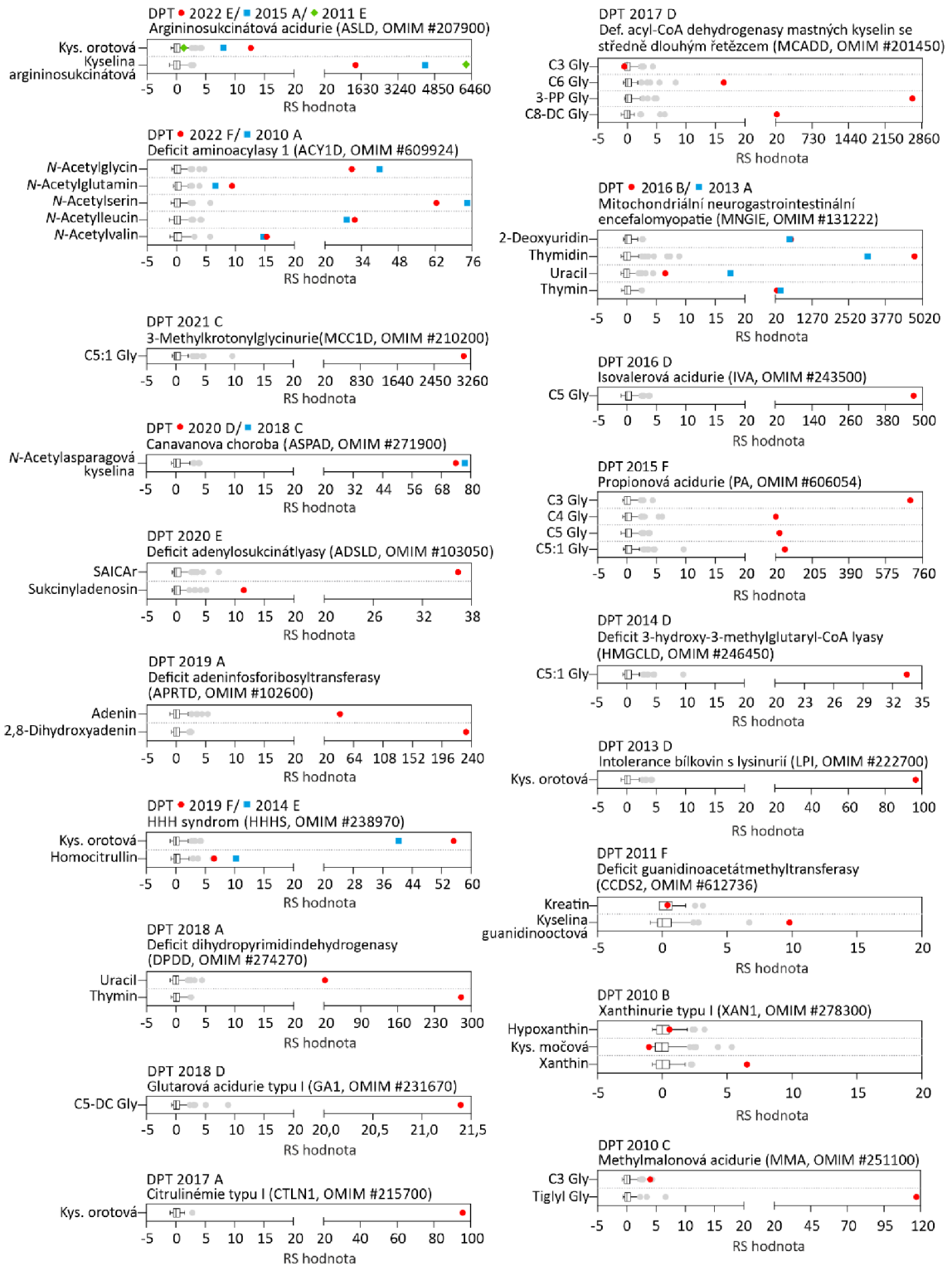
4.1.2.4 Externí hodnocení kvality

Za účelem ověření diagnostických možností byla vyvinutá metoda a diagnostický pracovní postup testován na 25 vzorcích močí z EHK programu ERNDIM DPT (z roku 2010–2022). Seznam vzorků a příslušné diagnózy jsou uvedeny v Tab. 3. Všechny vzorky byly správně diagnostikovány na základě RS hodnot biomarkerů. Multikomponentní krabicové grafy RS hodnot diagnosticky významných biomarkerů těchto vzorků jsou znázorněny na Obr. 14.

Tab. 3: Seznam vzorků z externího hodnocení kvality (EHK) programu ERNDIM DPT z let 2010–2022 analyzovaných vyvinutou metodou.

Pacient	Diagnosa
DPT-2022-E	Argininosukcinátová acidurie
DPT-2022-F	Deficit aminoacylasy
DPT-2021-C	3-Methylkrotonylglycinurie
DPT-2020-D	Canavanova choroba
DPT-2020-E	Deficit adenylosukcinátlyasy
DPT-2019-A	Deficit adeninfosforibosyltransferasy
DPT-2019-F	HHH syndrom
DPT-2018-A	Deficit dihydropyrimidindehydrogenasy
DPT-2018-C	Canavanova choroba
DPT-2018-D	Glutarová acidurie typu I
DPT-2017-A	Citrulinémie typu I
DPT-2017-D	Deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem
DPT-2016-B	Mitochondriální neurogastrointestinální encefalomyopatie
DPT-2016-D	Isovalerová acidurie
DPT-2015-A	Argininosukcinátová acidurie
DPT-2015-F	Propionová acidurie
DPT-2014-D	Deficit 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyasy
DPT-2014-E	HHH syndrom
DPT-2013-A	Mitochondriální neurogastrointestinální encefalomyopatie

DPT-2013-D	Intolerance bílkovin s lysinurií
DPT-2011-E	Argininosukcinátová acidurie
DPT-2011-F	Deficit guanidinoacetátmethyltransferasy
DPT-2010-A	Deficit aminoacylasy
DPT-2010-B	Xanthinurie typu I
DPT-2010-C	Methylmalonová acidurie



Obr. 14: Multikomponentní krabicové grafy RS hodnot 25 vzorků z externího hodnocení kvality ERNDIM DPT z let 2010–2022.

4.1.3 Diskuze

Diagnostika DMP je komplikovaná nejen kvůli jejich nízké incidenci a nespecifickým příznakům, ale také kvůli rozsáhlosti a náročnosti technik užívaných pro analýzu diagnostických biomarkerů. V současné době je trendem používat metody, které se vyznačují krátkou dobou analýzy a kterým předchází jednoduchá příprava vzorku. Z tohoto důvodu se metody dvourozměrné chromatografie na tenké vrstvě, RP-HPLC nebo GC-MS nahrazují LC-MS/MS metodami pracující na základě MRM, což je vysoce selektivní a citlivá metoda pro kvantifikaci specifických látek za krátký čas. Naše laboratoř má několikaleté zkušenosti s vývojem a optimalizací HILIC-MS/MS metod pro metabolomické experimenty (85–88), nicméně v této práci bylo cílem zaměřit se pouze na metabolity související s DMP (zahrnující zejména metabolismus purinů a pyrimidinů, aminokyselin, aminokyselin s rozvětveným řetězcem, sacharidů, mastných kyselin a cyklus močoviny).

V práci je prezentována nová LC-MS/MS metoda pro simultánní analýzu širokého spektra metabolitů. Unikátní způsob separace založený na aminopropylové stacionární fázi poskytuje analýzu mnoha polárních metabolitů s různými fyzikálně-chemickými vlastnostmi (např. aminokyseliny, puriny a pyrimidiny, organické kyseliny, nukleotidy a další). Jedná se tak o vysoce citlivou a účinnou metodu, která je v souladu se současnými trendy v diagnostice onemocnění. Vyznačuje se jednoduchou přípravou vzorku (naředění a přidání směsi IS), krátkou dobou analýzy (11,5 min) a poloautomatickým diagnostickým pracovním postupem. V rámci vývoje metody bylo nezbytné zvážit, jak vizualizovat všechny metabolity současně, aby bylo vyhodnocení výsledků rychlé a praktické. Proto byl vyvinut jednoduchý pracovní postup zpracování dat zahrnující snadnou integraci píků a kvantifikaci analytů, zařazení získaných koncentrací dle věku pacienta, transformaci koncentrací pomocí RS hodnoty a pokročilou vizualizaci dat pomocí uživatelsky přívětivých softwarů. Tento pracovní postup lze provést za necelou 1 hod od příjmu vzorku, což z něj činí spolehlivý nástroj pro diagnostiku DMP.

Validace metody byla provedena na základě příručky EMA (94) pro celkem 52 z 65 analytů, jelikož v rámci acylglycinů, cukrů a cukerných alkoholů byl vybrán pouze jeden zástupce pro každou skupinu isomerů. Většina analytů splnila akceptační kritéria

pro mezidenní správnost a přesnost s výjimkou 2,8-dihydroxyadeninu, perseitolu, *N*-propionylglycinu, orotidinu a inosinu. V případě 2,8-dihydroxyadeninu, který je jedním ze dvou diagnostických markerů APRTD, mohou odchylky souviset s jeho velmi špatnou rozpustností. Nicméně s ohledem na to, že jeho přítomnost v moči není fyziologická, lze konstatovat, že pozorované odchylky validačních parametrů nekomplikují diagnostiku APRTD.

Nižší hodnoty správnosti byly pozorovány na všech 3 koncentračních úrovních QC vzorků u perseitolu, markeru pro deficit transaldolasy (TALDOD, OMIM #606003) (104). Diagnosa tohoto onemocnění je však založena také na dalších diagnosticky specifických markerech. Stejně tak inosin, jenž také nesplňoval akceptační kritéria, není jediným markerem souvisejícím s deficitem purinnukleosidfosforylasy (OMIM #613179) (105). Vyšší hodnoty přesnosti byly pozorovány u orotidinu, jehož zvýšení v moči může souviset s léčbou allopurinolem či jinými léky (106). U takto léčených pacientů může být kromě orotidinu v moči zvýšená také kyselina orotová, která je významným markerem např. deficitu ornithintranskarbamylasy (OTCD, OMIM #311250) (107). Orotidin proto hraje významnou roli v odlišení pacientů léčených allopurinolem od pacientů s OTCD, u kterých nedochází ke zvýšené exkreci orotidinu, ale pouze kyseliny orotové. Výše popsané odchylky lze tedy považovat za nevýznamné, jelikož neovlivnily spolehlivost vyvinuté metody. Výraznější odchylky zejména u přesnosti byly pozorovány pro LQC *N*-propionylglycinu, ačkoli odchylky pro MQC a HQC byly minimální. Vzhledem k tomu, že *N*-propionylglycin bývá u pacientů ve srovnání s kontrolami výrazně zvýšený, jsou pro diagnostické účely vyhovující výsledky MQC a HQC.

V případě matricových efektů nebyla v pozitivním módu zaznamenána žádná interference v eluční době analytů. Naopak v negativním režimu byla pozorována iontová suprese, která je pravděpodobně způsobená změnou mobilní fáze na začátku analýzy, která přechází z organické fáze do vodné. V tomto důsledku dochází ke snížení signálu. Mezi ovlivněné analyty patří dihydrothymín, dihydrouracil, thymín, uracil, thymidin a deoxyuridin.

Jedním z praktických omezení metody je životnost kolony Luna NH₂, která za vysoce alkalických separačních podmínek umožňuje cca 500 nástřiků. V rámci sedmileté aplikace metody v klinické praxi však bylo použito pouze 5 kolon, aby byla zajištěna stabilní chromatografická selektivita po celou dobu.

Z analytického/diagnostického hlediska je dalším omezením nedostatečné rozlišení isomerů acylglycinů a cukrů. V případě abnormálních nálezů těchto markerů by se mělo zvážit potvrzení jinými metodami.

Současné trendy se zaměřují na použití malých objemů vzorků, což je v souladu s nově vyvinutou metodou, která pro analýzu požaduje velmi malé množství vzorku moči (méně než 100 μ l). To je výhodné zejména v případě novorozenců, u nichž je problém větší množství moče odebrat a jejich moč se obvykle vyznačuje nízkou hladinou kreatininu.

4.2 Rychlá a účinná LC-MS/MS metoda pro screening vybraných organických kyselin a acylkarnitinů v suché krevní skvrně

Organické kyseliny v moči jsou rutinně vyšetřovány technikou GC-MS, která je však časově náročná a vyžaduje personál s dlouholetými zkušenostmi. S cílem zjednodušit a zrychlit diagnostiku organických acidurií a dalších vybraných DMP byla v LDMP, OKB FN Olomouc vyvinuta a validována nová LC-MS/MS metoda pro analýzu organických kyselin, acylkarnitinů a acylglycinů v moči. Odborná publikace s názvem „Rapid and efficient LC-MS/MS diagnosis of inherited metabolic disorders: a semi-automated workflow for analysis of organic acids, acylglycines, and acylcarnitines in urine“ byla publikována v roce 2023 v časopise *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (108). Pro svou univerzálnost a robustnost našla tato metoda své uplatnění také v rámci analýzy vybraných organických kyselin a acylkarnitinů v suché krevní skvrně. Toto vyšetření je indikováno u vzorků DBS, u nichž byly metodou přímého nástřiku zjištěny zvýšené koncentrace C3-, C4- a C5-karnitinů v rámci NBS a selektivního screeningu (SES) DMP. V následujících kapitolách je popsána aplikace nově vyvinuté metody na vzorky DBS.

4.2.1 Materiál a metody

4.2.1.1 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy Kern ABT 120-5 DM (Kern, Německo)
- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Třepačka MS 3 basic (IKA, Německo)
- DBS Puncher Wallac (PerkinElmer, USA)
- LC-MS/MS: Kapalinový chromatograf Exion LC (Sciex, Framingham, MA, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem QTRAP 6500+ (Sciex, Framingham, MA, USA)
- Kolona Acquity UPLC HSS T3 C18 1,8 μm , 100 \times 2,1 mm (Waters, Milford, MA, USA)

4.2.1.2 Chemikálie

Standardy organických kyselin a acylkarnitinů analytické čistoty nebo vyšší byly obdrženy od Sigma-Aldrich. Voda, acetonitril, methanol a kyselina mravenčí (vše LC-MS kvality) byly zakoupeny od Honeywell Riedel-de Haën (Seelze, Německo). Isotopicky značené standardy aminokyselin a acylkarnitinů byly obdrženy od Chromsystems (Mnichov, Německo) z kitu *MassChrom Amino Acids and Acylcarnitines from Dried Blood (Non Derivatized)*.

4.2.1.3 Příprava zásobních roztoků standardů

Zásobní roztoky standardů organických kyselin a acylkarnitinů byly připraveny o koncentraci 10 mmol/l ve vodě, které byly skladovány při -20 °C.

4.2.1.4 Příprava směsi interních standardů

Směs IS byla připravena dle návodu pro příslušný kit od výrobce Chromsystems. Lyofilizát IS byl rekonstituován v 25 ml extrakčního pufru. Tato směs byla uchovávána po dobu 3 týdnů při 4 °C. Koncentrace vybraných IS ve směsi a ve finálním vzorku DBS je uvedena v Tab. 4.

Tab. 4: Koncentrace vybraných interních standardů ve směsi a ve vzorku (100 µl směsi IS/suchá krevní skvrna ~ 3,1 µl krve), číslo šarže: 4022.

Interní standard (IS)	Koncentrace IS ve směsi (µmol/l)	Koncentrace IS ve vzorku (µmol/l)
Propionyl- ² H ₃ -karnitin	0,087	2,83
Butyryl- ² H ₃ -karnitin	0,041	1,34
Isovaleryl- ² H ₉ -karnitin	0,046	1,50

4.2.1.5 Biologický materiál

Do této studie byly zahrnuty vzorky DBS zdravých kontrol ($n = 13$), pacientů ($n = 11$) a EHK programu ERNDIM kontrolního schématu „Acylkarnitiny v suché krevní skvrně“ 2023 (z angl. *Acylcarnitines in dried blood spots, ACDB, n = 2*). Všechny vzorky byly poskytnuty LDMP, OKB FN Olomouc. Jako zdravé kontroly byly použity vzorky DBS, u kterých nebyla prokázána žádná z testovaných DMP. Základní klinické informace o vzorcích zdravých kontrol a pacientů jsou uvedeny v Tab. 5.

Tab. 5: Základní klinické informace zdravých kontrol a pacientů.

Vzorky	<i>n</i>	Muži	Ženy	Věk	Medián věku
Zdravé kontroly	13	7 (53,8 %)	6 (46,2 %)	0–16 let	3 dny
Pacienti	13	7 (53,8 %)	6 (46,2 %)	0–13 let	3 dny

4.2.1.6 Příprava vzorků suchých krevních skvrn

Příprava vzorků DBS zdravých kontrol, pacientů a EHK ERNDIM ACDB spočívala ve vyražení disku (3 mm) se zaschlou krví do 96-jamkové mikrotitrační destičky a v následné extrakci pomocí 100 µl methanolu se směsí IS (isotopicky značené aminokyseliny a acylkarnitiny od Chromsystems). Po centrifugaci (4 °C, 570 g, 10 min) byly vzorky připraveny pro analýzu.

4.2.1.7 Vývoj LC-MS/MS metody

Pro účel optimalizace MS/MS podmínek byly připraveny roztoky všech komerčně dostupných standardů o koncentraci 1–10 µmol/l v mobilních fázích A a B (1:1, v/v). Postup optimalizace je popsán v kapitole 4.1.1.11.

4.2.1.8 LC-MS/MS analýza

Analýza byla provedena pomocí kapalinového chromatografu Exion LC (SCIEX, Framingham, MA, USA) s kolonou Acquity UPLC HSS T3 C18 (1,8 µm, 100 × 2,1 mm) (Waters, Milford, MA, USA) ve spojení s hmotnostním spektrometrem QTRAP 6500+ (SCIEX, Framingham, MA, USA). Mobilní fáze A obsahovala 0,5% kyseliny mravenčí ve vodě a mobilní fáze B 100% acetonitril. Gradientová eluce při průtokové rychlosti 0,37 ml/min byla nastavena následovně: t = 0–2 min 100 % A; t = 2–9 min 80 % A; t = 9–17 min 5 % A; t = 17–20 min 5 % A; t = 21–26 min 100 % A. Nástřik vzorku činil 1 µl. Teplota kolony byla nastavena na 30 °C a autosampleru na 5 °C.

Analyty byly měřeny v režimu MRM s přepínáním polarit, tedy současně v pozitivním a negativním ESI režimu. Nastavení iontového zdroje bylo následující: napětí na sprejovací kapiláře = -4500 V/+5500 V, teplota 450 °C, tlak clonícího plynu 35 arb, tlak kolizního plynu (dusík) 6 arb a tlaky obou zmlžujících plynů 50 arb.

4.2.1.9 Analýza vybraných organických kyselin a acylkarnitinů ve vzorcích suchých krevních skvrn

Vybrané pozitivní vzorky z NBS a SES DMP, který je v LDMP, OKB FN Olomouc prováděn pomocí průtokové injekční analýzy ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (z angl. *Flow Injection Analysis-Tandem Mass Spectrometry*, FIA-MS/MS), byly indikovány pro následnou detailní LC-MS/MS analýzu vybraných organických kyselin a acylkarnitinů. Ačkoliv je metodika FIA-MS/MS z časových důvodů pro screening DMP velmi výhodná, poskytuje však pouze informaci o sumě látek se stejnou molekulovou hmotností (109), což v případě C4- a C5-karnitinů výrazně ztěžuje diagnostiku onemocnění. I v případě zvýšeného C3-karnitinu je nezbytné aplikovat další testy, které prokáží či vyloučí onemocnění na základě diagnosticky specifitějších markerů, jako je např. methylmalonát charakteristický pro methylmalonovou acidémii (MMA, OMIM #251000). Existují však také další poruchy, které jsou spjaté s elevací C3-karnitinu, a to propionová acidémie (PA, OMIM #232000) a kombinované poruchy remetylace (110).

4.2.1.10 Analýza dat

Pro sběr MS dat byl použit software Analyst 1.7 a pro jejich zpracování byl použit software SciexOS 2.0.

4.2.2 Výsledky

4.2.2.1 Vývoj LC-MS/MS metody

Vyvinutá metoda zahrnuje 10 diagnostických markerů DMP ze skupiny organických kyselin ($n = 3$), acylkarnitinů ($n = 7$) a IS ($n = 3$). Optimalizací mobilní fáze bylo dosaženo separace všech isomerů přítomných látek. MS/MS parametry analytů a IS jsou uvedeny v Příloze 7.

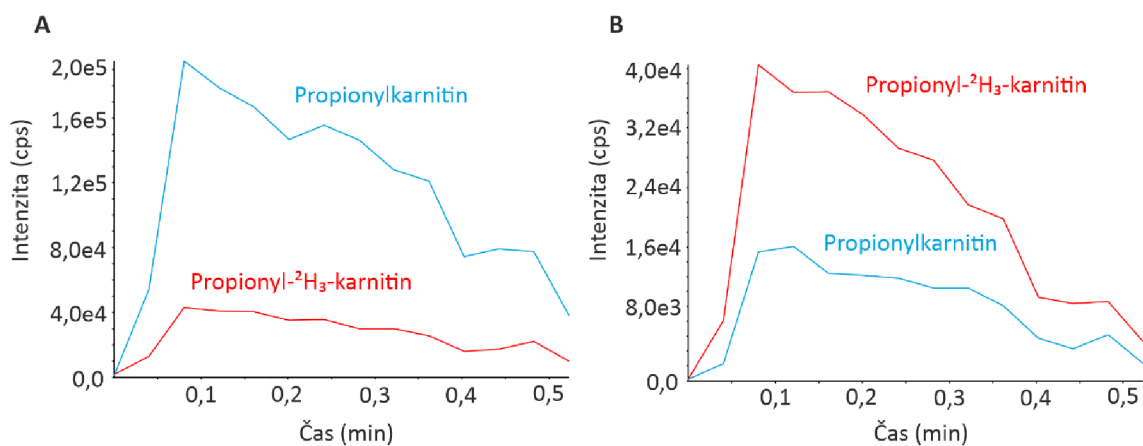
4.2.2.2 Analýza vybraných organických kyselin a acylkarnitinů ve vzorcích suchých krevních skvrn

Vyvinutá metoda byla aplikována na pozitivní vzorky z NBS a SES DMP, u kterých byla pomocí FIA-MS/MS analýzy odhalena patologická hodnota C3-, C4- a C5-karnitinů včetně jejich poměrů s jinými acylkarnitiny či aminokyselinami. V následující části jsou popsány 4 pacienti, pro jejichž diagnostiku byla použita nově vyvinutá metoda.

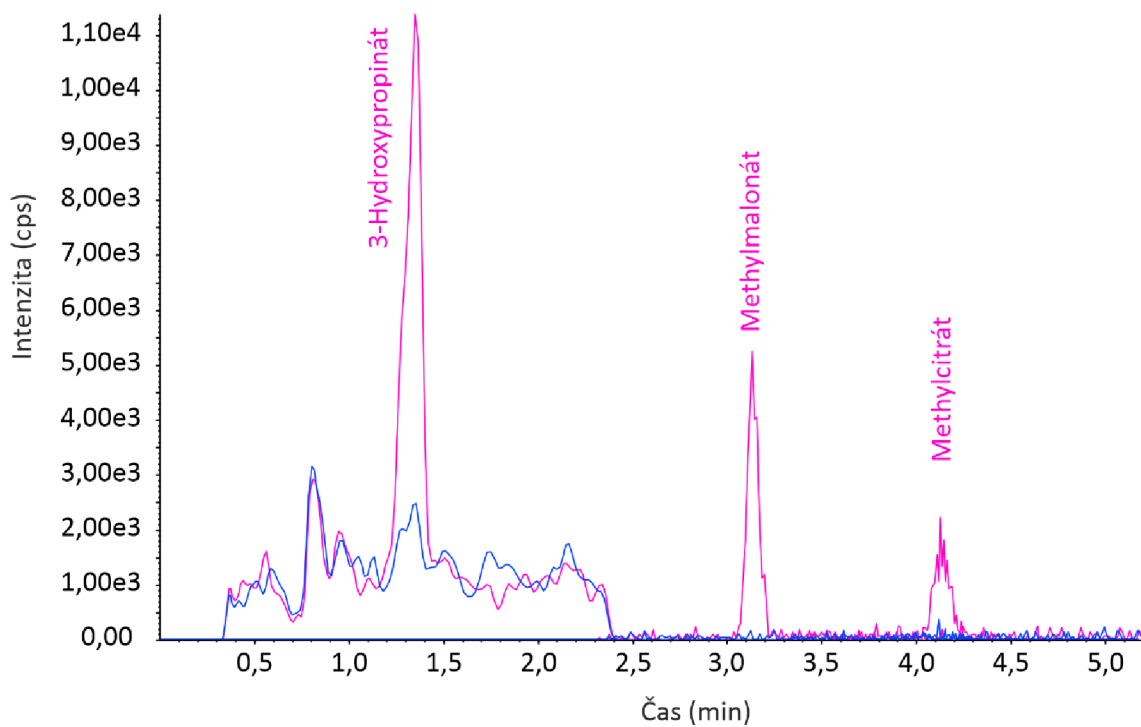
4.2.2.2.1 Pacientka s methylmalonovou acidémií

První pacientka (Pacient I) byla půlroční dívka, která měla NBS negativní. Pro život ohrožující stav však byla hospitalizována na dětské klinice FN Olomouc, kde byla podrobena komplexnímu vyšetření DMP. Součástí vyšetření byl SES DMP ze vzorku DBS pomocí FIA-MS/MS analýzy, který odhalil zvýšený C3-karnitin ($c = 11,3 \mu\text{mol/l}$, norma $< 2,9 \mu\text{mol/l}$) včetně jeho poměrů vůči volnému karnitinu, C16- a C2-karnitinu a methioninu. Extrahovaný iontový chromatogram (FIA-MS/MS) propionylkarnitinu a jeho isotopicky značeného analogu ve vzorku DBS od pacientky a zdravé kontroly je znázorněn na Obr. 15.

Zvýšená koncentrace propionylkarnitinu je spjata s poměrně vzácnými, avšak závažnými autosomálně recesivními poruchami katabolismu propionátu – PA a MMA včetně deficitu methylmalonyl-CoA mutasy, methylmalonyl-CoA epimerasy a kobalaminu A, B, C, D, F, J (MMACBL, OMIM #251000, #251120, #251100, #251110, #277400, #277410, #277380 a #614857). Diferenciální diagnostika pomocí LC-MS/MS analýzy totožného vzorku DBS zachytila výraznou elevaci methylmalonátu, který je specifický pro MMA (Obr. 16). Též byl oproti zdravé kontrole zvýšen methylcitrát a 3-hydroxypropionát. Suspektní MMA byla později potvrzena genetickou analýzou.



Obr. 15: Extrahovaný iontový chromatogram (FIA-MS/MS) propionylkarnitinu a jeho isotopicky značeného analogu v suché krevní skvrně Pacienta I (A) a zdravé kontroly (B).

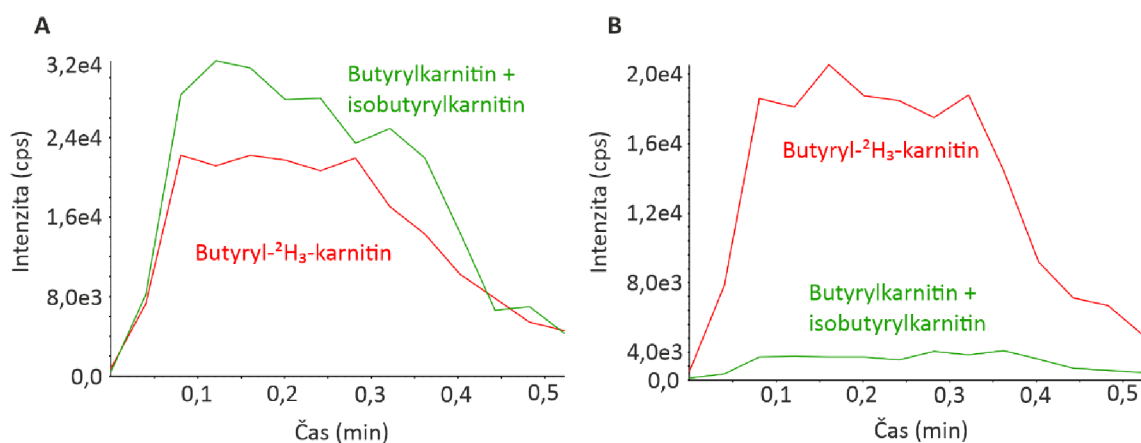


Obr. 16: LC-MS/MS analýza vybraných organických kyselin v suché krevní skvrně Pacienta I (červeně) a zdravé kontroly (modře).

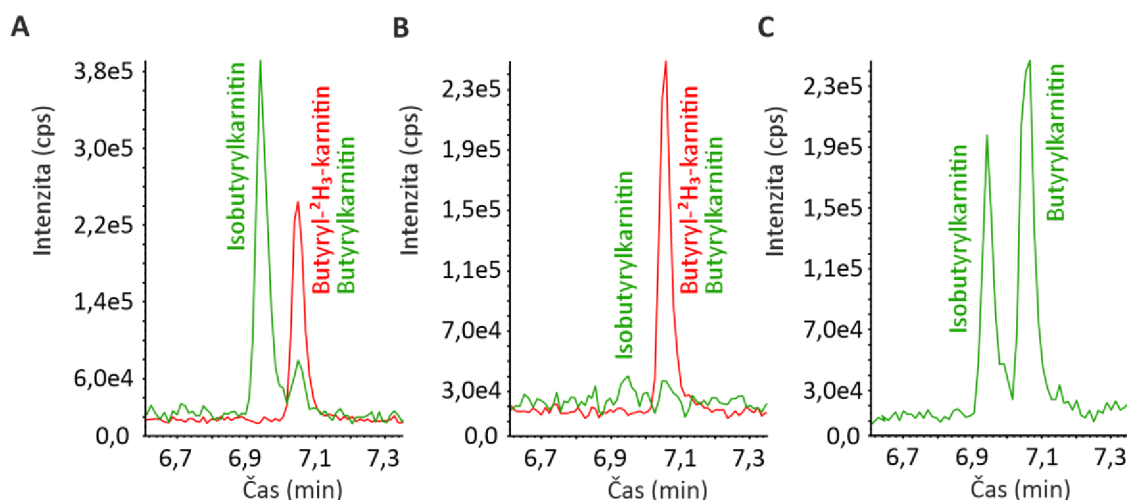
4.2.2.2 Pacient s deficitem isobutyryl-CoA dehydrogenasy

Pacient II byl 12letý chlapec, jehož výsledek NBS byl neznámý (původ vzorku EHK ERNDIM ACDB). Od 11 let pacient popisoval bolesti hlavy. SES DMP pomocí FIA-MS/MS analýzy odhalil patologický profil C4-karnitinů (suma butyryl- a isobutyrylkarnitinu) a poměrů vůči C2-, C3- a C8-karnitinu, což může indikovat deficit acyl-CoA dehydrogenasy s krátkým řetězcem (OMIM #201470) nebo vzácnější deficit isobutyryl-CoA dehydrogenasy (IBDD, OMIM #611283). Elevace C4-karnitinů je však také patrná u ethylmalonové encefalopatie (OMIM #602473) a glutarové acidurie typu II (OMIM #231680) (111).

Extrahovaný iontový chromatogram (FIA-MS/MS) C4-karnitinů ($c = 1,46 \mu\text{mol/l}$, norma $<0,31 \mu\text{mol/l}$) a isotopicky značeného butyrylkarnitinu ve vzorku DBS od pacienta a zdravé kontroly je znázorněn na Obr. 17. Separace C4-karnitinů v DBS pacienta, zdravé kontroly a směsi C4-karnitinů pomocí vyvinuté LC-MS/MS metody je zobrazena na Obr. 18. Zvýšená koncentrace isobutyrylkarnitinu u Pacienta II ve srovnání se zdravým jedincem potvrdila IBDD.



Obr. 17: Extrahovaný iontový chromatogram (FIA-MS/MS) C4-karnitinů a isotopicky značeného butyrylkarnitinu v suché krevní skvrně Pacienta II (A) a zdravé kontroly (B).

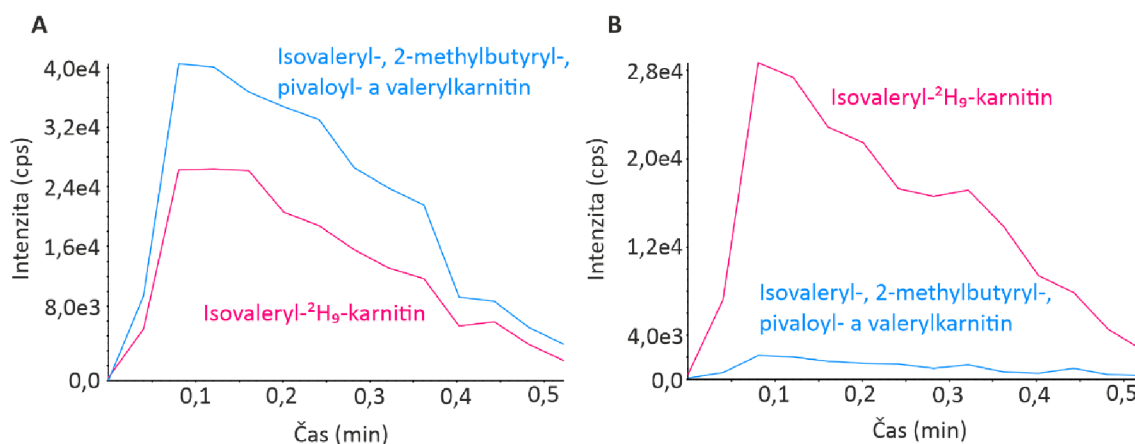


Obr. 18: LC-MS/MS analýza C4-karnitinů v suché krevní skvrně Pacienta II (A), zdravé kontroly (B) a směsi standardů C4-karnitinů (0,025 $\mu\text{mol/l}$) (C)

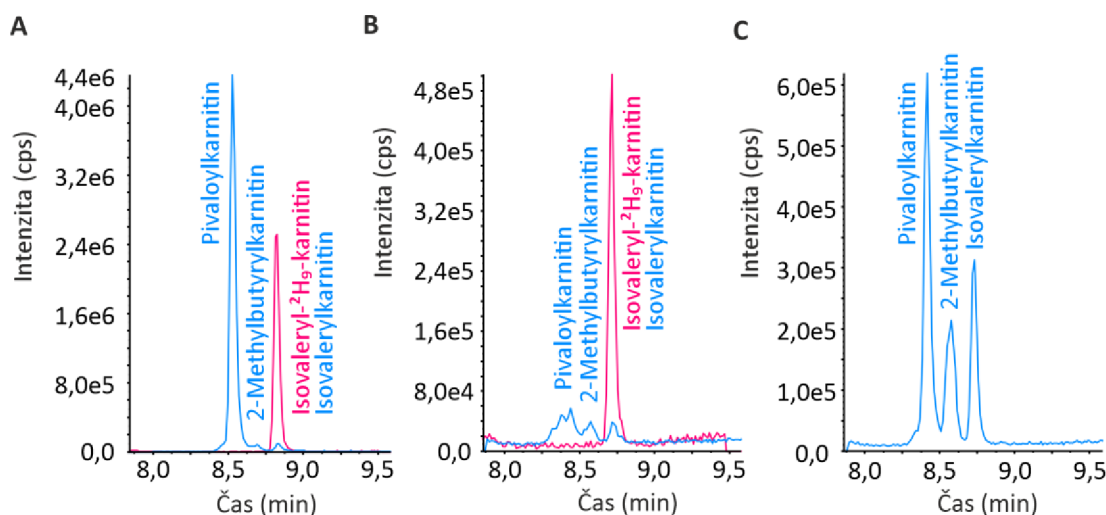
4.2.2.2.3 Pacienti s falešně pozitivním nálezem pro isovalerovou acidémii

U dvou pacientů (Pacient III a Pacient IV) byla pomocí FIA-MS/MS analýzy nalezena zvýšená koncentrace C5-karnitinů (suma isovaleryl-, 2-methylbutyryl-, pivaloyl- a valerylcarnitinu) a poměrů vůči C0-, C2- a C8-karnitinu. Jejich elevace může indikovat onemocnění IVA nebo SBCADD. Falešnou pozitivitu pro IVA a SBCADD však může způsobovat také nefyziologický pivaloylcarnitin v důsledku antibiotické léčby pivmecilinamem (lék Pivinorm) u těhotných žen před porodem (112).

Pacient III byl vyšetřen v rámci NBS, který odhalil zvýšené C5-karnitiny ($c = 1,93 \mu\text{mol/l}$, norma $<0,37 \mu\text{mol/l}$) včetně specifických poměrů. Extrahovaný iontový chromatogram (FIA-MS/MS) C5-karnitinů a isotopicky značeného isovalerylcarnitinu u vzorku pacienta a zdravé kontroly je znázorněn na Obr. 19. DBS byla dále podrobena LC-MS/MS analýze, kde byla potvrzena přítomnost pivaloylcarnitinu (Obr. 20). Následně matka novorozence potvrdila užívání Pivinormu před porodem.



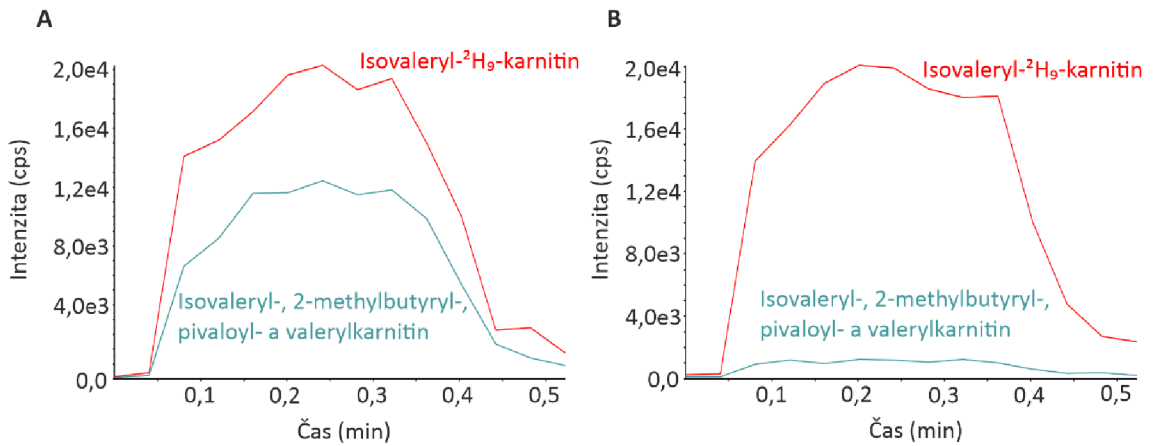
Obr. 19: Extrahovaný iontový chromatogram (FIA-MS/MS) C5-karnitinů a isotopicky značeného isovalerylkarnitinu v suché krevní skvrně Pacienta III (A) a zdravé kontroly (B).



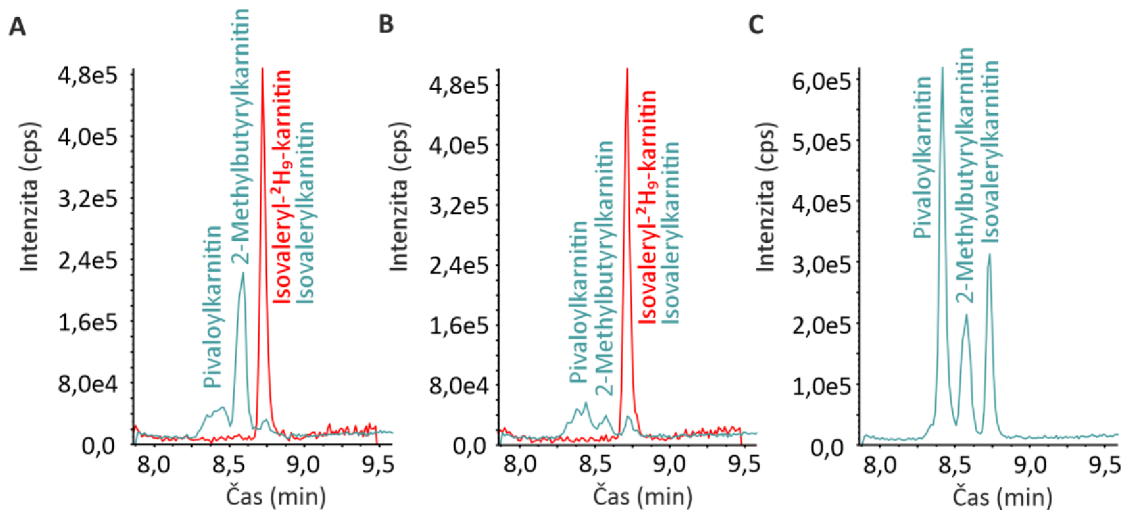
Obr. 20: LC-MS/MS analýza C5-karnitinů v suché krevní skvrně Pacienta III (A), zdravé kontroly (B) a směsi standardů C5-karnitinů (0,025 $\mu\text{mol/l}$) (C)

Pacient IV byl 13letý asymptomatický chlapec bez žádné specifické diety. Výsledek NBS nebyl znám (původ vzorku EHK ERNDIM ACDB). SES DMP u pacienta odhalil zvýšenou exkreci C5-karnitinů ($c = 0,66 \mu\text{mol/l}$, norma $<0,37 \mu\text{mol/l}$) včetně specifických poměrů. Extrahovaný iontový chromatogram (FIA-MS/MS) C5-karnitinů a isotopicky značeného isovalerylkarnitinu vzorku pacienta a zdravé kontroly je zobrazen na Obr. 21. Věk pacienta nenapovídá interferenci pivaloylkarnitinem v důsledku léčby Pivnormem, avšak vzhledem k asymptomatickému průběhu

onemocnění, které není typické pro IVA, bylo nezbytné vyloučit SBCADD. LC-MS/MS analýza spolehlivě rozlišila jednotlivé isomery C5-karnitinů (Obr. 22), přičemž na základě elevace 2-methylbutyrylkarnitinu ve srovnání se zdravým jedincem, byl u pacienta IV potvrzen SBCADD.



Obr. 21: Extrahovaný iontový chromatogram (FIA-MS/MS) C5-karnitinů a isotopicky značeného isovalerylkarnitinu v suché krevní skvrně Pacienta IV (A) a zdravé kontroly (B).



Obr. 22: LC-MS/MS analýza C5-karnitinů v suché krevní skvrně Pacienta IV (A), zdravé kontroly (B) a směsi standardů C5-karnitinů (0,025 $\mu\text{mol/l}$) (C)

4.2.3 Diskuze

Nová LC-MS/MS metoda je již více než 2 roky v LDMP, OKB FN Olomouc používána v rutinním provozu pro analýzu organických kyselin, acylkarnitinů a acylglycinů v moči a DBS. Organické acidurie jsou často spjaty s akutní klinickou manifestací, která je indikací pro komplexní screening DMP zahrnující mimo jiné vyšetření organických kyselin, acylkarnitinů a acylglycinů v moči. Jedná se tak o zcela nepostradatelnou metodu, která má potenciál v budoucnu nahradit souběžně používanou GC-MS metodu.

Metodika GC-MS v porovnání s LC-MS obnáší spoustu nevýhod, přičemž jednou z nejvýznamnějších je časově náročná a pracná příprava vzorků z důvodu jejich nezbytné extrakce a derivatizace. S tím souvisí špatná reprodukovatelnost přípravy vzorků vzhledem k různé extrakční a derivatizační účinnosti, která ovlivňuje výtěžnost analytů ve vzorku (113). Navíc příprava vzorku je podmíněna velkým objemem vzorku moče (alespoň 2 ml). V současnosti je cílem vyhodnocovat získaná data téměř výhradně pomocí multialgoritmické detekce píků, v některých případech dokonce již za pomoci umělé inteligence. GC-MS analýzy jsou však stále vyhodnocovány tzv. run-by-run a peak-by-peak, což vyžaduje vysoce kvalifikovaný personál s dlouholetými zkušenostmi. Tento postup je nevyhovující pro pacienty, kteří potřebují urgentní diagnostiku. Technika GC-MS však může být v některých případech výhodná, jelikož derivatizační produkty látek jsou efektivněji ionizovány (lepší citlivost) a separovány. GC-MS také neumožňuje analýzu acylglycinů a acylkarnitinů. Necílený přístup GC-MS může být prospěšný pro odhalení nefyziologických látek (např. metabolitů léčiv, markerů nově objevených poruch), které nejsou zařazeny do cílené LC-MS/MS metody.

Vyvinutá metoda byla v laboratoři aplikována na vzorky DBS v souvislosti s abnormálními nálezy z NBS a SES DMP pomocí FIA-MS/MS. Celosvětově užívaná metodika FIA-MS/MS pro screening vybraných DMP z DBS nabízí rychlou analýzu diagnosticky specifických aminokyselin a acylkarnitinů a jim odpovídajících isotopicky značených IS (114). Výhodou FIA-MS/MS je přímá injekce vzorků do MS/MS bez předchozí separace na koloně, což významně snižuje dobu analýzy vzorku a finanční náklady. Touto metodikou lze analyzovat stovky vzorků denně (109). Nicméně FIA-MS/MS je také limitující, jelikož podává informace pouze o sumě látek o stejné

hodnotě m/z (stejný MRM přechod) bez možnosti rozlišení isomerů a isobarů přítomných ve vzorku. Toto úskalí je možné pozorovat jak u již zmiňovaných acylkarnitinů (C4- a C5-karnitiny), tak u aminokyselin (leucin, isoleucin, alloisoleucin, hydroxyprolin). Zatímco aminokyseliny s rozvětveným řetězcem, leucin, isoleucin a alloisoleucin, zvyšují diagnostickou sensitivitu a specifitu pro nemoc z javorového sirupu (OMIM #24860), hydroxyprolin může způsobovat falešně pozitivní výsledky. Jeho zvýšená exkrece je typická pro benigní familiární onemocnění hydroxyprolinémií (OMIM #237000), které nevyžaduje lékařský zásah. Falešně pozitivní výsledky představují pro screeningové programy zátěž, kterou lze předcházet pomocí vývoje a aplikace druhostupňových metod umožňující rozlišení jednotlivých isomerů a isobarů (115, 116).

V této práci je představena nová rychlá a účinná LC-MS/MS metoda pro analýzu vybraných organických kyselin a acylkarnitinů v DBS. Vzhledem k robustnosti metody je pro LC-MS/MS analýzu dostačující vzorek připravený pro FIA-MS/MS, což výrazně urychluje proces diagnostiky onemocnění. Zavedení nové metody v LDMP, OKB FN Olomouc přispělo ke zjednodušení a zrychlení diagnostiky vybraných DMP. V případě absence takové metody na pracovišti je standardním postupem žádost o recall vzorku, tedy o nový odběr. To obnáší v některých případech hospitalizaci jedince, která je spjata se zátěží hospitalizovaného a zvýšenou úzkostí rodičů a příbuzných. Novou metodou bylo za poslední rok v klinické praxi odhaleno více než 8 falešně pozitivních záchytů pro IVA z NBS, což má výrazný podíl na minimalizaci zátěže novorozence a jeho rodiny a v neposlední řadě celého zdravotnického systému.

Nejčastěji pozorovaná falešná pozitivita pro IVA v rámci NBS je spjata s antibiotickou léčbou matky před porodem (Pivnorm). Účinná látka Pivnormu, pivaloyloxymethylester mecilinam, je v organismu konvertována pomocí acyl-CoA syntetasy (EC 6.2.1.3) na pivaloylkarnitin, který je zodpovědný za zvýšené C5-karnitiny v DBS (117). Deriváty kyseliny pivalové jsou však také používány v kosmetickém průmyslu jako zvláčňující látka „neopentanoát“, jehož estery byly nalezeny v přípravku na čištění bradavek, který byl poskytován kojícím matkám. V této konsekvenci byl v Belgii zaznamenán vysoký počet falešně pozitivních případů pro IVA v rámci NBS (118). Je však známo, že užívání pivalát-konjugovaných antibiotik může vést k sekundárnímu deficitu karnitinu, který je spjat s encefalopatií až hypoglykemií (119). Tento aspekt bude pravděpodobně středem zájmu dalších studií. Murko *et al.* ve své práci uvádí,

že u nemalého počtu novorozenců, u nichž byl v rámci druhostupňové metody odhalen pivaloylkarnitin, byla pozorována snížená koncentrace volného karnitinu v krvi. To může být způsobeno masivní ztrátou pivaloylkarnitinu ledvinami (120, 121).

Nová předložená LC-MS/MS metoda, která byla primárně vyvinuta s cílem simultánní analýzy širokého spektra organických kyselin, acylkarnitinů a acylglycinů v moči, poskytuje rychlou, účinnou analýzu pro vybrané organické kyseliny a acylkarnitiny v DBS. Tento nový přístup je v souladu s trendy v diagnostice onemocnění. Předností metody je robustnost použité kolony, která je v laboratoři používána již více než 3 roky, tj. pro více než 2000 nástřiků. Metodu je možné využít jako druhostupňovou v případě patologického nálezu v koncentracích C3-, C4- a C5-karnitinů v rámci NBS nebo SES DMP.

5 ZÁVĚR

V předložené disertační práci jsou představeny dvě nové analytické platformy pro diagnostiku DMP, které byly aplikovány v klinické praxi v LDMP, OKB FN Olomouc. Zde jsou formulovány následující dílčí závěry:

5.1 Stanovení široké škály metabolitů v moči pomocí nové LC-MS/MS metody pro diagnostiku dědičných metabolických poruch

V této práci byla vyvinuta a validována nová HILIC-MS/MS metoda pro analýzu široké škály biomarkerů souvisejících s DMP. Jedná se o diagnostickou platformu pro více než 50 DMP, která umožňuje kvantifikaci více než 60 biomarkerů v moči. Vyznačuje se jednoduchou přípravou vzorku, která je doplněna krátkou dobou analýzy a snadným diagnostickým pracovním postupem, díky čemuž je vyvinutá metoda vhodná pro klinické laboratoře zaměřené na urgentní požadavky. Klinická validace metody byla prováděna v laboratoři po dobu sedmi let na vzorcích močí od pacientů suspektních pro DMP a EHK DPT ERNDIM. Metoda byla aplikována na vzorky DBS s potenciálem optimalizace škály biomarkerů.

5.2 Rychlá a účinná LC-MS/MS metoda pro screening vybraných organických kyselin a acylkarnitinů v suché krevní skvrně

Nová LC-MS/MS metoda, která byla v LDMP, OKB FN Olomouc vyvinuta s cílem zjednodušit a zrychlit diagnostiku organických acidurií v moči, umožňuje též rychlou a účinnou analýzu vybraných organických kyselin a acylkarnitinů v DBS. Toto vyšetření je v LDMP, OKB FN Olomouc indikováno pacientům s abnormálním nálezem v NBS a SES DMP pro zvýšené C3-, C4- a C5-karnitiny. Slouží jako druhostupňová metoda, protože umožňuje rozlišit všechny isomery C4- a C5-karnitinů, což je stěžejní pro diferenciální diagnostiku DMP. V případě zvýšené koncentrace C3-karnitinu jsou pomocí nové metody analyzovány patognomické organické kyseliny spojené s elevací C3-karnitinu. Pro LC-MS/MS analýzu je používán tentýž vzorek, který byl analyzován v rámci NBS nebo SES, což značně urychluje confirmaci patologických nálezů z FIA-MS/MS.

6 VÝHLEDY

6.1 Stanovení široké škály metabolitů v moči pomocí nové LC-MS/MS metody pro diagnostiku dědičných metabolických poruch

Nová LC-MS/MS metoda by v budoucnu mohla být optimalizována také na další biologické matrice (např. plasmu) a rozšířena o další skupiny diagnosticky relevantních metabolitů, jako jsou např. meziprodukty močovinového cyklu (ornithin, citrulin, aspartát, arginin, fumarát) a fosfáty (sedoheptulosa-7-fosfát, glycerol-3-fosfát). Sedoheptulosa-7-fosfát je významným diagnostickým markerem TALDOD, zatímco elevace glycerol-3-fosfátu v moči je charakteristická pro deficit fruktosa-1,6-bisfosfatasy.

6.2 Rychlá a účinná LC-MS/MS metoda pro screening vybraných organických kyselin a acylkarnitinů v suché krevní skvrně

Nová rychlá a účinná LC-MS/MS metoda má potenciál být v budoucnu rozšířena o další diagnosticky významné markery dle požadavků ze stran lékařů. Získaná data mohou být v budoucnu pro lepší přehlednost graficky vizualizována pomocí programu GraphPad Prism nebo Cytoscape. Aktuálně je připravována publikace, která se věnuje rozšíření původně vyvinuté LC-MS/MS metody pro analýzu organických kyselin, acylkarnitinů a acylglycinů v moči na DBS.

7 SEZNAM ZKRATEK

3-KTD	deficit β -ketothiolasy
ACDB	kontrolní schéma „Acylkarnitiny v suché krevní skvrně“
ACY1D	deficit aminoacylasy
ADSLD	deficit adenylosukcinátlyasy
AICAR	aminoimidazol-4-karboxamid ribonukleotid
AICAr	aminoimidazol-4-karboxamid ribosid
AMP	adenosinmonofosfát
APRTD	deficit adeninfosforibosyltransferasy
C3 Gly	propionylglycin
C4 Gly	(iso)butyrylglycin
CAIR	karboxyaminoimidazol ribonukleotid
CDMP	Centrum dědičných metabolických poruch
CDP	cytidindifosfát
CE	kolizní energie
CMP	cytidinmonofosfát
CTP	cytidintrifosfát
CV	variační koeficient
CXP	výstupní potenciál
DBS	suchá krevní skvrna
DMP	dědičné metabolické poruchy
DMSO	dimethylsulfoxid
DP	deklasterační potenciál
DPT	kontrolní schéma „Diagnostické testování způsobilosti“
EHK	externí hodnocení kvality
EMA	Evropská agentura pro léčivé přípravky
EP	vstupní potenciál
ESI	elektrosprejová ionizace
FAICAR	5'-fosforibosyl-5-formamido-4-imidazolkarboxamid
FGAMR	N-formylglycinamidin ribonukleotid
FGAR	formylglycinamid ribonukleotid

FGAr	formylglycinamid ribosid
FIA-MS/MS	průtoková injekční analýza ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
FN	Fakultní nemocnice
GALAC1	galaktosémie typu I
GAR	N-glycinamid ribonukleotid
GAr	N-glycinamid ribosid
GC-MS	plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
GMP	guanosinmonofosfát
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HOA	hereditární orotová acidurie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HQC	kontrola kvality o vysoké koncentrační hladině
IBDD	deficit isobutyryl-CoA dehydrogenasy
IMP	inosinmonofosfát
IS	interní standard
IVA	isovalerová acidurie
LC	kapalinová chromatografie
LC-ESI-MS/MS	kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií s elektrosprejovou ionizací
LC-MS	kapalinová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
LDMP	Laboratoř dědičných metabolických poruch
LQC	kontrola kvality o nízké koncentrační hladině
<i>m/z</i>	poměr hmotnosti k náboji
MDS	močový diluent Sigmatrix
MMA	methylmalonová acidémie

MMACBL	methylnalonová acidémie včetně deficitu methylnalonyl-CoA mutasy, methylnalonyl-CoA epimerasy a kobalaminu
MQC	kontrola kvality o střední koncentrační hladině
MRM	monitorování mnohonásobných reakcí
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
NBS	novorozenecký screening
NP-HPLC	kapalinová chromatografie na normální fázi
NÚDCH	Národní ústav dětských chorob
OKB	Oddělení klinické biochemie
OMP	orotidinmonofosfát
OTCD	deficit ornithintranskarbamylasy
PA	propionová acidémie
PDNS	purinová <i>de novo</i> syntesa
PFASD	deficit fosforibosylformylglycinamidinsyntasy
PKU	fenylketonurie
PP-Cal	kalibrační standard purinů a pyrimidinů
PRA	fosforibosylamin
PRPP	fosforibosyldifosfát
QC	kontrola kvality
QqQ	trojitý kvadrupól
RP-HPLC	kapalinová chromatografie na reverzní fázi
RPLC-MS/MS	kapalinová chromatografie na reverzní fázi ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií
RS hodnota	robustně standardizovaná hodnota
S/N	poměr signálu k šumu
SA-Cal	kalibrační standard pro speciální vyšetření
S-Ado	sukcinyladenosen
SAICar	<i>N</i> -sukcinokarboxamid-5-aminoimidazol-4-ribonukleosid
SAICAR	<i>N</i> -sukcinokarboxamid-5-aminoimidazol-4-ribonukleotid
S-AMP	sukcinyladenosenmonofosfát

SBCADD	deficit 2-methylbutyryl-CoA dehydrogenasy
SES	selektivní screening
SRM	selektivní monitorování reakce
TALDOD	deficit transaldolasy
TMP	thymidinmonofosfát
UDP	uridindifosfát
UHPLC	ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie
ULOQ	nejvyšší kalibrační standard
UMP	uridinmonofosfát
UTP	uridintrifosfát
XMP	xanthosinmonofosfát

8 LITERATURA

1. Garrod AE. The Incidence of Alkaptonuria: a Study in Chemical Individuality. *Lancet*. 1902;160(4137):1616–20.
2. Arnold GL. Inborn errors of metabolism in the 21st century: past to present. *Ann Transl Med*. 2018;6(24):467–467.
3. IEMBase, <https://iembase.org/> (Navštíveno 20. 2. 2024).
4. Wertheim-Tysarowska K, Gos M, Sykut-Cegielska J, Bal J. Genetic analysis in inherited metabolic disorders--from diagnosis to treatment. Own experience, current state of knowledge and perspectives. *Dev Period Med*. 2015;19(4):413-431.
5. Pampols T. Inherited metabolic rare disease. *Adv Exp Med Biol*. 2010;686:397-431.
6. Rajappa M, Goyal A, Kaur J. Inherited metabolic disorders involving the eye: A clinico-biochemical perspective. *Eye*. 2010;24(4):507–18.
7. Ferreira CR, van Karnebeek CDM. Inborn errors of metabolism. *Handb. Clin. Neurol*. 2019, pp. 449-481.
8. Saudubray J-M, Baumgartner MR, Walter JH. Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment. 2016; Berlin, Heidelberg: Springer.
9. Jeanmonod R, Asuka E, Jeanmonod D. Inborn Errors of Metabolism. [Updated 2023 Jul 17]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459183/>
10. Ivanovova E, Pisklakova B, Dobesova D, Kvasnicka A, Friedecky D. Novel LC-MS tools for diagnosing inborn errors of metabolism. *Microchem J*. 2021;170:106654.
11. Jurecka A., Tylki-Szymanska A. Inborn errors of purine and pyrimidine metabolism: A guide to diagnosis. *Mol. genet. Metab*. 2022;136(3):164-176.
12. Farrell PMM. *Metabolic Diseases: Foundations of Clinical Management, Genetics, and Pathology*. 2017; IOS Press.
13. Balasubramaniam S, Duley JA, Christodoulou J. Inborn errors of purine metabolism: clinical update and therapies. *J. Inherit. Metab. Dis*. 2014;37(5):669-686.
14. Simmonds HA, Duley JA, Fairbanks LD, McBride MB. When to investigate

- for purine and pyrimidine disorders. Introduction and review of clinical and laboratory indications. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 1997;20(2):214–226.
15. Edvardsson VO, Sahota A, Palsson R. Adenine Phosphoribosyltransferase Deficiency. In: Literature cited. 1993; University of Washington, Seattle, Seattle (WA).
 16. Fonteh AL. Orotic aciduria. *Fidei et Veritatis: The Liberty University Journal of Graduate, Research*, 2018.
 17. Cremonesi A, Meili D, Rassi A, Poms M, Tavazzi B, Škopová V, Häberle J, Zikánová M, Hersberger M. Improved diagnostics of purine and pyrimidine metabolism disorders using LC-MS/MS and its clinical application. *Clin Chem Lab Med*. 2023;61(10):1792-1801.
 18. Ito T, van Kuilenburg ABP, Bootsma AH, Haasnoot AJ, van Cruchten A, Wada Y, van Gennip AH. Rapid screening of high-risk patients for disorders of purine and pyrimidine metabolism using HPLC-electrospray tandem mass spectrometry of liquid urine or urine-soaked filter paper strips. *Clin. Chem*. 2000;46(4):445–452.
 19. van Lenthe H, van Kuilenburg ABP, Ito T, Bootsma AH, van Cruchten A, Wada Y, van Gennip AH. Defects in pyrimidine degradation identified by HPLC--electrospray tandem mass spectrometry of urine specimens or urine-soaked filter paper strips. *Clin. Chem*. 2000,46(12):1916-1922.
 20. Schmidt C, Hofmann U, Kohlmüller D, Mürdter T, Zanger UM, Schwab M, Hoffmann GF. Comprehensive analysis of pyrimidine metabolism in 450 children with unspecific neurological symptoms using high-pressure liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Inherited Metabolic Disease*. 2005;28(6):1109-1122.
 21. Hartmann S, Okun JG, Schmidt C, Langhans C-D, Garbade SF, Burgard P, Haas D, Sass JO, Nyhan WL, Hoffmann GF. Comprehensive detection of disorders of purine and pyrimidine metabolism by HPLC with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin. Chem*. 2006;52(6):1127–1137.
 22. la Marca G, Casetta B, Malvagìa S, Pasquini E, Innocenti M, Donati MA, Zammarchi E. Implementing tandem mass spectrometry as a routine tool for characterizing the complete purine and pyrimidine metabolic profile in urine samples. *J. Mass*

- Spectrom. 2006;41(11):1442–1452.
23. Monostori P, Klinke G, Hauke J, Richter S, Bierau J, Garbade SF, Hoffmann GF, Langhans C-D, Haas D, Okun JG. Extended diagnosis of purine and pyrimidine disorders from urine: LC MS/MS assay development and clinical validation. *PLoS One*. 2019;14,e0212458.
 24. Krijt M, Souckova O, Baresova V, Skopova V, Zikanova M. Metabolic Tools for Identification of New Mutations of Enzymes Engaged in Purine Synthesis Leading to Neurological Impairment. *Folia Biol*. 2019;65:152–157.
 25. Pelet A, Skopova V, Steuerwald U, Baresova V, Zarhrate M, Plaza JM, Hnizda A, Krijt M, Souckova O, Wibrand F, Andorsdóttir G, Joensen F, Sedlak D, Bleyer AJ, Kmoch S, Lyonnet S, Zikanova M. PAICS deficiency, a new defect of de novo purine synthesis resulting in multiple congenital anomalies and fatal outcome. *Hum Mol Genet*. 2019;28(22):3805-3814.
 26. Kölker S, Baumgartner MR. Organic acidurias: Ingredients for precision medicine. *J Inher Metab Dis*. 2023;46(3):369-370.
 27. Garg U, Smith LD. Biomarkers in inborn errors of metabolism: clinical aspects and laboratory determination. 2017; Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
 28. Wajner M. Neurological manifestations of organic acidurias. *Nat Rev Neurol*. 2019;15(5):253-271.
 29. Hobert JA, Liu A, Pasquali M. Acylglycine Analysis by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). *Curr Protoc Hum Genet*. 2016;91:17.25.1-17.25.12.
 30. Tanaka K, Budd MA, Efron ML, Isselbacher KJ. Isovaleric acidemia: a new genetic defect of leucine metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1966;56(1):236-42.
 31. Goodman, SI, Markey, SP. Diagnosis of organic acidemias by gas chromatography-mass spectrometry. *Lab Res Methods Biol Med* 1981;6:1–158.
 32. Nakagawa, K, Kawana, S, Hasegawa, Y, Yamaguchi, S. Simplified method for the chemical diagnosis of organic aciduria using GC/MS. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2010;878:942–8.
 33. Pasikanti KK, Ho PC, Chan EC. Development and validation of a gas chromatography/mass spectrometry metabonomic platform for the global profiling of urinary metabolites. *Rapid Commun Mass Spectrom*.

- 2008;22(19):2984-92.
34. Awad H, Allen KJH, Adamko DJ, El-Aneed A. Development of a new quantification method for organic acids in urine as potential biomarkers for respiratory illness. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* 2019;1122–1123:29–38.
 35. Zheng J, Zhang L, Johnson M, Mandal R, Wishart DS. Comprehensive targeted metabolomic assay for urine analysis. *Anal Chem* 2020;92: 10627–34.
 36. Ueyanagi Y, Setoyama D, Kawakami D, Mushimoto Y, Matsumoto S, Hotta T, et al. Fully automated quantitative measurement of serum organic acids via LC-MS/MS for the diagnosis of organic acidemias: establishment of an automation system and a proof-of-concept validation. *Diagnostics* 2021;11:2195.
 37. Körver-Keularts IMLW, Wang P, Waterval HWAH, Kluijtmans LAJ, Wevers RA, Langhans C-D, et al. Fast and accurate quantitative organic acid analysis with LC-QTOF/MS facilitates screening of patients for inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 2018;41: 415–24.
 38. Jiang Y, Almannai M, Sutton VR, Sun Q, Elsea SH. Quantitation of phenylbutyrate metabolites by UPLC-MS/MS demonstrates inverse correlation of phenylacetate:phenylacetylglutamine ratio with plasma glutamine levels. *Mol Genet Metabol* 2017;122:39–45.
 39. Jin L, Liu Z, Zeng J, Zhao H, Zhang J, Zhu B, et al. A simple method for rapid screening and diagnosis of common organic acidemias: quantitative detection of serum and urine organic acid profiles based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2022;414:7823–37.
 40. Yang W, Wang Y, Zhou Q, Tang H. Analysis of human urine metabolites using SPE and NMR spectroscopy. *Sci China Ser B Chem* 2008;51: 218–25.
 41. Shaykhutdinov RA, MacInnis GD, Dowlatabadi R, Weljie AM, Vogel HJ. Quantitative analysis of metabolite concentrations in human urine samples using $^{13}\text{C}\{^1\text{H}\}$ NMR spectroscopy. *Metabolomics* 2009;5: 307–17.
 42. Zivak Technologies - PALLPRODUCT - 73 Organic Acids LC-MS/MS analysis kit, (n.d.). <http://www.zivak.com/product-detail/36/73-organic-acids-lc-msms-analysis-kit> (Navštíveno 26. 5. 2021).
 43. Organic Acids-JASEM, 2017. <https://jasem.com.tr/en/products/metabolic-disorders/organic-acids/> (Navštíveno 25. 5. 2021).

44. I.B. Fritz, Carnitine and its role in fatty acid metabolism, *Adv. Lipid Res.* 1963;285–334.
45. Costa CG, Guérand WS, Struys EA, Holwerda U, ten Brink HJ, Tavares de Almeida I, Duran M, Jakobs C. Quantitative analysis of urinary acylglycines for the diagnosis of beta-oxidation defects using GC-NCI-MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2000;21(6):1215-24.
46. Hobert JA, Liu A, Pasquali M. Acylglycine Analysis by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). *Curr Protoc Hum Genet.* 2016;91:17.25.1-17.25.12.
47. Maeda Y, Ito T, Suzuki A, Kurono Y, Ueta A, Yokoi K, Sumi S, Togari H, Sugiyama N. Simultaneous quantification of acylcarnitine isomers containing dicarboxylic acylcarnitines in human serum and urine by high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2007;21(5):799-806.
48. Peng M, Fang X, Huang Y, Cai Y, Liang C, Lin R, Liu L. Separation and identification of underivatized plasma acylcarnitine isomers using liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the differential diagnosis of organic acidemias and fatty acid oxidation defects. *J Chromatogr A.* 2013;1319:97-106.
49. Minkler PE, Stoll MS, Ingalls ST, Kerner J, Hoppel CL. Validated method for the quantification of free and total carnitine, butyrobetaine, and acylcarnitines in biological samples. *Anal Chem.* 2015;87(17):8994-9001.
50. Minkler PE, Stoll MSK, Ingalls ST, Hoppel CL. Selective and accurate C5 acylcarnitine quantitation by UHPLC-MS/MS: Distinguishing true isovaleric acidemia from pivalate derived interference. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2017;1061-1062:128-133.
51. Lewis-Stanislaus AE, Li L. A method for comprehensive analysis of urinary acylglycines by using ultra-performance liquid chromatography quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2010;21(12):2105-16.
52. Fong BM, Tam S, Leung KS. Quantification of acylglycines in human urine by HPLC electrospray ionization-tandem mass spectrometry and the establishment of pediatric reference interval in local Chinese. *Talanta.* 2012;88:193-200.

53. Fisher L, Davies C, Al-Dirbashi OY, Ten Brink HJ, Chakraborty P, Lepage N. A novel method for quantitation of acylglycines in human dried blood spots by UPLC-tandem mass spectrometry. *Clin Biochem.* 2018;54:131-138.
54. Stanislaus A, Guo K, Li L. Development of an isotope labeling ultra-high performance liquid chromatography mass spectrometric method for quantification of acylglycines in human urine. *Anal Chim Acta.* 2012;750:161-72.
55. Skoog DA, West DM, Holler FJ, Crouch S. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 10th ed. 2022. Cengage.
56. Nováková L, Svoboda P, Pavlík J. *Ultra-High performance liquid chromatography. Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation: 2nd ed.* 2017. Elsevier.
57. Xu QA. *Ultra-High Performance Liquid Chromatography and its Applications.* 2013. John Wiley & Sons, Inc.
58. Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Principles of instrumental analysis*, 5th ed. 1998. Harcourt College Publishers, Orlando, USA.
59. Nováková L, Douša M. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.* 2013. Vydavatel Lucie Nováková, Michal Douša, Praha.
60. Schellinger AP, Carr PW. Isocratic and gradient elution chromatography: a comparison in terms of speed, retention reproducibility and quantitation. *J Chromatogr A.* 2006;1109(2):253-66.
61. Žuvela P, Skoczylas M, Jay Liu J, Ba Czek T, Kaliszan R, Wong MW, Buszewski B, Héberger K. Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chem Rev.* 2019;119(6):3674-3729.
62. Majors RE. Current Trends in HPLC Column Usage. *LCGC North Am.* 2007;25:532-544.
63. Majors RE. Twenty-Five Years of HPLC Column Development—A Commercial Perspective. *LCGC North Am.* 2015;33:20-27.
64. Dehouck P, Visky D, Vander Heyden Y, Adams E, Kovács Z, Noszál B, Massart DL, Hoogmartens J. Characterisation of Reversed-Phase Liquid-Chromatographic Columns by Chromatographic Tests: Comparing Column Classification Based on Chromatographic Parameters and Column Performance for the Separation

- of Acetylsalicylic Acid and Related Compounds. *J. Chromatogr. A.* 2004;1025:189-200.
65. Žuvela P, Liu JJ, Plenis A, Bączek T. Assessment of column selection systems using Partial Least Squares. *J Chromatogr A.* 2015;1420:74-82.
 66. Snyder LR, Carr PW, Dolan JW, Majors RE. New Horizons in Reversed-Phase Chromatography Selectivity. *LCGC Eur.* 2010;28:418-430.
 67. Jandera P, Janás P. Recent advances in stationary phases and understanding of retention in hydrophilic interaction chromatography. A review. *Anal Chim Acta.* 2017;967:12-32.
 68. Buszewski B, Noga S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)—a powerful separation technique. *Anal Bioanal Chem.* 2012;402(1):231-47.
 69. Noriega P, Gortaire G, Osorio EH. Mass Spectrometry and Its Importance for the Analysis and Discovery of Active Molecules in Natural Products. *Pharmacognosy - Medicinal Plants.* 2021, Intenchopen.
 70. Friedecký D, Lemr K. Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klin. Biochem. Metab.* 2012;20(41):152-157.
 71. Prabhu GRD, Williams ER, Wilm M, Urban PL. Mass spectrometry using electrospray ionization. *Nat Rev Methods Primers.* 2023;3(23).
 72. da Silva Bezerra K. Perspective Chapter: High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry – The Advance in Chemical Analysis. 2023, IntechOpen.
 73. Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the information beyond the molecular weight of the analyte. *Int J Anal Chem.* 2012;2012:282574.
 74. Ho CS, Lam CW, Chan MH, Cheung RC, Law LK, Lit LC, Ng KF, Suen MW, Tai HL. Electrospray ionisation mass spectrometry: principles and clinical applications. *Clin Biochem Rev.* 2003;24(1):3-12.
 75. Liigand P, Kaupmees K, Haav K, Liigand J, Leito I, Girod M, Antoine R, Kruve A. Think Negative: Finding the Best Electrospray Ionization/MS Mode for Your Analyte. *Analytical Chemistry.* 2017;89(11):5665-5668.
 76. Haag AM. Mass Analyzers and Mass Spectrometers. In: Mirzaei, H., Carrasco, M. (eds) *Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical*

- Applications. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 2016; 919, Springer, Cham.
77. Olshina MA, Sharon M. Mass Spectrometry: A Technique of Many Faces. *Q Rev Biophys*. 2016;49:e18.
 78. Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*. 2006;312(5771):212-7.
 79. De Hoffmann E, Stroobant V. *Mass spectrometry: principles and applications*, 3rd ed. 2007, John Wiley and Sons Ltd, Chichester.
 80. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev*. 2009;30(1):19-34.
 81. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science*. 1989;246(4926):64-71.
 82. Cadamuro J, Simundic AM. The preanalytical phase - from an instrument-centred to a patient-centred laboratory medicine. *Clin Chem Lab Med*. 2022 Nov 4;61(5):732-740.
 83. Thomas SN, French D, Jannetto PJ, Rappold BA, Clarke WA. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for clinical diagnostics. *Nat Rev Methods Primers*. 2022;2(1):96.
 84. Gross JH. *Mass spectrometry: a textbook*. 2017. Springer, Cham.
 85. Mádrová L, Součková O, Brumarová R, Dobešová D, Václavík J, Kouřil Š, de Sousa J, Friedecká J, Friedecký D, Barešová V, Zikánová M, Adam T. Combined Targeted and Untargeted Profiling of HeLa Cells Deficient in Purine De Novo Synthesis. *Metabolites*. 2022;12(3):241.
 86. Karlíková R, Mičová K, Najdekr L, Gardlo A, Adam T, Majerová P, Friedecký D, Kováč A. Metabolic status of CSF distinguishes rats with tauopathy from controls. *Alzheimers Res Ther*. 2017;9(1):78.
 87. Puris E, Kouril S, Najdekr L, Auriola S, Loppi S, Korhonen P, Gomez-Budia M, Fricker G, Kanninen KM, Malm T, Friedecký D, Gynther M. Metabolomic, lipidomic and proteomic characterisation of lipopolysaccharide-induced inflammation mouse model. *Neuroscience*. 2022;496:165–178.
 88. Cífková E, Brumarová R, Ovčáčíková M, Dobešová D, Mičová K, Kvasnička A, Vaňková Z, Šiller J, Sákra L, Friedecký D, Holčapek M. Lipidomic and metabolomic

- analysis reveals changes in biochemical pathways for non-small cell lung cancer tissues. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*. 2022;1867(2):159082.
89. Ivanovová E, Pisklákova B, Dobešová D, Janečková H, Folténová H, Kvasnička A, Prídavok M, Bouchalová K, de Sousa J, Friedecký D. Wide metabolite coverage LC-MS/MS assay for the diagnosis of inherited metabolic disorders in urine. *Talanta*. 2024;271:125699.
 90. Bajad SU, Lu W, Kimball EH, Yuan J, Peterson C, Rabinowitz JD. Separation and quantitation of water soluble cellular metabolites by hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2006;1125(1):76-88.
 91. Yuan M, Breitkopf SB, Yang X, Asara JM. A positive/negative ion-switching, targeted mass spectrometry-based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue. *Nat Protoc*. 2012;7(5):872-81.
 92. Gika HG, Theodoridis GA, Vrhovsek U, Mattivi F. Quantitative profiling of polar primary metabolites using hydrophilic interaction ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2012;1259:121-7.
 93. Virgiliou C, Gika HG, Theodoridis GA. HILIC-MS/MS Multi-Targeted Method for Metabolomics Applications. *Methods Mol Biol*. 2018;1738:65-81.
 94. EMA, Bioanalytical Method Validation, European Medicines Agency, 2018. <https://www.ema.europa.eu/en/bioanalytical-method-validation>. (Navštíveno 4. 2. 2022).
 95. Wishart DS, Guo A, Oler E, Wang F, Anjum A, Peters H, Dizon R, Sayeeda Z, Tian S, Lee BL, Berjanskii M, Mah R, Yamamoto M, Jovel J, Torres-Calzada C, Hiebert-Giesbrecht M, Lui VW, Varshavi D, Varshavi D, Allen D, Arndt D, Khetarpal N, Sivakumaran A, Harford K, Sanford S, Yee K, Cao X, Budinski Z, Liigand J, Zhang L, Zheng J, Mandal R, Karu N, Dambrova M, Schiöth HB, Greiner R, Gautam V. HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. *Nucleic Acids Res*. 2022;50(D1):D622-D631.
 96. Metagene n.d., <https://www.metagene.de/index.html> (Navštíveno 4. 2. 2022).
 97. Swallow WH, Kianifard F. Using Robust Scale Estimates in Detecting Multiple Outliers in Linear Regression. *Biometrics*. 1996;52(2):545–556.
 98. Dey A. Complete guide to feature scaling [Online],

<https://kaggle.com/code/aimack/complete-guide-to-feature-scaling> (Navštíveno 14. 3. 2023).

99. Amberger JS, Bocchini CA, Schiettecatte F, Scott AF, Hamosh A. OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Database issue):D789-98.
100. Ferreira CR, van Karnebeek CDM, Vockley J, Blau N. A proposed nosology of inborn errors of metabolism. *Genet Med.* 2019;21(1):102-106.
101. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13(11):2498-504.
102. Zheng J, Zhang L, Johnson M, Mandal R, Wishart DS. Comprehensive Targeted Metabolomic Assay for Urine Analysis. *Anal Chem.* 2020;92(15):10627-10634.
103. Sass JO, Vaithilingam J, Gemperle-Britschgi C, Delnooz CC, Kluijtmans LA, van de Warrenburg BP, Wevers RA. Expanding the phenotype in aminoacylase 1 (ACY1) deficiency: characterization of the molecular defect in a 63-year-old woman with generalized dystonia. *Metab Brain Dis.* 2016;31(3):587-92.
104. Wamelink MM, Smith DE, Jansen EE, Verhoeven NM, Struys EA, Jakobs C. Detection of transaldolase deficiency by quantification of novel seven-carbon chain carbohydrate biomarkers in urine. *J Inher Metab Dis.* 2007;30(5):735-42.
105. Grunebaum E, Campbell N, Leon-Ponte M, Xu X, Chapdelaine H. Partial Purine Nucleoside Phosphorylase Deficiency Helps Determine Minimal Activity Required for Immune and Neurological Development. *Front Immunol.* 2020;11:1257.
106. Takano Y, Hase-Aoki K, Horiuchi H, Zhao L, Kasahara Y, Kondo S, Becker MA. Selectivity of febuxostat, a novel non-purine inhibitor of xanthine oxidase/xanthine dehydrogenase. *Life Sciences.* 2005;76(16):1835-1847.
107. Lung J, Sathappan S, Sabir I, Maier R. Ornithine Transcarbamylase Deficiency Presenting as Acute Encephalopathy After Strabismus Surgery. *Cureus.* 2022;14(7):e26667.
108. Pisklákóvá B, Friedecká J, Ivanovová E, Hlídková E, Bekárek V, Prídavok M, Kvasnička A, Adam T, Friedecký D. Rapid and efficient LC-MS/MS diagnosis of inherited metabolic disorders: a semi-automated workflow for analysis

- of organic acids, acylglycines, and acylcarnitines in urine. *Clin Chem Lab Med*. 2023;61(11):2017-2027.
109. Gelb MH, Basheeruddin K, Burlina A, Chen HJ, Chien YH, Dizikes G, Dorley C, Giugliani R, Hietala A, Hong X, Kao SM, Khaledi H, Klug T, Kubaski F, Liao HC, Martin M, Manning A, Orsini J, Peng Y, Ranieri E, Rohrwasser A, Szabo-Fresnais N, Turgeon CT, Vaz FM, Wang LY, Matern D. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry in Newborn Screening Laboratories. *Int J Neonatal Screen*. 2022;8(4):62.
 110. Monostori P, Klinke G, Richter S, Baráth Á, Fingerhut R, Baumgartner MR, Kölker S, Hoffmann GF, Gramer G, Okun JG. Simultaneous determination of 3-hydroxypropionic acid, methylmalonic acid and methylcitric acid in dried blood spots: Second-tier LC-MS/MS assay for newborn screening of propionic acidemia, methylmalonic acidemias and combined remethylation disorders. *PLoS One*. 2017;12(9):e0184897.
 111. Sadat R, Hall PL, Wittenauer AL, Vengoechea ED, Park K, Hagar AF, Singh R, Moore RH, Gambello MJ. Increased parental anxiety and a benign clinical course: Infants identified with short-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency and isobutyryl-CoA dehydrogenase deficiency through newborn screening in Georgia. *Mol Genet Metab*. 2020;129(1):20-25.
 112. Janzen N, Steuerwald U, Sander S, Terhardt M, Peter M, Sander J. UPLC-MS/MS analysis of C5-acylcarnitines in dried blood spots. *Clin Chim Acta*. 2013;421:41-5.
 113. Garcia A, Barbas C. Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)-based metabolomics. *Methods Mol Biol*. 2011;708:191-204.
 114. Haynes CA, De Jesús VR. Simultaneous quantitation of hexacosanoyl lysophosphatidylcholine, amino acids, acylcarnitines, and succinylacetone during FIA-ESI-MS/MS analysis of dried blood spot extracts for newborn screening. *Clin Biochem*. 2016;49(1-2):161-5.
 115. Fingerhut R. Recall rate and positive predictive value of MSUD screening is not influenced by hydroxyproline. *Eur J Pediatr*. 2009;168(5):599-604.
 116. Staufner C, Haack TB, Feyh P, Gramer G, Raga DE, Terrile C, Sauer S, Okun JG, Fang-Hoffmann J, Mayatepek E, Prokisch H, Hoffmann GF, Kölker S. Genetic cause and prevalence of hydroxyprolinemia. *J Inherit Metab Dis*. 2016;39(5):625-632.

117. Brass EP. Pivalate-generating prodrugs and carnitine homeostasis in man. *Pharmacol Rev.* 2002;54(4):589-98.
118. Boemer F, Schoos R, de Halleux V, Kalenga M, Debray FG. Surprising causes of C5-carnitine false positive results in newborn screening. *Mol Genet Metab.* 2014;111(1):52-4.
119. Kobayashi H, Fukuda S, Yamada K, Hasegawa Y, Takahashi T, Purevsuren J, Yamaguchi S. Clinical Features of Carnitine Deficiency Secondary to Pivalate-Conjugated Antibiotic Therapy. *J Pediatr.* 2016 Jun;173:183-7.
120. Murko S, Aseman AD, Reinhardt F, Gramer G, Okun JG, Mütze U, Santer R. Neonatal screening for isovaleric aciduria: Reducing the increasingly high false-positive rate in Germany. *JIMD Rep.* 2022;64(1):114-120.
121. Todesco L, Bodmer M, Vonwil K, Häussinger D, Krähenbühl S. Interaction between pivaloylcarnitine and L-carnitine transport into L6 cells overexpressing hOCTN2. *Chem Biol Interact.* 2009 Aug 14;180(3):472-7.

9 SEZNAM PRACÍ

9.1 Publikace s IF vztahující se k disertaci

- Původní vědecké publikace *in extenso* v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF:
 - **Ivanovová E**, Pisklákova B, Dobešová D, Janečková H, Folténová H, Kvasnička A, Prídavok M, Bouchalová K, de Sousa J, Friedecký D. Wide metabolite coverage LC-MS/MS assay for the diagnosis of inherited metabolic disorders in urine. *Talanta*. 2024 May 1;271:125699. (IF 6,100)
 - Pisklákova B, Friedecká J, **Ivanovová E**, Hlídková E, Bekárek V, Prídavok M, Kvasnička A, Adam T, Friedecký D. Rapid and efficient LC-MS/MS diagnosis of inherited metabolic disorders: a semi-automated workflow for analysis of organic acids, acylglycines, and acylcarnitines in urine. *Clin Chem Lab Med*. 2023 May 19;61(11):2017-2027. (IF = 6,800)
- Přehledné/souborné vědecké práce v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF:
 - **Ivanovová E**, Pisklákova B, Dobešová D, Kvasnička A, Friedecký D. Novel LC-MS tools for diagnosing inborn errors of metabolism. *Microchem Journal*. 2021 Nov;170:106654. (IF = 5,304)

9.2 Ostatní publikace s IF

- Původní vědecké publikace *in extenso* v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF:
 - **Ivanovová E**, Pisklákova B, Friedecká J, Krystyník O, Friedecký D, Karásek D. Plasma Short-Chain Fatty Acids and Their Derivatives in Women with Gestational *Diabetes Mellitus*. *Separations*. 2021;8(10):188. (IF = 3,344)
 - Úlehlová J, Pisklákova B, **Ivanovová E**, Procházková J, Bradáčová P, Kvasnička A, Friedecký D, Slavík L. Evaluation of the Determination of Dabigatran, Rivaroxaban, and Apixaban in Lupus Anticoagulant-Positive Patients. *Diagnostics (Basel)*. 2021 Nov 2;11(11):2027. (IF = 3,992)

- Vavreckova M, Galanova N, Kostovcik M, Krystynik O, **Ivanovova E**, Roubalova R, Jiraskova Zakostelska Z, Friedecky D, Friedecká J, Haluzik M, Karasek D, Kostovcikova K. Specific gut bacterial and fungal microbiota pattern in the first half of pregnancy is linked to the development of gestational *diabetes mellitus* in the cohort including obese women. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 Sep 5;13:970825. (IF = 5,200)
- Přehledné/souborné vědecké práce v daném oboru uveřejněné v časopisech s IF:
 - Kvasnička A, Najdekr L, Dobešová D, Pisklákova B, **Ivanovová E**, Friedecký D. Clinical lipidomics in the era of the big data. *Clin Chem Lab Med*. 2023 Jan 4;61(4):587-598. (IF = 6,800)

9.3 Příspěvky na konferencích vztahující se k disertaci

- **Ivanovová E**, Pisklákova B, Hlídková E, Bekárek V, Friedecký D. Vývoj a validace LC/MS metody pro diagnostiku vybraných dědičných metabolických poruch. 22. ročník Školy hmotnostní spektrometrie 2021, Srní, Česká republika, 5.–10. 9. 2021, Sborník 22. ročník Školy hmotnostní spektrometrie, Seznam plakátových sdělení (12), ISBN 978-80-88195-25-2.
- **Ivanovová E**, Pisklákova B, Hlídková E, Bekárek V, Friedecký D. Development of an LC-MS/MS method for diagnosis of selected inherited metabolic disorders. Ninth Annual Conference of the Czech Society for Mass Spectrometry, Prague, Czech Republic, 11.–12. 10. 2021, Book of Abstracts, p. 55, ISBN 978-80-907478-0-7.
- **Ivanovová E**, Pisklákova B, Hlídková E, Bekárek V, Friedecký D. HILIC-MS/MS as a diagnostic tool for inherited metabolic disorders. OL4PERMED (Olomouc for Personalized Medicine) 2021, Olomouc, Czech Republic, 25.–27. 10. 2021, Abstract Book, p. 49, ISBN 978-80-908348-0-4.
- **Ivanovová E**, Pisklákova B, Hlídková E, Bekárek V, Kotková M, Friedecký D. Diagnostika dědičných metabolických poruch pomocí multikomponentní

LC-MS/MS. 35. Pracovní dny Dědičné metabolické poruchy, Tatranská Lomnica, Slovensko, 9.–10. 6. 2022, Odborný program a abstrakty, str. 21, ISBN 978-80-89858-25-5.

- **Ivanovová E**, Pisklákova B, Hlídková E, Bekárek V, Kotková M, Prídavok M, Friedecký D. Urinary HILIC-MS/MS-based targeted metabolomics enables clinical diagnosis of 50+ inherited metabolic disorders. 18th Annual Conference of the Metabolomics Society (Metabolomics 2022), Valencia, Spain, 19.–23. 6. 2022, Oral and Poster Abstracts, p. 163.

9.4 Ostatní příspěvky na konferencích

- **Ivanovová E**, Pisklákova B, Friedecká J, Krystyník O, Friedecký D, Karásek D. LC-MS/MS analýza mastných kyselin s krátkým řetězcem a jejich derivátů v plasmě žen s gestačním *diabetes mellitus*. 23. ročník Školy hmotnostní spektrometrie 2022, Milovy, Česká republika, 5.–9. 9. 2022, Sborník 23. ročník Školy hmotnostní spektrometrie, Seznam plakátových sdělení (7), ISBN 978-80-88195-32-0.
- **Ivanovová E**, Pisklákova B, Friedecká J, Krystyník O, Friedecký D, Karásek D. LC-MS/MS analysis of short-chain fatty acids and their derivatives in the plasma of women with gestational *diabetes mellitus*. 16th Central and Eastern European Proteomic Conference, 8th Informal Proteomic Meeting and 10th Annual Conference of the Czech Society for Mass Spectrometry, Prague, Czech Republic, 29. 9.–1. 10. 2022, Book of Abstracts, p. 59, ISBN 978-80-907478-1-4.
- **Ivanovová E**, Hlídková E, Bekárek V, Kotková M, Friedecký D. Rychlé a spolehlivé rozlišení galaktitolu od mannitolu a sorbitolu pomocí LC-MS/MS metody aplikované do klinické praxe pro diagnostiku galaktosémií a dalších poruch metabolismu sacharidů. 36. Pracovní dny Dědičné metabolické poruchy, Znojmo, Česká republika, 3.–5. 5. 2023, Odborný program a abstrakty, str. 40, ISBN 978-80-7471-449-8.

- **Ivanovová E**, Hlídková E, Bekárek V, Kotková M, Friedecký D. Rychlé a spolehlivé rozlišení galaktitolu od mannitolu a sorbitolu pomocí LC-MS/MS metody aplikované do klinické praxe pro diagnostiku galaktosémie a dalších poruch metabolismu sacharidů. 24. ročník Školy hmotnostní spektrometrie 2023, Milovy, Česká republika, 11.–15. 9. 2023, Sborník 24. ročník Školy hmotnostní spektrometrie, Seznam plakátových sdělení (13), ISBN 978-80-88195-44-3.
- **Ivanovová E**, Hlídková E, Bekárek V, Janečková H, Friedecký D. Detailní LC-MS/MS analýza cukrů a jejich alditolů pro diagnostiku dědičných metabolických poruch. 8. Česká lipidomická a metabolická konference, Olomouc, Česká republika, 16.–17. 5. 2024, Program a sborník abstrakt.
- **Ivanovová E**, Hlídková E, Bekárek V, Janečková H, Peřinová J, Semeniuk T, Tkačík O, Smolka V, Friedecký D. Diagnostika deficitu isobutyryl-CoA dehydrogenasy a deficitu 2-methylbutyryl-CoA dehydrogenasy z krevní skvrny: Rozlišení C4 a C5 acylkarnitinů pomocí LC-MS/MS metody. 37. Pracovní dny Dědičné metabolické poruchy, Liptovská Osada, Slovensko, 22.–24. 5. 2024, Odborný program a abstrakty, str. 30, ISBN 978-80-89858-30-9.
- **Ivanovová E**, Hlídková E, Bekárek V, Janečková H, Friedecký D. Detailed LC-MS/MS analysis of sugars and their alditols for diagnosis of inherited metabolic disorders. Advances in chromatography and electrophoresis & Chiranal 2024, Olomouc, Czech republic, 17.–20. 6. 2024, Book of abstracts and program, p. 93, ISBN 978-80-244-6478-7.

10 PŘÍLOHY

10.1 Příloha 1: Detailní charakteristika vzorků pacientů s DMP

Pacient	OMIM	Původ vzorku
Deficit 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyasy (HMGCLD) - DPT-2014-D	246450	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
3-Methylkrotonylglycinurie (MCC1D) - DPT-2021-C	210200	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
3-Methylkrotonylglycinurie (MCC1D) - Pacient 11	210200	CDMP, NÚDCH, Bratislava, SK*
Deficit adeninfosforibosyltransferasy (APRTD) - DPT-2019-A	614723	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Deficit adenylosukcinátlyasy (ADSLD) - DPT-2020-E	103050	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Léčba allopurinolem - Pacient 4	-	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Deficit aminoacylasy (ACY1D) - DPT-2010-A	609924	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Deficit aminoacylasy (ACY1D) - DPT-2022-F	609924	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Deficit aminoacylasy (ACY1D) - Pacient 2	609924	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Deficit aminoacylasy (ACY1D) - Pacient 12	609924	CDMP, NÚDCH, Bratislava, SK*
Deficit aminoacylasy (ACY1D) - Pacient 21	609924	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Deficit aminoacylasy (ACY1D) - Pacient 22	609924	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Argininosukcinátová acidurie (ASLD) - DPT-2011-E	207900	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Argininosukcinátová acidurie (ASLD) - DPT-2015-A	207900	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Argininosukcinátová acidurie (ASLD) - DPT-2022-E	207900	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Canavanova choroba (ASPAD) - DPT-2018-C	271900	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Canavanova choroba (ASPAD) - DPT-2020-D	271900	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Canavanova choroba (ASPAD) - Pacient 13	271900	CDMP, NÚDCH, Bratislava, SK*
Citrulinémie typu I (CTLN1) - DPT-2017-A	215700	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Deficit dihydropyrimidindehydrogenasy (DPDD) - DPT-2018-A	274270	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR

Pacient	OMIM	Původ vzorku
Galaktosémie typu I, Duarteho varianta (GALAC1) - Pacient 1	230400	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Galaktosémie typu I (GALAC1) - Pacient 6	230400	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Galaktosémie typu I (GALAC1) - Pacient 14	230400	CDMP, NÚDCH, Bratislava, SK*
Glutarová acidurie typu I (GA1) - DPT-2018-D	231670	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Glutarová acidurie typu I (GA1) - Pacient 5	231670	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Glykogenosa typu II (GSD2) - Pacient 7	232300	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Deficit guanidinoacetátmethyltransferasy (CCDS2) - DPT-2011-F	612736	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Deficit guanidinoacetátmethyltransferasy (CCDS2) - Pacient 15	612736	CDMP, NÚDCH, Bratislava, SK*
HHH syndrom (HHHS) - DPT-2014-E	238970	CDMP, NÚDCH, Bratislava, SK*
HHH syndrom (HHHS) - DPT-2019-F	238970	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Isovalerová acidurie (IVA) - DPT-2016-D	243500	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Isovalerová acidurie (IVA) - Pacient 3	243500	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Isovalerová acidurie (IVA) - Pacient 16	243500	CDMP, NÚDCH, Bratislava, SK*
Intolerance bílkovin s lysinurií (LPI) - DPT-2013-D	222700	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (MCADD) - DPT-2017-D	201450	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (MCADD) - Pacient 17	201450	CDMP, NÚDCH, Bratislava, SK*
Methylmalonová acidurie (MMA) - DPT-2010-C	251000	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Methylmalonová acidurie (MMA) - Pacient 10	251000	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Methylmalonová acidurie (MMA) - Pacient 18	251000	CDMP, NÚDCH, Bratislava, SK*
Mitochondriální neurogastrointestinální encefalomyopatie (MNGIE) - DPT-2013-A	603041	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Mitochondriální neurogastrointestinální encefalomyopatie (MNGIE) - DPT-2016-B	603041	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Deficit ornithintranskarbamylasy (OTCD) - Pacient 9, heterozygot	311250	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Hereditární orotová acidurie (HOA) - Pacient 8	258900	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR

Pacient	OMIM	Původ vzorku
Propionová acidurie (PA) - DPT-2015-F	606054	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Deficit β -ketothiolasy (3-KTD) - Pacient 19	203750	CDMP, NÚDCH, Bratislava, SK*
Xanthinurie typu I (XAN1) - DPT-2010-B	278300	LDMP, OKB FN Olomouc, ČR
Xanthinurie typu I (XAN1) - Pacient 20	278300	CDMP, NÚDCH, Bratislava, SK*

* Centrum dědičných metabolických poruch (CDMP), Národní ústav dětských chorob (NÚDCH), Bratislava, Slovensko

10.2 Příloha 2: Pracovní rozsah kalibrační křivky a nominální koncentrace

QC vzorků

Analyt	Pracovní rozsah (μmol/l)	LQC (μmol/l)	MQC (μmol/l)	HQC (μmol/l)
2-Deoxyadenosin	0,04–20	1	5	15
2-Deoxyguanosin	0,04–20	1	5	15
2-Deoxyinosin	0,04–20	1	5	15
2-Deoxyuridin	0,04–20	1	5	15
2,8-Dihydroxyadenin ^x	0,04–20	1	5	15
Adenin	0,04–20	1	5	15
Adenosin ^x	0,04–20	1	5	15
AICAr	0,04–20	1	5	15
Dihydrothymidin	0,08–40	2	10	30
Dihydrouracil	0,20–100	5	25	75
Guanosin	0,04–20	1	5	15
Hypoxanthin	0,27–140	7	35	105
Inosin ^x	0,04–20	1	5	15
Kyselina orotová	0,12–60	3	15	45
Orotidin	0,04–20	1	5	15
SAICAr ^x	0,04–20	1	5	15
Sukcinyladenosin	0,04–20	1	5	15
Thymidin	0,04–20	1	5	15
Thymin	0,04–20	1	5	15
Uracil ^x	0,12–60	3	15	45
Kyselina močová ^x	3,91–2000	100	500	1500
Uridin	0,04–20	1	5	15
Xanthin	0,39–200	10	50	150
<i>N</i> -Acetylasparagová kyselina	0,16–80	4	20	60
<i>N</i> -Acetylglutamin	0,20–100	5	25	75
<i>N</i> -Acetylleucin	0,04–20	1	5	15
<i>N</i> -Acetylserin	0,12–60	3	15	45
<i>N</i> -Acetylvalin	0,04–20	1	5	15
Kyselina argininosukcinátová	0,04–20	1	5	15
Homocitrulin	0,08–40	2	10	30
Sukcinylaceton ^x	0,04–20	1	5	15
<i>N</i> -3-Methylkrotonylglycin	0,04–20	1	5	15
<i>N</i> -Acetylglycin	0,08–40	2	10	30
<i>N</i> -Butyrylglycin	0,04–20	1	5	15
<i>N</i> -Glutarylglycin	0,04–20	1	5	15
<i>N</i> -Hexanoylglycin	0,04–20	1	5	15
<i>N</i> -3-Fenylpropionylglycin	0,04–20	1	5	15
<i>N</i> -Propionylglycin	0,04–20	1	5	15

Analyt	Pracovní rozsah (μmol/l)	LQC (μmol/l)	MQC (μmol/l)	HQC (μmol/l)
<i>N</i> -Suberylglycin	0,04–20	1	5	15
<i>N</i> -Tiglylglycin	0,04–20	1	5	15
<i>N</i> -Valerylglycin	0,04–20	1	5	15
Erythritol	1,17–600	30	150	450
Galaktitol	1,17–600	30	150	450
Galaktosa	1,17–600	30	150	450
Perseitol	0,04–20	1	5	15
Ribitol	0,39–200	10	50	150
Sedoheptulosa	0,39–200	10	50	150
Stachyosa	0,08–40	2	10	30
Kyselina guanidinooctová ^x	0,59–300	15	75	225
Kreatin ^x	3,91–2000	100	500	1500
Kreatinin ^x	5,86–3000	150	750	2250
Kyselina sialová ^x	0,59–300	15	75	225

^x Kalibrační křivka analytu byla připravena v jedné směsi spolu s dalšími označenými analyty (^x) v octanu amonném (20 mmol/l, pH 9,75) kvůli přítomnosti kreatinu a kreatininu v močovém diluentu Sigmatrix (MDS).

10.3 Příloha 3: MS/MS parametry analytů a interních standardů ve vyvinuté LC-MS/MS metodě

Analyt	Interní standard	Q1 (Da)	Q3 (Da)	RT (min)	Časové okno vybrané reakce (s)	Vážení vybrané reakce	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
2-Deoxyadenosin	Adenosin- ¹³ C ₅	250,0	133,8	2,0	60	0,2	-55	-10	-11	-5
2-Deoxyguanosin	Adenosin- ¹³ C ₅	265,9	149,9	3,0	60	0,2	-70	-10	-24	-8
2-Deoxyinosin	Adenosin- ¹³ C ₅	251,0	134,8	3,1	60	0,2	-60	-10	-24	-10
2-Deoxyuridin	Adenosin- ¹³ C ₅	227,0	183,8	1,9	60	0,5	-60	-10	-20	-5
2,8-Dihydroxyadenin	Adenosin- ¹³ C ₅	166,0	123,0	5,3	60	1,0	-55	-10	-16	-10
Adenin	Adenosin- ¹³ C ₅	133,9	106,8	2,6	60	0,2	-60	-10	-24	-5
Adenosin	Adenosin- ¹³ C ₅	265,9	133,7	2,3	60	0,2	-40	-10	-10	-5
AICAr	Adenosin- ¹³ C ₅	257,1	124,9	2,6	60	0,2	-60	-10	-16	-10
Dihydrothymin	Uracil- ¹⁵ N ₂	127,0	42,0	1,0	60	1,0	-35	-10	-22	-5
Dihydrouracil	Uracil- ¹⁵ N ₂	112,9	42,1	1,1	60	1,0	-40	-10	-22	-5
Guanosin	Adenosin- ¹³ C ₅	281,9	149,9	3,3	60	0,2	-75	-10	-24	-9
Hypoxanthin	Adenosin- ¹³ C ₅	134,8	91,8	3,3	60	0,5	-60	-10	-22	-5
Inosin	Adenosin- ¹³ C ₅	266,8	134,8	3,5	60	0,2	-55	-10	-24	-7
Kyselina orotová	Kyselina orotová- ¹⁵ N ₂	154,8	110,9	4,8	240	0,2	-35	-10	-14	-9
Orotidin	Uracil- ¹⁵ N ₂	287,0	111,0	5,1	240	0,2	-60	-10	-25	-10
SAICAr	Kyselina orotová- ¹⁵ N ₂	372,9	124,9	6,5	240	1,0	-75	-10	-36	-10
Sukcinyladenosin	Kyselina orotová- ¹⁵ N ₂	382,1	206,0	6,4	240	1,0	-60	-10	-20	-10
Thymidin	Adenosin- ¹³ C ₅	241,0	124,9	1,7	60	0,2	-60	-10	-12	-5
Thymin	Uracil- ¹⁵ N ₂	125,0	42,1	1,5	60	0,5	-45	-10	-24	-5
Uracil	Uracil- ¹⁵ N ₂	110,9	42,1	1,8	60	0,5	-45	-10	-24	-5
Kyselina močová	Xanthin- ¹⁵ N ₂	167,0	124,0	5,7	240	0,2	-45	-10	-22	-15
Uridin	Adenosin- ¹³ C ₅	243,2	200,0	2,3	60	0,2	-60	-10	-20	-10
Xanthin	Xanthin- ¹⁵ N ₂	150,8	107,8	4,7	120	0,2	-60	-10	-22	-7

Analyt	Interní standard	Q1 (Da)	Q3 (Da)	RT (min)	Časové okno vybrané reakce (s)	Vážení vybrané reakce	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
<i>N</i> -Acetylasparagová kyselina	Hexanoylglycin- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	174,0	88,0	6,1	240	1,0	-5	-10	-22	-11
<i>N</i> -Acetylglutamin	Hexanoylglycin- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	187,0	145,0	4,3	120	1,0	-45	-10	-18	-7
<i>N</i> -Acetylleucin	Hexanoylglycin- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	172,0	130,1	3,3	120	0,5	-20	-10	-18	-9
<i>N</i> -Acetylserin	Hexanoylglycin- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	146,0	84,0	4,3	120	1,0	-20	-10	-18	-7
<i>N</i> -Acetylvalin	Hexanoylglycin- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	158,0	116,0	3,5	120	0,5	-15	-10	-18	-13
Kyselina argininosukcinátová	Kyselina orotová- ¹⁵ N ₂	289,0	131,9	5,5	120	1,0	-50	-10	-30	-10
Homocitrulin	Kyselina orotová- ¹⁵ N ₂	188,0	145,1	3,6	60	1,0	-50	-10	-18	-5
Sukcinylacetone	Kyselina orotová- ¹⁵ N ₂	156,9	98,8	3,5	120	1,0	-35	-10	-12	-5
C2 Gly (<i>N</i> -Acetyl)	Hexanoylglycin- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	116,0	74,0	4,3	120	0,5	-35	-10	-14	-10
C3 Gly (<i>N</i> -Propionyl)	Hexanoylglycin- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	131,9	75,7	3,8	120	1,0	10	10	11	10
C4 Gly (<i>N</i> -Butyryl, Isobutyryl)	Hexanoylglycin- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	144,0	74,0	3,5	120	0,5	-40	-10	-14	-10
C5 Gly (<i>N</i> -2-methylbutyryl, Isovaleryl, Valeryl)	Hexanoylglycin- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	160,0	75,8	3,4	180	1,0	10	10	13	10
C5:1 Gly (<i>N</i> -3-Methylkrotonyl, Tiglyl)	Hexanoylglycin- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	156,0	74,0	3,5	120	0,5	-40	-10	-14	-10
Tiglyl Gly	Hexanoylglycin- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	156,0	112,0	3,5	120	0,5	-45	-10	-14	-10
C6 Gly (<i>N</i> -Hexanoyl)	Hexanoylglycin- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	172,0	74,0	3,2	120	0,5	-40	-10	-18	-10
C5-DC (<i>N</i> -Glutaryl)	Hexanoylglycin- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	190,2	76,0	6,0	240	1,0	11	10	11	10
3-PP Gly	Hexanoylglycin- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	206,0	74,0	3,3	120	0,5	-45	-10	-18	-10
C8-DC Gly	Hexanoylglycin- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	230,0	74,0	6,0	240	1,0	-50	-10	-25	-10
Tetroly (Erythritol, Threitol)	Galaktitol- ¹³ C ₆	121,0	88,9	2,2	60	1,0	-35	-10	-14	-11
Pentitoly (Arabitol, Ribitol, Xylitol)	Galaktitol- ¹³ C ₆	151,0	88,8	2,4	60	1,0	-55	-10	-16	-11

Analyt	Interní standard	Q1 (Da)	Q3 (Da)	RT (min)	Časové okno vybrané reakce (s)	Vážení vybrané reakce	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
Hexitoly (Galaktitol, Mannitol, Sorbitol)	Galaktitol- ¹³ C ₆	180,9	88,9	2,8	60	0,5	-70	-10	-20	-5
Hexosy (Fruktosa, Galaktosa, Glukosa, Mannosa)	Galaktitol- ¹³ C ₆	178,9	88,9	2,8	60	1,0	-35	-10	-12	-11
Heptitoly (Perseitol, Volemitol)	Galaktitol- ¹³ C ₆	211,0	100,7	3,0	60	0,5	-80	-10	-22	-11
Heptosy (Mannoheptulosa, Sedoheptulosa)	Galaktitol- ¹³ C ₆	209,0	119,0	2,7	60	1,0	-35	-10	-10	-9
Tetrasacharidy (Stachyosa)	Kyselina orotová- ¹⁵ N ₂	665,1	382,9	3,9	60	1,0	-100	-10	-44	-23
Kyselina guanidinoctová	Kyselina guanidinoctová-D ₂	115,9	73,9	3,3	60	1,0	-10	-10	-12	-5
Kreatin	Kreatin-D ₃	129,9	87,7	3,2	60	1,0	-40	-10	-12	-5
Kreatinin	Kreatinin-D ₃	112,0	67,8	2,1	60	0,2	-50	-10	-12	-5
Kyselina sialová	Kyselina sialová- ¹³ C ₃	307,9	86,8	4,8	240	0,2	-55	-10	-24	-5
Adenosin- ¹³ C ₅	-	271,0	133,8	2,3	60	0,2	-45	-10	-12	-5
Kreatin-D ₃	-	133,0	90,9	3,2	60	0,2	-40	-10	-12	-5
Kreatinin-D ₃	-	115,0	67,9	2,1	60	0,2	-50	-10	-22	-5
Galaktitol- ¹³ C ₆	-	187,0	91,9	2,8	60	0,2	-60	-10	-22	-5
Kyselina guanidinoctová-D ₂	-	118,0	75,9	3,3	60	0,2	-50	-10	-12	-5
N-Hexanoylglycin- ¹³ C ₂ , ¹⁵ N	-	175,0	77,0	3,2	120	0,2	-40	-10	-18	-10
Kyselina orotová- ¹⁵ N ₂	-	156,9	112,8	4,8	240	0,2	-25	-10	-12	-5
Kyselina sialová- ¹³ C ₃	-	311,1	89,9	4,8	240	0,2	-50	-10	-22	-5
Uracil- ¹⁵ N ₂	-	113,0	42,9	1,8	60	0,5	-55	-10	-24	-5
Xanthin- ¹⁵ N ₂	-	152,9	108,8	4,7	120	0,2	-25	-10	-22	-5

10.4 Příloha 4: Parametry kalibračních křivek, LOD a LOQ

Analyt	Kalibrační rozsah (μmol/l)	Regresní rovnice	a^y	b^y	c^y	(R ²) ^z	LOD ^y (nmol/l)	LOQ ^y (nmol/l)
2-Deoxyadenosin	0,08–20	$y = ax^2 + bx + c$	-1,51E-03	7,79E-01	-2,29E-02	0,9871	17,1	56,8
			1,80E-02	1,94E-01	3,16E-02		2,4	8,1
2-Deoxyguanosin	0,04–20	$y = ax^2 + bx + c$	2,51E-02	9,54E+00	-1,44E-02	0,9944	3,2	10,6
			1,14E-01	1,32E+00	8,99E-02		0,6	1,9
2-Deoxyinosin	0,04–20	$y = ax^2 + bx + c$	2,94E-02	6,08E+00	-2,86E-02	0,9945	6,1	20,4
			7,27E-02	9,55E-01	9,60E-02		2,4	7,8
2-Deoxyuridin	0,08–20	$y = ax^2 + bx + c$	-2,49E-02	2,43E+00	2,55E-02	0,9963	4,3	14,2
			2,29E-02	3,52E-01	5,71E-02		1,3	4,5
2,8-Dihydroxyadenin ^x	0,31–20	$y = ax^2 + bx + c$	1,33E-03	1,92E-01	-8,81E-03	0,9988	36,8	122,7
			3,42E-03	4,64E-02	1,73E-02		6,9	23,1
Adenin	0,63–20	$y = ax^2 + bx + c$	-1,61E-02	2,79E+00	2,49E-01	0,9965	59,3	197,3
			2,40E-02	1,13E+00	6,82E-01		13,9	46,4
Adenosin ^x	0,31–20	$y = ax + b$	3,74E-01	1,32E-02	-	0,9967	14,4	48,1
			2,55E-02	1,84E-02	-		6,1	20,2
AICAr	0,04–20	$y = ax^2 + bx + c$	-5,41E-02	1,50E+01	-1,52E-01	0,9950	2,6	8,5
			1,86E-01	2,26E+00	1,23E-01		0,2	0,8
Dihydrothymin	0,31–40	$y = ax^2 + bx + c$	-2,40E-05	3,81E-03	7,31E-04	0,9931	156,3	520,5
			1,46E-05	1,84E-03	3,35E-04		62,7	208,8
Dihydrouracil	3,13–100	$y = ax^2 + bx + c$	1,63E-06	1,36E-03	5,77E-03	0,9985	413,3	1376,2
			6,06E-07	1,43E-03	3,23E-03		60,8	202,3
Guanosin	0,16–20	$y = ax + b$	3,67E+00	-3,41E-02	-	0,9947	8,3	27,8
			8,41E-01	1,17E-01	-		1,2	3,9
Hypoxanthin	0,55–140	$y = ax^2 + bx + c$	-1,15E-03	1,86E+00	2,80E-02	0,9951	26,8	89,2
			2,64E-03	2,15E-01	2,66E-01		2,7	8,9

Analyt	Kalibrační rozsah (μmol/l)	Regresní rovnice	a ^y	b ^y	c ^y	(R ²) ^z	LOD ^y (nmol/l)	LOQ ^y (nmol/l)
Inosin ^x	0,04–20	y = ax ² + bx + c	-2,17E-02 3,40E-02	7,18E+00 1,19E+00	-1,85E-02 4,73E-02	0,9986	2,7 0,5	9,1 1,8
Kyselina orotová	0,12–60	y = ax ² + bx + c	-1,55E-03 7,13E-04	6,85E-01 4,02E-02	-5,33E-03 9,10E-03	0,9993	9,9 6,2	32,9 20,6
Orotidin	0,04–20	y = ax ² + bx + c	-1,45E-01 1,23E-02	1,51E+01 2,63E+00	-1,29E-02 6,44E-02	0,9982	0,8 0,01	2,7 0,03
SAICAr ^x	0,31–20	y = ax + b	9,14E-03 1,16E-04	3,40E-04 5,17E-04	-	0,9995	6,5 1,5	21,6 4,9
Sukcinyladenosin	0,04–20	y = ax ² + bx + c	4,01E-04 2,06E-03	2,49E-01 3,22E-02	1,60E-03 6,39E-03	0,9934	0,8 0,1	2,6 0,4
Thymidin	0,04–20	y = ax ² + bx + c	5,86E-02 1,65E-01	8,81E+00 2,52E-01	-1,19E-01 2,01E-01	0,9797	1,6 0,3	5,3 1,0
Thymin	0,04–20	y = ax ² + bx + c	-1,27E-02 4,01E-03	1,08E+00 2,55E-02	2,22E-02 1,09E-02	0,9990	2,9 1,0	9,8 3,2
Uracil ^x	0,12–60	y = ax + b	9,22E-01 1,55E-02	2,21E-03 1,07E-02	-	0,9998	4,0 0,5	13,3 1,6
Kyselina močová ^x	31,25–2000	y = ax ² + bx + c	-5,13E-05 1,91E-06	2,63E-01 1,85E-02	4,72E+00 1,64E+00	0,9969	37,8 4,0	125,7 13,5
Uridin	0,04–20	y = ax ² + bx + c	4,10E-04 2,32E-02	1,65E+00 3,29E-01	5,18E-03 3,87E-02	0,9940	17,1 3,1	56,9 10,3
Xanthin	0,39–200	y = ax + b	5,67E-01 3,38E-02	-7,87E-03 6,38E-02	-	0,9980	7,5 1,2	24,9 3,9
N-Acetylasparagová kyselina	0,63–80	y = ax ² + bx + c	-1,31E-04 2,86E-04	3,52E-01 3,15E-02	-2,92E-02 4,21E-02	0,9978	4,7 0,9	15,7 3,0
N-Acetylglutamin	0,20–100	y = ax ² + bx + c	-2,41E-03 3,14E-03	1,23E+00 2,06E-01	7,97E-02 5,87E-02	0,9966	5,4 1,6	18,1 5,3

Analyt	Kalibrační rozsah (μmol/l)	Regresní rovnice	a^y	b^y	c^y	$(R^2)^z$	LOD ^y (nmol/l)	LOQ ^y (nmol/l)
N-Acetylleucin	0,04–20	$y = ax^2 + bx + c$	-2,65E-03	1,55E+00	3,90E-02	0,9972	1,6	5,2
			6,30E-03	2,41E-01	1,63E-02		0,4	1,4
N-Acetylserin	0,23–60	$y = ax^2 + bx + c$	1,23E-04	1,26E-01	1,15E-02	0,9956	29,1	97,0
			3,33E-04	2,08E-02	7,48E-03		8,7	28,8
N-Acetylvalin	0,04–20	$y = ax + b$	1,54E+00	1,40E-02	-	0,9983	2,4	7,9
			3,09E-02	1,24E-02	-		0,7	2,2
Kyselina argininosukcinátová	0,16–20	$y = ax^2 + bx + c$	-1,64E-05	5,71E-03	-1,52E-04	0,9965	20,5	68,4
			2,73E-05	3,10E-04	8,73E-05		7,3	24,3
Homocitrullin	0,08–40	$y = ax^2 + bx + c$	-4,52E-04	-3,41E-02	6,01E-04	0,9991	4,7	15,7
			1,84E-04	8,90E-03	3,09E-03		2,3	7,6
Sukcinylaceton ^x	0,31–20	$y = ax + b$	3,30E-03	-1,07E+00	-	0,9979	51,9	172,7
			8,96E-04	1,52E+00	-		15,7	52,1
N-3-Methylkrotonylglycin	0,04–20	$y = ax^2 + bx + c$	4,49E-03	3,87E-01	-4,08E-03	0,9996	5,2	17,2
			1,24E-03	1,31E-02	9,24E-04		0,2	0,5
N-Acetylglycin	1,25–40	$y = ax^2 + bx + c$	2,80E-04	9,21E-02	5,70E-03	0,9989	99,7	331,9
			1,85E-04	9,31E-02	3,87E-03		18,6	62,0
N-Butyryl glycin	0,08–20	$y = ax^2 + bx + c$	2,89E-03	1,56E-01	-1,06E-03	0,9995	11,2	37,3
			1,40E-03	3,08E-02	2,42E-03		7,0	23,3
N-Glutaryl glycin	0,04–20	$y = ax^2 + bx + c$	1,68E-03	1,55E-01	8,40E-04	0,9996	3,8	12,8
			4,01E-04	3,20E-02	2,49E-03		2,6	8,5
N-Hexanoyl glycin	0,08–20	$y = ax^2 + bx + c$	2,74E-03	1,13E+00	-7,62E-03	0,9996	1,9	6,5
			4,31E-03	5,98E-02	1,70E-02		0,1	0,5
N-3-Fenylpropionyl glycin	0,04–20	$y = ax^2 + bx + c$	1,52E-03	2,08E+00	-1,60E-02	0,9997	0,8	2,7
			6,11E-03	1,30E-01	7,52E-03		0,2	0,6
N-Propionyl glycin	0,31–20	$y = ax^2 + bx + c$	1,81E-03	4,72E-02	3,65E-03	0,9990	51,0	169,7
			7,00E-04	1,24E-02	2,03E-03		8,2	27,2

Analyt	Kalibrační rozsah (μmol/l)	Regresní rovnice	a ^y	b ^y	c ^y	(R ²) ^z	LOD ^y (nmol/l)	LOQ ^y (nmol/l)
N-Suberylglycin	0,04–20	y = ax ² + bx + c	1,11E-02	6,29E-01	-8,02E-04	0,9997	1,1	3,7
			2,32E-03	7,44E-02	1,29E-03		0,2	0,6
N-Tiglylglycin	0,16–20	y = ax ² + bx + c	1,09E-03	1,50E-01	2,48E-03	0,9995	48,1	160,3
			5,44E-05	7,32E-03	5,02E-03		7,9	26,3
N-Valerylglycin	0,04–20	y = ax ² + bx + c	9,18E-03	4,14E-01	1,57E-03	0,9985	4,6	15,3
			4,14E-02	4,14E-02	5,44E-03		0,9	3,2
Erythritol	1,17–600	y = ax ² + bx + c	5,70E-06	1,15E-02	-1,65E-03	0,9997	46,2	153,8
			6,31E-07	2,32E-03	1,78E-03		12,5	41,6
Galaktitol	1,17–600	y = ax ² + bx + c	4,91E-06	7,48E-02	2,70E-03	0,9998	75,8	252,4
			1,98E-06	1,64E-03	1,34E-02		10,1	33,7
Galaktosa	2,34–600	y = ax ² + bx + c	4,00E-06	8,05E-03	1,09E-02	0,9973	549,3	1829,3
			1,87E-06	1,04E-03	1,49E-02		187,3	623,7
Perseitol	0,04–20	y = ax ² + bx + c	2,29E-04	8,83E-02	3,60E-04	0,9995	14,8	49,4
			3,56E-04	1,26E-02	1,45E-03		1,6	5,5
Ribitol	0,39–200	y = ax ² + bx + c	2,64E-05	6,20E-02	5,11E-03	0,9997	21,9	72,8
			7,43E-06	5,45E-03	2,39E-03		2,7	9,1
Sedoheptulosa	0,39–200	y = ax + b	6,94E-02	7,33E-03	-	0,9972	53,8	179,3
			9,08E-03	6,99E-03	-		10,5	35,0
Stachyosa	0,63–40	y = ax ² + bx + c	2,38E-04	1,26E-02	3,73E-03	0,9991	51,4	171,1
			2,72E-04	6,38E-03	2,04E-03		7,0	23,3
Kyselina guanidinoctová ^x	0,59–300	y = ax + b	1,28E-01	3,47E-02	-	0,9983	74,8	249,0
			1,09E-02	1,13E-02	-		2,4	7,9
Kreatin ^x	3,91–2000	y = ax ² + bx + c	-6,89E-06	9,59E-02	-3,91E-02	0,9987	79,2	263,7
			4,42E-06	1,50E-03	4,64E-02		30,8	102,5
Kreatinin ^x	5,86–3000	y = ax + b	3,00E-02	-6,79E-03	-	0,9993	145,5	484,4
			1,73E-02	4,15E-02	-		26,8	223,5

Analyt	Kalibrační rozsah (μmol/l)	Regresní rovnice	a^y	b^y	c^y	(R ²) ^z	LOD ^y (nmol/l)	LOQ ^y (nmol/l)
Kyselina sialová ^x	0,59–300	$y = ax^2 + bx + c$	-7,91E-05 1,80E-04	3,85E-01 7,35E-02	8,50E-02 5,33E-02	0,9982	12,8 5,1	42,5 16,9

^x Kalibrační křivka analytu byla připravena v jedné směsi spolu s dalšími označenými analyty (^x) v octanu amonném (20 mmol/l, pH 9,75) kvůli přítomnosti kreatinu a kreatininu v močovém diluentu Sigmatrix (MDS).

^y Výsledky jsou uvedeny jako průměr a SD ($n = 3$).

^z Výsledky jsou uvedeny jako průměr ($n = 3$).

10.5 Příloha 5: Vnitrodenní správnost a přesnost ($n = 5$)

Analyt	Den	LQC			MQC			HQC		
		Nominální koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Správnost (%)	CV (%)	Nominální koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Správnost (%)	CV (%)	Nominální koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Správnost (%)	CV (%)
2-Deoxyadenosin	1		96,5	11,3		102,4	10,2		94,8	10,3
	2	1	101,6	8,8	5	104,0	9,5	15	103,7	3,6
	3		93,6	9,7		103,7	4,6		87,3	6,6
2-Deoxyguanosin	1		90,0	12,8		90,5	13,5		86,1	13,8
	2	1	93,7	10,7	5	85,8	5,1	15	86,7	8,9
	3		85,3	8,5		87,0	4,2		87,5	5,4
2-Deoxyinosin	1		81,7	7,8		85,1	14,5		88,8	12,8
	2	1	86,3	8,8	5	87,9	11,4	15	88,1	9,3
	3		81,9	12,3		89,1	11,6		86,0	2,8
2-Deoxyuridin	1		83,1	12,6		92,4	10,6		85,5	3,9
	2	1	111,9	13,4	5	103,1	11,5	15	100,3	6,9
	3		101,4	7,6		97,0	10,3		110,5	12,9
2,8-Dihydroxyadenin	1		101,2	13,2		76,8	13,3		64,5	7,5
	2	1	70,4	13,1	5	53,7	5,4	15	61,1	11,8
	3		92,5	8,0		88,7	12,5		81,9	8,9
Adenin	1		103,6	7,9		92,4	13,0		87,1	13,2
	2	1	86,5	10,9	5	93,2	15,0	15	85,2	9,8
	3		82,2	6,5		85,8	13,4		87,6	10,6
Adenosin	1		104,6	8,1		91,0	11,4		96,0	8,3
	2	1	89,7	11,4	5	91,3	5,6	15	102,0	5,1
	3		108,7	6,2		109,0	10,9		112,5	7,4
AICAr	1	1	103,7	14,9	5	113,8	6,4	15	92,3	13,6

Analyt	Den	LQC			MQC			HQC		
		Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)	Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)	Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)
	2		103,0	8,0		95,7	13,1		109,8	4,9
	3		100,4	13,4		98,2	9,8		111,2	4,6
	1		87,5	6,7		90,5	3,7		93,9	4,2
Dihydrothymín	2	2	96,0	5,0	10	94,1	3,6	30	94,9	1,9
	3		88,2	4,7		94,5	7,5		96,4	11,1
	1		103,9	5,3		97,6	6,7		107,9	9,0
Dihydrouracil	2	5	101,8	8,5	25	109,7	5,4	75	112,0	2,1
	3		105,8	1,5		104,0	4,5		105,5	2,9
	1		118,9	7,2		112,7	11,0		110,6	4,3
Guanosin	2	1	95,5	14,7	5	107,4	14,1	15	94,9	4,0
	3		117,8	8,9		104,2	9,4		114,7	6,6
	1		84,0	11,4		88,0	14,1		87,0	9,5
Hypoxanthin	2	7	84,5	10,7	35	86,6	9,6	105	86,6	12,1
	3		82,6	12,8		88,6	12,6		86,4	14,2
	1		97,0	13,9		107,9	12,1		88,6	14,1
Inosin	2	1	84,2	14,6	5	85,2	14,1	15	101,9	5,3
	3		87,0	8,9		85,5	9,3		101,5	5,3
	1		100,6	2,0		106,4	3,7		105,0	6,5
Kyselina orotová	2	3	99,4	3,8	15	106,5	1,5	45	94,9	8,6
	3		104,6	4,2		102,9	3,5		93,8	3,0
	1		94,0	10,4		127,9	6,1		111,4	11,0
Orotidin	2	1	102,2	14,5	5	130,5	9,8	15	114,5	6,1
	3		108,0	9,3		121,6	8,1		111,1	3,5
	1	1	94,5	4,6	5	102,6	3,4	15	106,2	4,3

Analyt	Den	LQC			MQC			HQC		
		Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)	Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)	Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)
	2		96,6	3,9		90,2	3,7		97,3	3,2
	3		83,4	7,1		90,2	3,7		89,9	10,1
	1		98,8	13,3		127,2	13,7		107,0	4,9
Sukcinyladenosin	2	1	113,1	15,6	5	124,8	13,8	15	108,0	4,7
	3		88,2	15,4		107,1	9,4		109,7	3,5
	1		101,3	11,1		100,5	12,3		93,0	14,0
Thymidin	2	1	106,5	6,3	5	105,9	10,0	15	107,6	7,1
	3		103,3	12,5		110,7	3,9		89,4	12,5
	1		112,6	5,9		114,5	2,4		107,2	2,9
Thymin	2	1	107,5	3,6	5	114,4	2,7	15	105,7	1,8
	3		101,5	6,1		104,8	2,9		97,5	1,3
	1		96,0	2,3		88,6	1,3		86,0	1,7
Uracil	2	3	96,0	2,0	15	88,6	2,6	45	85,5	2,9
	3		97,7	3,4		91,1	1,2		87,2	2,4
	1		110,7	5,9		109,9	2,4		111,2	4,4
Kyselina močová	2	100	107,0	7,2	500	114,6	4,5	1500	113,5	7,6
	3		101,1	9,5		100,8	7,8		90,4	6,3
	1		97,7	10,5		112,2	14,8		86,8	11,5
Uridin	2	1	116,3	14,6	5	113,1	7,3	15	99,3	5,5
	3		91,8	4,2		92,2	5,0		94,3	3,5
	1		96,1	4,9		99,3	7,3		100,9	8,4
Xanthin	2	10	102,5	3,9	50	106,9	9,4	150	105,5	4,2
	3		108,1	3,8		112,6	7,5		110,1	3,5
	1	4	96,6	6,2	20	98,9	2,3	60	100,3	3,5

Analyt	Den	LQC			MQC			HQC		
		Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)	Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)	Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)
N-Acetylasparagová kyselina	2		89,7	4,5		82,0	2,3		85,0	2,6
	3		91,8	4,2		91,0	4,2		94,0	1,8
N-Acetylglutamin	1		111,3	4,6		123,7	5,4		125,5	10,2
	2	5	97,4	6,0	25	98,1	2,2	75	109,4	8,1
	3		112,3	7,6		120,7	6,3		124,7	3,4
N-Acetylleucin	1		84,3	8,7		93,3	5,2		95,2	3,6
	2	1	104,4	1,6	5	105,0	6,4	15	111,6	6,7
	3		115,4	4,9		110,2	11,4		113,6	3,5
N-Acetylserin	1		108,3	5,5		112,1	4,8		109,1	3,4
	2	3	89,5	5,3	15	85,2	1,7	45	86,2	1,1
	3		101,8	4,4		102,5	5,0		95,5	3,1
N-Acetylvalin	1		87,8	3,4		88,3	7,1		85,2	10,9
	2	1	111,2	7,5	5	112,3	7,8	15	108,9	9,3
	3		94,2	11,0		91,5	9,8		87,3	5,9
Kyselina argininosukcinátová	1		84,2	4,5		81,0	5,7		83,2	3,6
	2	1	89,5	4,9	5	82,8	3,9	15	89,4	3,4
	3		88,3	7,8		90,1	5,6		94,9	4,4
Homocitrullin	1		83,1	14,0		101,5	7,2		112,9	3,8
	2	2	85,1	9,4	10	85,8	7,0	30	103,2	6,4
	3		80,4	12,3		91,2	4,3		96,7	9,0
Sukcinylacetone	1		95,0	9,6		91,0	8,5		89,1	6,4
	2	1	95,2	6,5	5	101,7	7,6	15	90,8	4,0
	3		97,7	12,8		101,8	12,3		95,8	8,5
	1	1	107,2	5,6	5	108,6	3,2	15	108,9	6,6

Analyt	Den	LQC			MQC			HQC		
		Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)	Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)	Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)
N-3-Methylkrotonylglycin	2		116,7	3,9		114,3	3,0		105,8	1,9
	3		119,0	9,9		114,7	10,2		112,3	7,8
N-Acetylglycin	1		100,3	11,9		92,5	7,9		87,3	9,4
	2	2	112,1	2,3	10	98,1	10,0	30	111,5	13,3
	3		115,9	9,1		101,6	13,3		101,8	9,9
N-Butyrylglycin	1		105,6	7,7		108,4	3,9		104,4	5,5
	2	1	111,6	5,1	5	113,9	3,6	15	101,9	2,6
	3		116,0	8,8		114,7	13,7		114,4	7,9
N-Glutarylglycin	1		96,7	8,5		98,5	4,2		86,8	8,6
	2	1	102,0	4,0	5	101,7	6,4	15	96,6	10,9
	3		94,9	11,7		89,6	7,2		87,0	8,6
N-Hexanoylglycin	1		94,2	12,7		99,0	10,1		87,4	5,7
	2	1	100,0	4,8	5	104,6	6,8	15	109,4	11,7
	3		93,2	13,8		99,0	7,1		97,2	8,5
N-3-Fenylpropionylglycin	1		84,2	6,2		88,8	4,6		95,6	7,7
	2	1	87,7	2,7	5	90,0	2,6	15	94,4	4,3
	3		96,9	6,3		102,0	4,9		107,5	7,2
N-Propionylglycin	1		127,9	16,5		112,5	3,7		96,0	6,2
	2	1	135,6	10,6	5	122,4	12,2	15	113,4	9,1
	3		128,9	6,9		109,6	2,4		101,2	14,8
N-Suberylglycin	1		110,8	11,0		108,7	8,6		90,3	12,2
	2	1	102,6	3,4	5	103,3	6,9	15	107,5	10,6
	3		98,0	13,5		92,7	8,2		95,9	9,7
N-Tiglylglycin	1	1	98,4	3,9	5	96,9	2,8	15	99,5	6,6

Analyt	Den	LQC			MQC			HQC		
		Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)	Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)	Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)
	2		102,8	5,7		101,7	4,7		95,5	2,7
	3		109,1	6,2		113,1	4,4		112,8	4,2
	1		99,2	4,8		99,8	2,8		103,2	8,9
N-Valerylglycin	2	1	106,7	3,5	5	99,6	6,4	15	92,9	6,1
	3		116,6	10,1		113,4	4,9		112,3	4,5
	1		105,0	3,7		110,8	5,3		105,4	3,4
Erythritol	2	30	108,6	5,0	150	110,6	5,3	450	106,6	4,2
	3		105,7	0,8		110,9	2,5		108,5	3,2
	1		99,0	2,6		99,9	4,2		97,8	1,5
Galaktitol	2	30	102,5	5,9	150	99,3	6,7	450	97,8	3,2
	3		102,5	1,4		100,8	2,3		100,6	3,9
	1		99,8	10,7		99,4	13,5		86,8	8,8
Galaktosa	2	30	108,3	13,3	150	97,4	14,1	450	104,5	10,5
	3		92,5	6,8		88,7	6,5		86,0	9,3
	1		73,2	10,1		74,1	7,3		77,1	2,1
Perseitol	2	1	74,5	12,6	5	75,7	5,8	15	74,5	5,3
	3		86,5	9,4		80,5	1,5		80,7	5,4
	1		10,3	3,6		104,0	4,6		100,5	2,4
Ribitol	2	10	105,1	5,0	50	103,9	6,0	150	101,7	4,3
	3		101,1	1,7		100,4	3,2		102,0	3,7
	1		90,0	3,1		93,1	12,2		88,3	11,1
Sedoheptulosa	2	10	92,5	12,6	50	91,7	9,3	150	86,5	12,8
	3		101,8	7,0		95,3	11,0		94,8	7,5
	1	2	113,5	5,5	10	109,5	8,4	30	91,2	9,1

Analyt	Den	LQC			MQC			HQC		
		Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)	Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)	Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)
	2		99,8	11,5		101,9	7,0		91,9	8,7
	3		80,5	5,8		86,9	7,5		87,9	11,6
	1		111,2	4,0		110,8	7,3		103,4	6,8
Kyselina guanidinoctová	2	15	107,6	11,1	75	113,9	7,4	225	102,6	14,6
	3		109,0	8,7		99,5	6,3		95,0	7,5
	1		113,9	6,1		108,4	5,1		94,5	2,8
Kreatin	2	100	80,4	5,2	500	92,4	8,2	1500	100,6	3,8
	3		97,7	7,0		94,0	5,6		99,9	7,4
	1		100,8	2,2		104,7	4,0		107,3	3,0
Kreatinin	2	150	103,7	3,5	750	100,6	3,8	2250	101,2	4,9
	3		108,4	5,1		105,0	3,5		104,4	2,0
	1		104,8	7,6		108,9	10,4		115,0	7,5
Kyselina sialová	2	15	98,2	6,8	75	110,9	10,4	225	112,8	7,1
	3		115,6	3,1		113,8	7,6		114,0	7,3

10.6 Příloha 6: Mezidenní správnost a přesnost ($n = 15$)

Analyt	LQC			MQC			HQC		
	Nominální koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Správnost (%)	CV (%)	Nominální koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Správnost (%)	CV (%)	Nominální koncentrace ($\mu\text{mol/l}$)	Správnost (%)	CV (%)
2-Deoxyadenosin	1	97,2	10,5	5	103,4	8,5	15	95,2	10,1
2-Deoxyguanosin	1	89,7	11,5	5	87,8	9,1	15	86,8	9,9
2-Deoxyinosin	1	83,3	10,1	5	87,4	12,7	15	87,6	9,5
2-Deoxyuridin	1	97,9	16,6	5	97,5	11,7	15	98,9	13,5
2,8-Dihydroxyadenin	1	88,0	18,9	5	73,0	23,3	15	69,2	16,2
Adenin	1	90,0	13,1	5	90,3	14,3	15	86,7	11,4
Adenosin	1	101,8	11,3	5	96,2	12,9	15	103,5	9,6
AICAr	1	102,3	12,3	5	100,8	12,5	15	104,4	11,6
Dihydrothymin	2	90,6	7,0	10	93,1	5,6	30	95,1	7,1
Dihydrouracil	5	103,8	6,0	25	103,8	7,3	75	108,5	6,1
Guanosin	1	111,3	13,8	5	108,1	12,3	15	106,7	9,6
Hypoxanthin	7	83,7	11,7	35	87,7	12,3	105	86,6	11,1
Inosin	1	89,4	14,2	5	92,8	16,6	15	97,3	10,8
Kyselina orotová	3	101,6	4,1	15	105,3	3,5	45	97,9	8,3
Orotidin	1	101,4	12,9	5	126,6	8,9	15	112,3	7,6
SAICAr	1	91,5	8,2	5	94,4	7,2	15	97,8	9,3
Sukcinyladosin	1	100,0	18,1	5	119,7	14,8	15	108,3	4,5
Thymidin	1	103,7	10,4	5	105,7	10,0	15	96,7	13,9
Thymin	1	107,2	6,8	5	111,0	5,0	15	103,5	4,7
Uracil	3	96,6	2,8	15	89,4	2,2	45	86,2	2,5
Kyselina močová	100	106,3	8,4	500	108,4	7,4	1500	105,0	11,7
Uridin	1	102,2	15,6	5	105,9	13,9	15	93,5	9,2

Analyt	LQC			MQC			HQC		
	Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)	Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)	Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)
Xanthin	10	102,2	6,4	50	106,3	9,6	150	105,5	6,7
<i>N</i> -Acetylasparagová kyselina	4	92,7	6,0	20	90,6	8,2	60	93,1	7,3
<i>N</i> -Acetylglutamin	5	107,0	8,9	25	114,2	11,3	75	119,9	9,9
<i>N</i> -Acetylleucin	1	101,4	13,8	5	102,9	10,9	15	106,8	8,9
<i>N</i> -Acetylserin	3	99,9	9,3	15	99,9	12,0	45	96,9	10,1
<i>N</i> -Acetylvalin	1	97,7	12,9	5	97,3	13,7	15	93,8	14,5
Kyselina argininosukcinátová	1	87,3	6,5	5	84,6	6,9	15	89,2	6,6
Homocitrullin	2	82,9	12,2	10	92,9	9,5	30	104,3	9,1
Sukcinylacetone	1	96,0	10,1	5	98,2	11,0	15	91,9	7,3
<i>N</i> -3-Methylkrotonylglycin	1	114,0	8,1	5	112,4	7,1	15	109,0	6,6
<i>N</i> -Acetylglycin	2	109,4	10,5	10	97,8	11,6	30	100,2	15,1
<i>N</i> -Butyrylglycin	1	111,1	8,3	5	112,3	9,0	15	106,9	7,8
<i>N</i> -Glutaryl glycin	1	97,9	9,1	5	96,5	8,2	15	90,4	10,9
<i>N</i> -Hexanoylglycin	1	95,8	11,4	5	100,9	8,5	15	98,0	13,2
<i>N</i> -3-Fenylpropionylglycin	1	89,6	8,1	5	93,6	7,6	15	99,1	8,6
<i>N</i> -Propionylglycin	1	130,8	12,2	5	115,4	9,7	15	103,7	12,6
<i>N</i> -Suberylglycin	1	103,8	11,4	5	101,1	10,2	15	97,9	13,1
<i>N</i> -Tiglylglycin	1	103,4	6,9	5	103,9	7,7	15	101,9	8,5
<i>N</i> -Valerylglycin	1	107,5	9,7	5	103,6	7,7	15	102,1	10,2
Erythritol	30	106,4	3,9	150	110,8	4,5	450	106,9	3,8
Galaktitol	30	101,3	4,1	150	100,0	4,8	450	98,7	3,3
Galaktosa	30	99,6	12,5	150	95,1	13,1	450	92,8	13,5
Perseitol	1	78,1	13,2	5	76,8	6,3	15	77,4	5,6
Ribitol	10	102,8	4,1	50	102,8	5,0	150	101,4	3,7

Analyt	LQC			MQC			HQC		
	Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)	Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)	Nominální koncentrace (μmol/l)	Správnost (%)	CV (%)
Sedoheptulosa	10	94,9	9,8	50	93,3	11,0	150	89,9	11,3
Stachyosa	2	97,9	16,0	10	99,4	12,2	30	90,4	10,0
Kyselina guanidinooctová	15	109,2	8,5	75	107,7	9,1	225	100,3	11,0
Kreatin	100	96,0	14,8	500	98,3	9,7	1500	98,3	5,9
Kreatinin	150	104,3	4,9	750	103,4	4,2	2250	104,3	4,2
Kyselina sialová	15	105,5	9,0	75	110,8	9,9	225	113,9	6,7

10.7 Příloha 7: MS/MS parametry analytů a interních standardů ve vyvinuté LC-MS/MS metodě

Analyt	Q1 (Da)	Q3 (Da)	RT (min)	Časové okno vybrané reakce (s)	Vážení vybrané reakce	DP (V)	EP (V)	CE (V)	CXP (V)
3-Hydroxypropionát	88,9	59,1	1,62	120	1,0	-5	-10	-14	-5
Methylcitrát	204,9	124,9	4,43	120	1,0	-15	-10	-18	-13
Methylmalonát	116,9	55,0	3,32	120	1,0	-5	-10	-32	-20
Propionylkarnitin	218,1	85,0	5,43	120	1,0	51	10	27	16
Isobutyrylkarnitin	232,0	85,0	6,60	120	1,0	46	10	25	10
Butyrylkarnitin	232,1	85,1	6,78	120	0,1	56	10	29	16
Pivaloylkarnitin	246,1	85,0	8,10	120	1,0	45	10	25	10
2-Methylbutyrylkarnitin	246,1	85,1	8,30	120	1,0	61	10	25	10
Isovalerylkarnitin	246,1	85,0	8,47	120	1,0	36	10	25	10
Valerylkarnitin	246,1	85,0	8,68	120	1,0	41	10	25	10
Propionyl- ² H ₃ -karnitin	221,1	85,1	5,43	120	0,1	51	10	27	16
Butyryl- ² H ₃ -karnitin	235,1	85,0	6,78	120	1,0	56	10	29	16
Isovaleryl- ² H ₉ -karnitin	255,2	85,0	8,45	120	0,1	66	10	29	16