

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Vývoj a validace LC/MS metody pro diagnostiku vybraných  
dědičných metabolických poruch**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Bc. Eliška Ivanovová</b>
Studijní program:	B1501 Biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. RNDr. David Friedecký, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2020

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora	Bc. Eliška Ivanovová
Název práce	Vývoj a validace LC/MS metody pro diagnostiku vybraných dědičných metabolických poruch
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř dědičných metabolických poruch FNOL
Vedoucí práce	doc. RNDr. David Friedecký, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	Dědičné metabolické poruchy jsou vzácná onemocnění, jejichž důsledky bývají často letální. Rychlá diagnostika onemocnění je proto nezbytná pro včasné zahájení léčby. K diagnostice dědičných metabolických poruch se v současné době využívá celé řady metod. V rámci zjednodušení se však nabízí zavedení „univerzální“ metody založené na kapalinové chromatografii v kombinaci s hmotnostní spektrometrií. Z tohoto důvodu byla vyvinuta a validována LC/MS metoda s krátkou dobou analýzy a snadnou přípravou vzorku. Aplikací metody v klinické praxi byla zlepšena diagnostika vybraných dědičných metabolických poruch.
Klíčová slova	Dědičné metabolické poruchy, diagnostika, vývoj a validace, kapalinová chromatografie, hmotnostní spektrometrie
Počet stran	107
Počet příloh	3
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Bc. Eliška Ivanovová
Title of thesis	Development and validation of an LC/MS method for diagnostics of selected inherited metabolic disorders
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory for inherited metabolic disorders FNOL
Supervisor	doc. RNDr. David Friedecký, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	Inherited metabolic disorders are rare diseases with a possible fatal outcome. Prompt diagnostics is necessary for early start of the treatment. Nowadays, there are many methods which can be used for diagnostics of inherited metabolic disorders. To simplify this process, there is an option to create a „universal“ method based on liquid chromatography-mass spectrometry. Therefore, a new LC/MS method was developed and validated. This new method offers a short time of analysis and simple sample preparation. The application of this method has improved the diagnostics of selected inherited metabolic disorders in clinical practice.
Keywords	Inherited metabolic disorders, diagnostics, development and validation, liquid chromatography, mass spectrometry
Number of pages	107
Number of appendices	3
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Davida Friedeckého, Ph.D., za použití citované literatury.

V Olomouci dne .....

## **Poděkování**

Děkuji vedoucímu své diplomové práce, doc. RNDr. Davidu Friedeckému, Ph.D., za odborné vedení této práce, cenné rady, vstřícnost a trpělivost.

Děkuji rovněž RNDr. Jaroslavě Friedecké, Ph.D., a Mgr. Daně Dobešové za pomoc při zpracování práce, Mgr. Haně Janečkové, Ph.D., a Mgr. Štěpánu Kouřilovi za uvedení do systému kapalinové chromatografie a ochotnou pomoc při zpracování dat a RNDr. Evě Hlídkové za zprostředkování standardů.

Velké poděkování patří též mé rodině a přátelům za jejich podporu při studiu.

# Obsah

<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>8</b>
<b>1 Úvod a cíle práce</b> .....	<b>13</b>
<b>2 Teoretická část</b> .....	<b>14</b>
2.1 Dědičné metabolické poruchy .....	14
2.2 Vybrané dědičné metabolické poruchy .....	15
2.2.1 Dědičné poruchy metabolismu purinů .....	17
2.2.2 Dědičné poruchy metabolismu pyrimidinů .....	22
2.2.3 Dědičné poruchy metabolismu kreatinu .....	26
2.2.4 Dědičné poruchy cyklu močoviny .....	29
2.2.5 Dědičné metabolické poruchy související s vylučováním glycinových konjugátů .....	33
2.2.6 Dědičné metabolické poruchy spojené s vylučováním N-acetylovaných derivátů aminokyselin .....	42
2.2.7 Ostatní dědičné metabolické poruchy .....	44
2.3 Metody pro diagnostiku dědičných metabolických poruch .....	47
2.4 Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií .....	47
2.4.1 Kapalinová chromatografie .....	48
2.4.2 Hmotnostní spektrometrie .....	49
2.5 Validace bioanalytické metody .....	53
<b>3 Experimentální část</b> .....	<b>55</b>
3.1 Přístrojové vybavení .....	55
3.2 Chemikálie .....	55
3.3 Příprava zásobních roztoků standardů .....	58
3.4 Příprava směsí značených interních standardů .....	59
3.5 Optimalizace MRM přechodů .....	59
3.5.1 LC/MS analýza směsí standardů .....	60
3.6 Stanovení validačních parametrů – linearita, limit detekce, limit kvantifikace .....	60
3.6.1 Příprava kalibrační směsi purinů a pyrimidinů (PP) .....	61
3.6.2 Příprava kalibrační směsi N-acetylovaných aminokyselin, homocitrulinu, argininosukcinátu a sukcinylacetonu (AMKHAS) .....	61
3.6.3 Příprava kalibrační směsi acylglycinů (ACGLY) .....	62

3.6.4	Příprava kalibrační směsi kreatinu, kreatininu a kyseliny močové (KREA) .....	62
3.6.5	Příprava kalibrační směsi kyseliny oxalové, guanidinoacetátu a kyseliny sialové (OXA) .....	62
3.6.6	Příprava kalibrační směsi cukrů a alkoholů (CA) .....	63
3.7	Stanovení validačních parametrů – opakovatelnost, mezilehlá přesnost a výtěžnost .....	63
3.7.1	Příprava smíšeného vzorku moče .....	64
3.7.2	Příprava směsí pro výrobu QC vzorků a kalibračních standardů .....	64
3.8	Aplikace vyvinuté LC/MS metody na vzorky pacientů s vybranými dědičnými metabolickými poruchami .....	66
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>67</b>
4.1	Experimentální podmínky finální LC/MS metody .....	67
4.2	Vývoj a validace LC/MS metody .....	67
4.2.1	Linearita, LOD a LOQ .....	75
4.2.2	Opakovatelnost, mezilehlá přesnost a výtěžnost .....	77
4.2.3	Diagnostika pacientů s dědičnými metabolickými poruchami vyvinutou LC/MS metodou .....	79
<b>5</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>88</b>
<b>7</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>89</b>
<b>8</b>	<b>Přílohy .....</b>	<b>102</b>

## Seznam zkratek

2D	dvoudimenzionální
3D	trojdimenzionální
3-HIVA-C	3-hydroxyisovalerylkarnitin
ACGLY	směs acylglycinů
ACY1D	deficit aminoacylasy 1
ACY2	aminoacylasa 2
ADA	adenosindeaminasa
ADAD	deficit adenosindeaminasy
ADKD	deficit adenosinkinasy
AdoMet	S-adenosylmethionin
ADP	adenosindifosfát
ADSLD	deficit adenylosukcinátlyasy
AGAT	argininglycinamidinotransferasa
AGATD	deficit AGAT
AICA	aminoimidazolkarboxamid
AICAr	aminoimidazolkarboxamidribosid
AICAR	aminoimidazolkarboxamidribotid
AMK	aminokyselina
AMKHAS	směs N-acetylovaných aminokyselin, homocitrulinu, argininosukcinátu a sukcinylacetonu
AMP	adenosinmonofosfát
APRTD	deficit adeninfosforibosyltransferasy
ARG	hyperargininémie
ASA	argininosukcinátová acidurie
ASPA	aspartoacylasa
ATICD	AICA-ribosidurie
ATP	adenosintrifosfát
BCAA	aminokyseliny s rozvětveným řetězcem
BCAT	aminotransferasa aminokyselin s rozvětveným řetězcem
BCKDC	komplex dehydrogenasy 2-oxokyselin s rozvětveným řetězcem
BKTD	deficit beta-ketothiolasy
BTDD	deficit biotinidasy
CA	směs cukrů a alkoholů



cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CD	Canavanova choroba
C-E	kapilární elektroforéza
CE	kolizní energie
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CMP	cytidinmonofosfát
CoA	koenzym A
CP	karbamoylfosfát
CRTR	Na <sup>+</sup> a Cl <sup>-</sup> dependentní přenašeč kreatinu
CRTR-D	deficit přenašeče kreatinu
CSF	cerebrospinální tekutina
CTLN1	citrulinémie I. typu
CTP	cytidintrifosfát
CXP	výstupní potenciál
DHPD	dihydropyrimidinurie
DMP	dědičné metabolické poruchy
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DP	deklasterační potenciál
DPDD	deficit dihydropyrimidindehydrogenasy
dTMP	deoxythymidinmonofosfát
dUMP	deoxyuridinmonofosfát
EE	ethylmalonová encefalopatie
EP	vstupní potenciál
ESI	ionizace elektrosprejem
FAD	flavinadenindinukleotid
FBS	Fanconi-Bickelův syndrom
GALED	galaktosémie III. typu
GALKD	galaktosémie II. typu
GALTD	galaktosémie I. typu
GAMT	guanidinoacetátmethyltransferasa
GAMTD	deficit GAMT
GC	plynová chromatografie
GC/MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
GMP	guanosinmonofosfát
GTP	guanosintrifosfát

H <sup>1</sup> NMR	protonová nukleární magnetická rezonance
HAWK	hawkinsinurie
HCSD	deficit holokarboxylasy-synthetasy
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie
HMGCLD	deficit 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyasy
HOA	dědičná orotová acidurie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
HQC	horní koncentrační bod QC
HT1	tyrosinémie I. typu
IBDD	deficit isobutyryl-CoA dehydrogenasy
IC	infantilní cystinóza
ICR	iontová cyklotronová rezonance
IMP	inosinmonofosfát
IS	interní standard
IS-Ado	<sup>13</sup> C <sub>5</sub> -Adenosin
IS-GAA	D <sub>2</sub> -Guanidinoacetát
IS-Gal	<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -Galaktitol
IS-HG	<sup>13</sup> C <sub>2</sub> <sup>15</sup> N-Hexanoylglycin
IS-Hx	D <sub>2</sub> -Hypoxanthin
IS-Kr	D <sub>3</sub> -Kreatinin
IS-Krea	D <sub>3</sub> -Kreatin
IS-OA	<sup>15</sup> N <sub>2</sub> -Kyselina orotová
IS-SA	<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -Kyselina sialová
IS-U	<sup>15</sup> N <sub>2</sub> -Uracil
IS-X	<sup>15</sup> N <sub>2</sub> -Xanthin
IVA	isovalerová acidurie
KREA	směs kreatinu, kreatininu a kyseliny močové
LC	kapalinová chromatografie
LC/MS	kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií
LCAD	acyl-CoA dehydrogenasa mastných kyselin s dlouhým řetězcem
LLOQ	dolní mez kvantifikace
LOD	mez detekce
LOQ	mez kvantifikace
LQC	nízký koncentrační bod QC
m/z	poměr hmota/náboj

MCAD	acyl-CoA dehydrogenasa mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem
MCADD	deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem
MCCD	deficit 3-methylkrotonyl-CoA karboxylasy
MCEED	methylmalonová acidurie způsobená deficitem methylmalonyl-CoA epimerasy
MHBDD	deficit 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenasy
MK	mastná kyselina
MMA	methylmalonová acidurie
MNGIE	mitochondriální neurogastrointestinální encefalomyopatie
MoCDA	deficit molybdenového kofaktoru, typ A
MoCDB	deficit molybdenového kofaktoru, typ B
MoCDC	deficit molybdenového kofaktoru, typ C
MQC	střední koncentrační bod QC
MRM	monitorování více reakcí
MS	hmotnostní spektrometrie
mtDNA	mitochondriální DNA
NAD <sup>+</sup>	nikotinamidadenindinukleotid
NP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie na normální fázi
ORNT1D	deficit přenašeče ornithinu, HHH syndrom
OTCD	deficit ornithintranskarbamyly
OXA	směs kyseliny oxalové, guanidinoacetátu a kyseliny sialové
PDNS	purinová <i>de novo</i> syntéza
PNPD	deficit purinnukleosidfosforylasy
PP	směs purinů a pyrimidinů
PRPP	fosforibosylpyrofosfát
Q	kvadrupólový analyzátor
Q1	prekurzorový ion
Q-1	první kvadrupól
Q-2	druhý kvadrupól
Q3	produktový ion
Q-3	třetí kvadrupól
QC	vzorek kontroly kvality
QQQ	trojitý kvadrupól
RNA	ribonukleová kyselina

RP-HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi
RT	retenční čas
S/N	poměr signálu k šumu
S-Ado	sukcinyladenosin
SAICAr	sukcinylaminoimidazolkarboxamidribosid
SBCADD	deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým/rozvětveným řetězcem
SCAD	acyl-CoA dehydrogenasa mastných kyselin s krátkým řetězcem
SCADD	deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým řetězcem
SCID	těžká kombinovaná imunodeficience
SD	nemoc Salla
SDH	hyperlysinémie a saccharopinurie
SRM	monitorování vybrané reakce
TBA	kyselina thiobarbiturová
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
TOF	průletový analyzátor
UHPLC	ultra-vysokoučinná kapalinová chromatografie
ULOQ	horní mez kvantifikace
UMP	uridinmonofosfát
UPB1D	deficit $\beta$ -ureidopropionasy
UPLC	ultraúčinná kapalinová chromatografie
URCTU	uridin-cytidinurie
UTP	uridintrifosfát
VLCAD	acyl-CoA dehydrogenasa mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem
XAN1	xanthinurie I. typu
XAN2	xanthinurie II. typu

# 1 Úvod a cíle práce

Dědičné metabolické poruchy (DMP) představují skupinu více než tisíce geneticky podmíněných chorob, jejichž důsledky bývají často letální. Projevují se celou řadou příznaků, které mohou být různě závažné, což společně s jejich nízkou incidencí ztěžuje včasnou diagnostiku DMP (Pampols, 2010; Gilbert-Barness and Farrell, 2017; Arnold, 2018).

Diagnostika DMP je v laboratořích prováděna stanovením biomarkerů na úrovni genů, funkčních proteinů (např. enzymů) nebo metabolitů. Nejčastěji jsou diagnostikovány metabolity, které jsou přítomny v moči, krvi či cerebrospinalní tekutině. Jedná se o substráty, meziproducty a produkty enzymových reakcí (Pampols, 2010).

Metabolity využívané k diagnostice DMP se liší chemickou strukturou a v tělních tekutinách se vyskytují v širokém koncentračním rozmezí (až 8 řádů). V mnoha případech je nutné od sebe odlišit strukturní izomery. Proto je k diagnostice DMP nezbytné využívat metody s vysokou frakcionační kapacitou a citlivostí. Nejčastěji jsou používány chromatografické metody v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (Pampols, 2010). Běžně užívanou separační metodou je mimo jiné např. kapilární elektroforéza nebo chromatografie na tenké vrstvě (Adam *et al.*, 2002; Verheijen, 2008). Každá z těchto metod se však využívá pro analýzu skupin, příp. několika metabolitů, pro něž je charakteristická stejná funkční skupina. Tato skutečnost se podepisuje na nedostatečné univerzálnosti zmíněných metod, jelikož není možné určit jedinou analýzou metabolity různého strukturního složení v rámci celkového metabolismu.

Cílem této diplomové práce bylo optimalizovat a validovat LC/MS metodu pro diagnostiku biomarkerů vybraných DMP v moči. Mezi tyto metabolity patřily puriny, pyrimidiny, N-acetylované aminokyseliny, glycinové konjugáty, homocitrulin, argininosukcinát, sukcinylaceton, kreatin, kreatinin, guanidinoacetát, kyselina oxalová, kyselina sialová, cukry a polyoly.

Validovaná metoda byla následně aplikována na vzorky zdravých jedinců a pacientů s vybranými DMP.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Dědičné metabolické poruchy

Termín DMP je označení pro velkou skupinu vzácných chorob, které vznikají v důsledku změny na úrovni DNA či RNA (Šťastná, 2008; Pampols, 2010). Z molekulárního pohledu dochází k mutaci v genomu, čímž se rozumí delece, inserce, opakování nebo přemístění jednoho či více párů nukleotidů v DNA. Dojde-li k takovému poškození, nemůže být gen správně exprimován, což má za následek, že daný protein nevzniká, eventuálně se tvoří s pozměněnou strukturou nefunkční. Jestliže měla být původní funkcí tohoto defektního proteinu katalýza enzymové reakce v metabolismu člověka, potom dochází k rozvoji metabolické poruchy označované jako enzymopatie. Ne všechny geny ale kódují proteiny s enzymovou funkcí. Ke vzniku metabolických poruch může dojít rovněž při defektu krevních bílkovin neenzymové povahy, strukturních proteinů buněčných membrán, receptorů, regulačních proteinů, příp. proteinů, jež jsou součástí iontových kanálů (Racek, 2006; Nussbaum *et al.*, 2015).

V dnešní době je počet těchto poruch vyšší než 1 000. Je důležité si uvědomit, že při takovém množství poruch není diagnostika vůbec jednoduchá a že vinou opožděné diagnózy jsou dopady těchto nemocí smrtelné (Pampols, 2010; Arnold, 2018).

Charakteristickým znakem těchto poruch je zejména velká diverzita symptomů a jejich kombinací. Klinické příznaky některých DMP mohou být vysoce specifické, přesto na ně nelze v diagnostice zcela spoléhat. Vyskytne-li se tedy u pacienta daný klinický symptom, je nezbytné provést alespoň základní laboratorní diagnostiku, která představuje rutinní biochemické vyšetření (stanovení acidobazické rovnováhy, stanovení hladin glukosy, amoniaku, kyseliny močové, ketolátek apod.), rutinní hematologické vyšetření (krevní obraz, hemokoagulace, cytologie) a řadu specifických testů (vyšetření aminokyselin a organických kyselin, vyšetření metabolismu purinů a pyrimidinů, vyšetření poruch metabolismu kreatinu apod.) (Šťastná, 2008).

Výskyt DMP v populaci je poměrný častý, ačkoliv incidence jednotlivých DMP nedosahuje velkých čísel. Odhaduje se, že celková incidence všech DMP se pohybuje v rozmezí 1/1000–1/600, zatímco incidence jednotlivých DMP se udává v rozmezí 1/10 000–1/100 000 – s výjimkou velmi vzácných poruch (Šťastná, 2008).

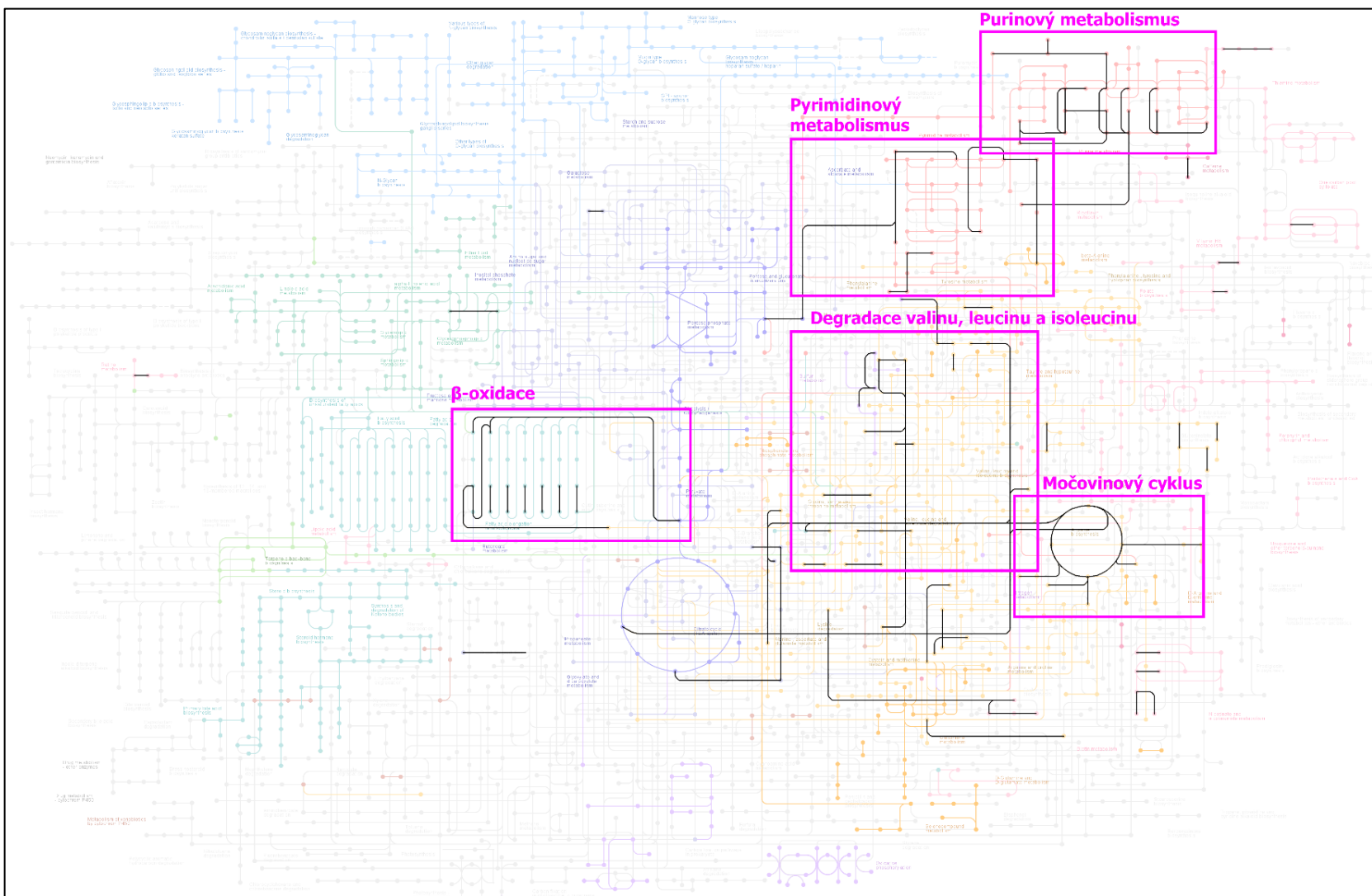
Významným rysem těchto poruch je převládající autosomálně recesivní dědičnost. Při tomto typu dědičnosti se porucha projevuje pouze u homozygotně recesivních jedinců, kdežto heterozygoti (přenašeči defektního enzymu) jsou většinou klinicky zdraví. Velmi

vzácně se u některých poruch vyskytuje i dědičnost autosomálně dominantní, X-vázaná recesivní nebo X-vázaná dominantní (Racek, 2006; Wertheim-Tysarowska *et al.*, 2015).

## 2.2 Vybrané dědičné metabolické poruchy

Pro vývoj metody byly vybrány metabolity, jež jsou diagnosticky významné pro více než 50 DMP. Poruchy jsou pro přehlednost rozděleny do tabulek dle metabolismu: purinový metabolismus (Tab. 1), pyrimidinový metabolismus (Tab. 2), metabolismus kreatinu (Tab. 3), močovinový cyklus (Tab. 4),  $\beta$ -oxidace (Tab. 5) a metabolismus aminokyselin s rozvětveným řetězcem (degradace valinu, leucinu a isoleucinu) (Tab. 6). Poruchy spojené s vylučováním N-acetylovaných aminokyselin přináší Tab. 7. Ostatní poruchy, dotýkající se mnoha metabolických drah, pak sumarizuje Tab. 8.

K významným metabolickým dějům (metabolismus purinů, metabolismus pyrimidinů, močovinový cyklus,  $\beta$ -oxidace a metabolismus aminokyselin s rozvětveným řetězcem) jsou navíc přiloženy metabolické mapy znázorňující lokalizaci jednotlivých enzymových defektů v daných dráhách (Obr. 2–6). Enzymy zastoupené svým kódovým číslem podle tzv. EC klasifikace (z angl. Enzyme Commission) (Tab. 1–6), zodpovědné za patofyziologii, jsou v mapách pro přehlednost označeny žlutě. Celkový přehled zachycující míru zasažení lidského metabolismu v rámci vybraných DMP je znázorněn na Obr. 1.



Obr. 1: Celková mapa humánního metabolismu, v němž se černě značené dráhy podílejí na vzniku vybraných DMP. Ve fialových oblastech jsou označeny jednotlivé metabolické dráhy. Zdroj: KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)



### 2.2.1 Dědičné poruchy metabolismu purinů

Purinové nukleotidy (složené z adeninu nebo guaninu, pětiuhlíkatého monosacharidu a jednoho či více zbytků kyseliny fosforečné) se řadí mezi základní buněčné složky, jelikož v lidském těle plní mnoho významných biologických funkcí. Účastní se např. přenosu energie (ATP, GTP), regulace metabolismu a syntézy DNA a RNA, jsou součástí řady kofaktorů (NAD<sup>+</sup>, FAD, koenzym A, aj.) a slouží i jako signální molekuly (cAMP, cGMP). Metabolismus purinů lze rozdělit do 3 metabolických drah (Pelley, 2012; Nyhan and Friedmann, 2017).

První z nich – biosyntetická dráha neboli purinová *de novo* syntéza (PDNS) – zahrnuje 10 kroků, během nichž je klíčový metabolit fosforibosylpyrofosfát (PRPP) převeden na inosinmonofosfát (IMP). PRPP vzniká z ATP a ribosy-5-fosfátu, meziprojektu pentózofosfátového cyklu, jako produkt enzymové reakce katalyzované fosforibosylpyrofosfátsynthetasou (EC 2.7.6.1). Ten je po reakci s glutaminem přeměněn na 5-fosforibosyl-1-amin, jenž v následných reakcích přijímá atomy C, N, H, což vyústí ve vytvoření základu purinového jádra pro IMP. Z něho pak může v dalších krocích vznikat adenosinmonofosfát (AMP) a guanosinmonofosfát (GMP) (Masopust a Průša, 1999; Koolman and Roehm, 2005). AMP a GMP jsou využity v dalších metabolických reakcích, díky nimž dochází ke vzniku di- a trifosfátů, deoxyribonukleotidů a nukleových kyselin (RNA a DNA) (Van den Berghe *et al.*, 2008).

Druhá metabolická dráha popisuje vznik kyseliny močové – konečného produktu metabolismu DNA, RNA a volných nukleotidů – z IMP, AMP a GMP. Jedná se tedy o katabolickou dráhu (Van den Berghe *et al.*, 2008).

Úlohou třetí metabolické dráhy, tzv. záchranné, je recyklace purinových bazí hypoxanthinu, guaninu a adeninu na odpovídající mononukleotidy (IMP, GMP, AMP) za spotřeby jedné molekuly ATP (Masopust a Průša, 1999; Van den Berghe *et al.*, 2008). Na této přeměně se podílí hypoxanthinoguaninfosforibosyltransferasa (EC 2.4.2.8) katalyzující vznik IMP a GMP a adeninfosforibosyltransferasa (EC 2.4.2.7) umožňující tvorbu AMP (Torres and Puig, 2007). Pro organismus představuje tato dráha velkou úsporu energie ve srovnání s energetickou náročností biosyntetické dráhy (Ledvina *et al.*, 2005).

Z popisu metabolických drah je zřejmá složitost propojení na sebe navazujících procesů. Z toho vyplývá, že jakékoliv narušení procesu může vést ke klinickým následkům. Zasažena může být funkce vylučovacího, pohybového, nervového, imunitního či oběhového systému. Různorodost klinických projevů je dána rozmanitostí biologických funkcí purinů. Jsou zde patrné velké interindividuální rozdíly v manifestaci jednotlivých poruch. V některých případech se objevují průkazné klinické příznaky, jako jsou např. ledvinové

a močové kameny, hyperurikémie, hypourikémie a dna. Ne vždy se ovšem poruchy manifestují tak průkazně, což ztěžuje diagnostiku onemocnění. Poruchy metabolismu purinů se projevují především u dětí, avšak nedá se vyloučit výskyt onemocnění rovněž u pacientů pokročilejšího věku (Bierau and Šebesta, 2014).

Meziprodukty purinového metabolismu jsou jakožto diagnostické biomarkery významných DMP shrnuty spolu s příslušnými defektními enzymy v Tab. 1. Lokalizace enzymových defektů v jednotlivých metabolických drahách je zachycena v metabolické mapě na Obr. 2.

V biosyntetické purinové dráze (Obr. 2) jsou žlutě označeny 3 enzymové defekty, které jsou diagnosticky specifické pro 2 onemocnění – deficit adenylosukcinátlyasy (ADSLD) a aminoimidazolkarboxamid (AICA)-ribosidurii. ADSLD (Jurecka *et al.*, 2015) způsobuje hromadění nukleotidů sukcinylaminoimidazolkarboxamidribosidu (SAICAr, z angl. succinylaminoimidazole carboxamide riboside) a sukcinyladenosinu (S-Ado) v plasmě, moči a mozkomíšním moku (Tab. 1) (Nyhan and Friedmann, 2017). Porucha se projevuje psychomotorickou retardací, mikrocefálií, epileptickými záchvaty a autismem (Jurecka *et al.*, 2015).

Onemocnění zvané AICA-ribosidurie (ATICD; Hornik *et al.*, 2006) se vyznačuje vysokou hladinou aminoimidazolkarboxamidribotidu (AICAR, z angl. aminoimidazole carboxamide ribotide) v krvi. V moči je přítomna jeho defosforylovaná forma – aminoimidazolkarboxamidribosid (AICAr, z angl. aminoimidazole carboxamide riboside) (Tab. 1) (Marie *et al.*, 2004). Typickými klinickými příznaky této poruchy jsou dysmorfní rysy, vrozená slepota, epilepsie a hluboká mentální retardace (Nyhan and Friedmann, 2017).

V katabolické dráze jsou na Obr. 2 žlutě označeny 2 enzymy podílející se na vzniku jednoho z DMP, a sice xanthinurie. Toto onemocnění se rozlišuje na dva druhy – xanthinurii I. typu (XAN1; Ichida *et al.*, 2012) a xanthinurii II. typu (XAN2; Zannolli *et al.*, 2003), lišící se enzymovým defektem. V konečném důsledku nicméně dochází k identickému projevu se těchto poruch. Diagnostickými biomarkery XAN1 a XAN2 jsou xanthin, jehož koncentrace je v moči vysoká, a kyselina močová, jejíž hladina v moči je naopak velmi nízká (Tab. 1). Xanthin je extrémně nerozpustný purin, což se projevuje na klinických příznacích. Tato onemocnění jsou spojena s xanthinovými kameny, krystalurií, hematurii, urolitiázou, renální kolikou a akutním ledvinovým selháním (Ichida *et al.*, 2012; Šebesta *et al.*, 2018).

Prvním onemocněním záchranné dráhy (Obr. 2) je deficit purinnukleosidfosforylasy (PNPD; Nyhan and Friedmann, 2017), při němž se hromadí charakteristické metabolity inosin, deoxyinosin, guanosin a deoxyguanosin v moči a dle stupně abnormality odráží

závažnost onemocnění. Vodítkem ke správné diagnostice může být též snížená hladina kyseliny močové v séru a moči (Tab. 1) (Wortmann *et al.*, 1979; Nyhan and Friedmann, 2017). PNPJ je primární imunodeficiencí, charakteristickou sníženým počtem T-lymfocytů a variabilní abnormalitou buněčné imunity. Následkem poškozené imunity pacienti prodělávají opakované infekce, v horším případě vede onemocnění ke ztrátám neurologických funkcí, mentální retardaci, autoimunitní hemolytické anémii, potažmo k maligním onemocněním (Fekrvand *et al.*, 2019).

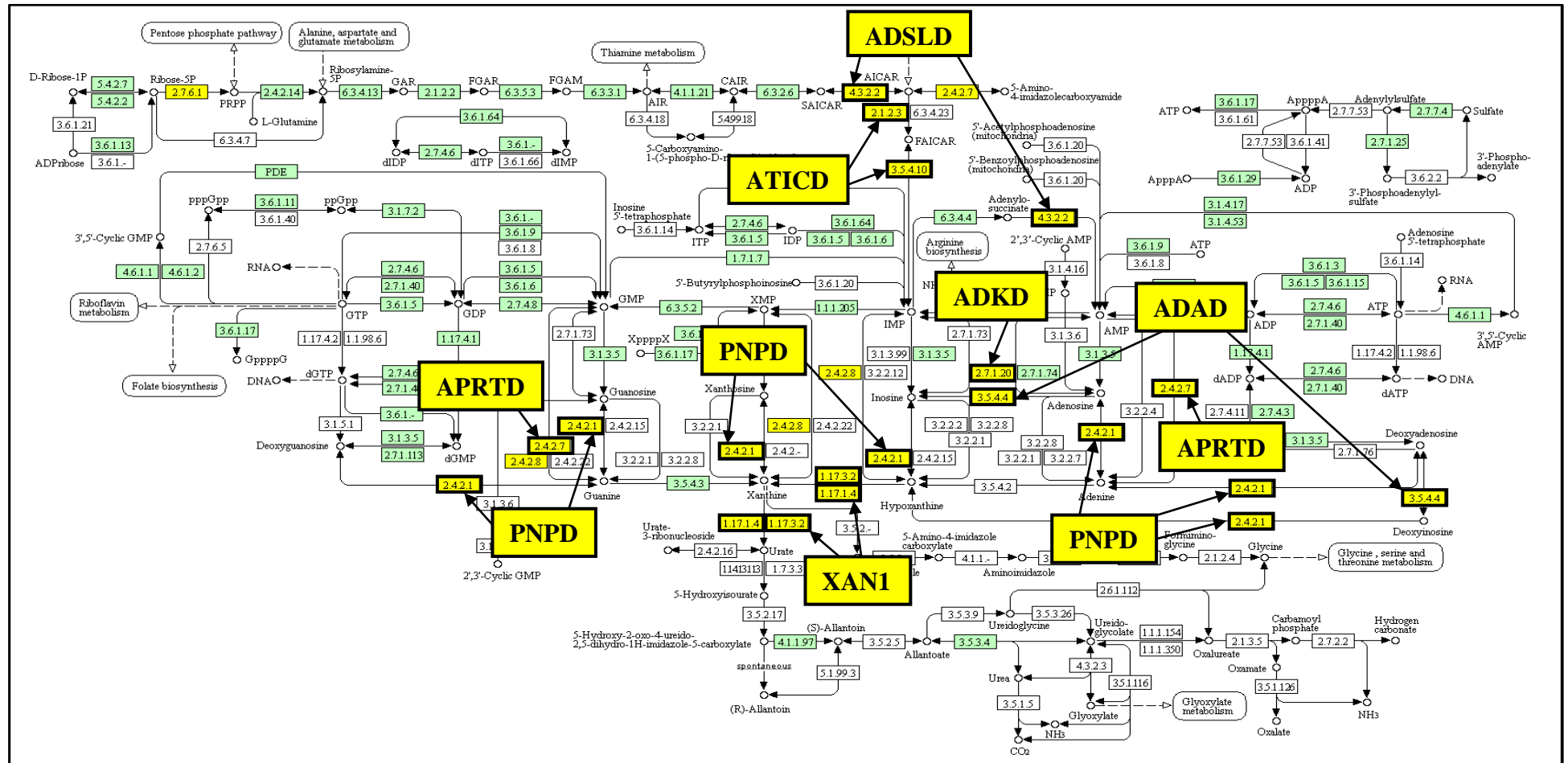
Dalším onemocněním záchranné dráhy je deficit adeninfosforibosyltransferasy (APRTD; Nyhan and Friedmann, 2017), jehož důsledkem dochází ke vzniku 2,8-dihydroxyadeninu, tj. vysoce nerozpustné sloučeniny, která je vylučována močí (Tab. 1) (Bollée *et al.*, 2010). Lehčí forma onemocnění se projevuje opakovanými záněty močových cest, krystalurií, hematurií, nefrotiliázou, těžší forma pak chronickým, popř. akutním renálním selháním. Asymptomatický průběh onemocnění je taktéž zcela běžný (Runolfsdottir *et al.*, 2018).

Primární imunodeficeince – deficit adenosindeaminasy (ADAD; Cagdas *et al.*, 2018) – je charakteristická zvýšenou koncentrací adenosinu a deoxyadenosinu v tělních tekutinách (Tab. 1). Hladiny těchto metabolitů v moči zdravých jedinců jsou téměř nedetekovatelné. Přibližně třetina ADA-deficientních pacientů bývá postižena také těžkou kombinovanou imunodeficiencí (SCID, z angl. severe combined immunodeficiency disease), při níž jsou obě složky imunity (buněčná, humorální) narušeny. Pacienti s ADAD jsou klinicky nerozeznatelní od pacientů s kombinovanou formou onemocnění. Jelikož jsou pacienti se sníženou imunitou náchylní na infekce, typickými projevy onemocnění jsou např. pneumocystóza, virová pneumonie nebo kandidóza. Může docházet k růstu lymfomů, jakož i ke ztrátám neurologických funkcí (Nyhan and Friedmann, 2017).

Posledním vybraným onemocněním metabolismu purinů je deficit adenosinkinasy (ADKD; Staufner *et al.*, 2015). U pacientů s touto poruchou dochází k akumulaci adenosinu v moči (Tab. 1). Poněvadž je toto onemocnění úzce spjato s metabolismem methioninu, řadí se mezi diagnostické krevní/plasmatické biomarkery intermediáty methioninového cyklu (methionin, S-adenosylmethionin (AdoMet) a S-adenosylhomocystein) (Staufner *et al.*, 2015). Novorozenci postižení poruchou se rodí se symptomy sepse, dýchacími potížemi a novorozeneckou žloutenkou. Mohou se ale rozvíjet i další symptomy jako např. epilepsie, svalová hypotonie, jaterní dysfunkce a mentální retardace (Alhusani *et al.*, 2019).

Tab. 1: Vybrané dědičné poruchy metabolismu purinů a jejich močové biomarkery zahrnuté ve vyvinuté metodě.

<i>Onemocnění</i>	<i>Zkratka onemocnění</i>	<i>Mutovaný gen</i>	<i>Enzym/přenašeč</i>	<i>EC</i>	<i>Diagnostický biomarker</i>
Deficit adenylosukcinátlyasy	ADSLD	<i>ADSL</i>	Adenylosukcinátlyasa	4.3.2.2	SAICAr S-Ado
AICA-ribosidurie	ATICD	<i>ATIC</i>	AICAR-transformylasa/IMP-cyklohydrolasa	2.1.2.3 3.5.4.10	AICAr
Xanthinurie I. typu	XAN1	<i>XOR</i>	Xanthinoxidoreduktasa	1.17.1.4 1.17.3.2	Xanthin Kyselina močová
Xanthinurie II. typu	XAN2	<i>HMCS</i>	Molybdenkofaktorsulfurtransferasa	2.8.1.9	Xanthin Kyselina močová
Deficit purinnukleosidfosforylasy	PNPD	<i>PNP</i>	Purinnukleosidfosforylasy	2.4.2.1	Inosin Deoxyinosin Guanosin Deoxyguanosin Kyselina močová
Deficit adeninfosforibosyltransferasy	APRTD	<i>APRT</i>	Adeninfosforibosyltransferasa	2.4.2.7	2,8-Dihydroxyadenin
Deficit adenosindeaminasy	ADAD	<i>ADA</i>	Adenosindeaminasa	3.5.4.4	Adenosin Deoxyadenosin
Deficit adenosinkinasy	ADKD	<i>ADK</i>	Adenosinkinasa	2.7.1.20	Adenosin



Obr. 2: Mapa purinového metabolismu s barevně vyznačenými enzymy (žlutě) podléjícími se na vzniku vybraných DMP. Rámceky označují enzymový/é defekt/y spojený/é s příslušnou poruchou (Tab. 1). Zdroj: KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

### 2.2.2 Dědičné poruchy metabolismu pyrimidinů

Pyrimidinové báze (cytosin, thymin a uracil) jsou, stejně jako purinové, přítomny ve všech živých organismech. Patří mezi základní buněčné složky, které se podílejí na významných biologických procesech. Pyrimidinové nukleotidy mohou být využity jako stavební jednotky genetického kódu ve formě DNA a RNA, při energetickém přenosu a metabolické regulaci. Metabolismus pyrimidinových nukleotidů lze taktéž rozdělit do 3 metabolických drah, podobně jako u purinů (Bierau and Šebesta, 2014; Nyhan and Friedmann, 2017).

Biosyntetická dráha zahrnuje 6 mezikroků, během nichž je karbamoylfosfát přes orotát přeměněn na uridinmonofosfát (UMP, Obr. 3). Ten se po převedení na uridintrifosfát (UTP) stává prekurzorem syntézy – cytidintrifosfátu (CTP). Deoxyribonukleotidy, stavební jednotky DNA, vznikají redukcí odpovídajících ribonukleotidů zprostředkovanou ribonukleotidreduktasou (EC 1.17.4.1). *De novo* syntéza thyminových nukleotidů zahrnuje pouze deoxyribonukleotidy. Prekurzorem deoxythymidinmonofosfátu (dTMP) je deoxyuridinmonofosfát (dUMP). Tato přeměna je katalyzována thymidylátsynthasou (EC 2.1.1.45).

Katabolickou dráhou dochází k odbourávání UMP, cytidinmonofosfátu (CMP) a dTMP za vzniku meziproductů citrátového cyklu –  $\beta$ -alaninu a  $\beta$ -aminoisobutyrátu. Konečným produktem katabolismu pyrimidinů není na rozdíl od purinů kyselina močová, nýbrž  $\text{NH}_4^+$  vstupující do močovinnového cyklu (Löffler *et al.*, 2005; Van den Berghe *et al.*, 2008).

Záchranná dráha (recyklace bází) popisuje přeměnu volných pyrimidinových bází (cytosinu a thyminu) – vznikajících při degradaci DNA – na UMP a dTMP (Nelson and Cox, 2008).

Klinická manifestace poruch metabolismu pyrimidinů může být stejně tak různorodá, jako je tomu u poruch metabolismu purinů (kapitola 2.2.1) (Bierau and Šebesta, 2014).

V Tab. 2 jsou shrnuty intermediáty pyrimidinového metabolismu a odpovídající defektní enzymy, které jsou diagnostickým biomarkerem významných onemocnění metabolismu pyrimidinů. Metabolická mapa na Obr. 3 zobrazuje lokalizaci patofyziologie v jednotlivých metabolických drahách.

V biosyntetické dráze jsou to 2 enzymy (označeny žlutě), jež jsou diagnosticky specifické právě pro jedno významné onemocnění, a sice dědičnou orotovou acidurii (HOA; Suttle *et al.*, 1988; Wortmann *et al.*, 2017). Tu je možné odhalit analýzou moči, ve které se hromadí kyselina orotová (Tab. 2). Může krystalizovat v ledvinách, což většinou končí jejich vážným poškozením. Současně vzniká deficit pyrimidinů, projevující se při syntéze DNA. Dochází k poruchám dělení buněk, např. v červené krevní řadě

se deficit projevuje megaloblastickou anémií, v bílé leukopenií. Dochází také k poruchám růstu a psychomotorické retardaci (Van den Berghe *et al.*, 2008; Wortmann *et al.*, 2017).

Prvním onemocněním katabolismu pyrimidinů (Obr. 3) je mitochondriální neurogastrointestinální encefalomyopatie (MNGIE; Filosto *et al.*, 2018). Důsledkem této enzymopatie dochází k nerovnováze v množství nukleotidů potřebných pro replikaci mitochondriální (mtDNA). Vzniká tím nedostatečné množství mtDNA, a proto dochází k poruše mitochondriálního energetického metabolismu, projevující se zejména na úrovni nervosvalového přenosu. Klinicky se MNGIE projevuje hlavně v gastrointestinálním a nervovém systému. Je pro ni typická zvýšená hladina thymidinu a 2-deoxyuridinu v plasmě a moči (Tab. 2) (Honzík *et al.*, 2006; Barness and Wong, 2017; Filosto *et al.*, 2018).

Dalším významným onemocněním pyrimidinového katabolismu je deficit dihydropyrimidindehydrogenasy (DPDD; Fleger *et al.*, 2017), který vede ke kumulaci uracilu a thyminu v moči (Tab. 2), krvi a mozkomíšním moku. Klinické projevy onemocnění jsou různě závažné – od závažných odchylek psychomotorického vývoje až po zcela bezpříznakové jedince (Van Kuilenburg *et al.*, 1999; Van den Berghe *et al.*, 2008).

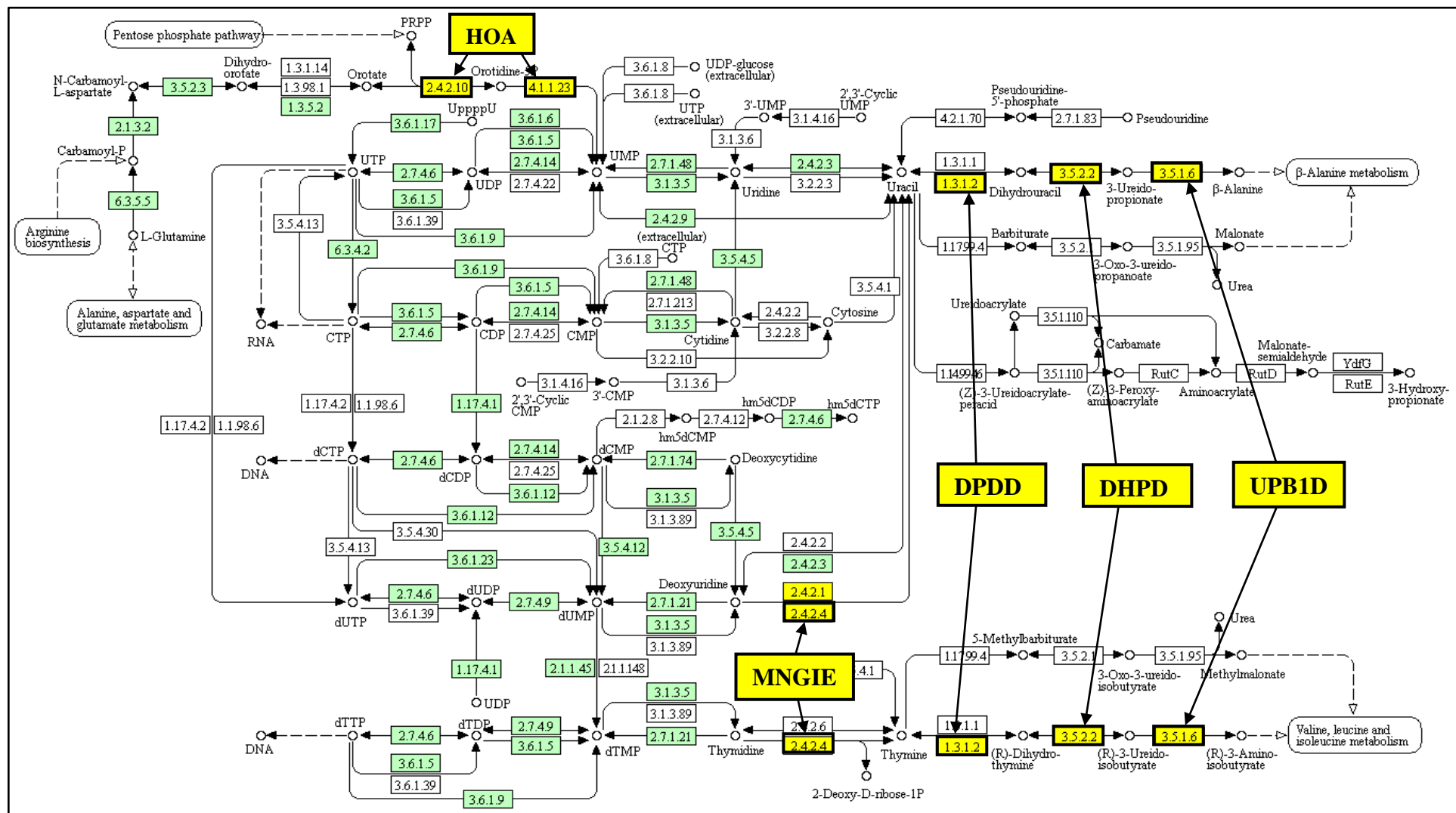
Onemocnění zvané dihydropyrimidinurie (DHPD; Van Kuilenburg *et al.*, 2010) zapříčiňuje akumulaci dihydrouracilu a dihydrothyminu v tělních tekutinách, v malém množství i uracilu a thyminu (Tab. 2). Klinicky se projevuje epilepsií, mentální retardací a mikrocefalií, což je dáno tím, že následkem enzymopatie nevznikají produkty katabolické dráhy ( $\beta$ -alanin a  $\beta$ -aminoisobutyryát), které mají neuroprotektivní účinky (Van Kuilenburg *et al.*, 2010; Harris, 2015).

Posledním vybraným onemocněním metabolismu pyrimidinů je deficit  $\beta$ -ureidopropionasy (UPB1D; Van Kuilenburg *et al.*, 2004). Jeho následkem se v plasmě a moči pacientů hromadí 3-ureidopropionát a 3-ureidoisobutyryát, látky schopné inhibice dihydropyrimidinasy. V důsledku její inhibice dochází rovněž k mírnému zvýšení hladin dihydrouracilu a dihydrothyminu v moči (Tab. 2). Klinické projevy jsou totožné s těmi u DHPD (Fang *et al.*, 2019).

Tab. 2: Vybrané dědičné poruchy metabolismu pyrimidinů a jejich močové biomarkery zahrnuté ve vyvinuté metodě.

<i>Onemocnění</i>	<i>Zkratka onemocnění</i>	<i>Mutovaný gen</i>	<i>Enzym</i>	<i>EC</i>	<i>Diagnostický biomarker</i>
Dědičná orotová acidurie	HOA	<i>UMPS</i>	Uridin-5'-monofosfátsynthasa	2.4.2.10 4.1.1.23	Kyselina orotová
Mitochondriální neurogastrointestinální encefalomyopatie	MNGIE	<i>TYMP</i>	Thymidinofosforylasa	2.4.2.4	Thymidin 2-Deoxyuridin
Deficit dihydropyrimidindehydrogenasy	DPDD	<i>DPYD</i>	Dihydropyrimidindehydrogenasa	1.3.1.2	Uracil Thymin
Dihydropyrimidinurie	DHPD	<i>DPYS</i>	Dihydropyrimidinasa	3.5.2.2	Dihydrouracil Dihydrothymin Uracil Thymin
Deficit $\beta$ -ureidopropionasy	UPB1D	<i>UPBI</i>	$\beta$ -ureidopropionasa	3.5.1.6	Dihydrouracil Dihydrothymin





Obr. 3: Mapa pyrimidinového metabolismu s barevně vyznačenými enzymy (žlutě) podílejícími se na vzniku vybraných DMP. Rámečky označují enzymový/é defekt/y spojený/é s příslušnou poruchou (Tab. 2). Zdroj: KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

### 2.2.3 Dědičné poruchy metabolismu kreatinu

Kreatin neboli N-methylguanidinoctová kyselina je dusíkatá látka syntetizující se ze dvou aminokyselin – argininu a glycinu. Významnou funkcí kreatinu je jeho účast při metabolismu svalové tkáně. V klidovém stavu dochází k jeho reverzibilní fosforylaci za spotřeby ATP. Produktem reakce je kreatinfosfát a adenosindifosfát (ADP). Při zvýšené, resp. intenzivní svalové činnosti pak kreatinfosfát slouží jako pohotovostní jednotka pro tvorbu vysoce energetického fosfátu – ATP. Reakce jsou v obou směrech katalyzované kreatinkinasou (EC 2.7.3.2). Malé množství kreatinu a kreatinfosfátu však podstupuje ireverzibilní neenzymatickou reakci (samovolnou dehydrataci a cyklizaci), při níž vzniká kreatinin, který již nemůže být fosforylován. Kreatinin je vylučován močí jakožto konečný produkt kreatinu a kreatinfosfátu (Koolman and Roehm, 2005; Kodíček *et al.*, 2015).

K syntéze kreatinu dochází ve dvou krocích. V první enzymové reakci, kterou katalyzuje argininglycinamidinotransferasa (AGAT, EC 2.1.4.1), dochází k přenosu guanidinové skupiny argininu na glycin, čímž vzniká guanidinoacetát. Ten je v další fázi methylován pomocí guanidinoacetátmethyltransferasy (GAMT, EC 2.1.1.2) a koenzymu AdoMet, což vede k syntéze kreatinu (Koolman and Roehm, 2005). Kreatin je díky vysoké aktivitě enzymů AGAT a GAMT syntetizován v ledvinách, pankreatu a játrech. Do mozku, srdce a svalů, kde je nejvíce využíván, se přenáší krevním řečištěm pomocí  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  dependentního přenašeče kreatinu (CRTR) (Stöckler-Ipsiroglu and Salomons, 2008).

V dnešní době jsou známy 3 poruchy metabolismu kreatinu týkající se buď samotné syntézy kreatinu, anebo jeho transportu. Intermediáty metabolismu kreatinu, diagnostické biomarkery DMP a odpovídající defektní enzymy/přenašeč jsou shrnuty v Tab. 3.

Mezi poruchy syntézy kreatinu se řadí autosomálně recesivní deficit AGAT a deficit GAMT. Deficit AGAT (AGATD; Stöckler-Ipsiroglu *et al.*, 2015) je zodpovědný za sníženou produkci guanidinoacetátu a následně kreatinu, což se odráží na jejich snížených hladinách v plasmě a moči (Tab. 3). Poměr kreatin/kreatinin je v moči pacientů v normě. Avšak v mozku je kreatin takřka nedetekovatelný, důsledkem čehož dochází k poruchám nervového a pohybového systému. Klasickými projevy onemocnění jsou mentální retardace, opožděný vývoj a myopatie (Stöckler-Ipsiroglu *et al.*, 2015; Ficicioglu, 2017).

Při deficitu GAMT (GAMTD; Stöckler-Ipsiroglu and Salomons, 2008) je na rozdíl od AGATD hladina guanidinoacetátu v tělních tekutinách zvýšená, zatímco hladina kreatinu snižená (Tab. 3). Poměr kreatin/kreatinin v moči pacientů je taktéž v normě (Ficicioglu, 2017). Mozek postrádající kreatin ztrácí řadu fyziologických funkcí, stejně jako je tomu u AGATD. Jedná se zde především o hypotonii, hyperkinetické pohyby, třes hlavy, zástavu vývoje a těžkou mentální retardaci (Stöckler-Ipsiroglu and Salomons, 2008).

Poslední porucha metabolismu kreatinu – X-vázaný recesivně dědičný deficit přenašeče kreatinu (CRTR-D; Stöckler-Ipsiroglu and Salomons, 2008) – se týká poruchy transportu kreatinu. Diagnostika této choroby je založena na detekci zvýšeného poměru kreatin/kreatinin v moči (Tab. 3) a zároveň poklesu hladiny kreatinu v mozku. Vážnější klinické příznaky jsou záležitostí výlučně mužů – hemizygotů. Objevuje se u nich např. mentální retardace, opožděný vývoj, expresivní porucha řeči, porucha jazyka, epilepsie nebo autistické chování. U heterozygotních žen se mohou projevit jen mírné poruchy kognitivních funkcí (Wang *et al.*, 2018).

Tab. 3: Vybrané dědičné poruchy metabolismu kreatinu a jejich močové biomarkery zahrnuté ve vyvinuté metodě.

<i>Onemocnění</i>	<i>Zkratka onemocnění</i>	<i>Mutovaný gen</i>	<i>Enzym/přenašeč</i>	<i>EC</i>	<i>Diagnostický biomarker</i>
Deficit AGAT	AGATD	<i>GATM</i>	Mitochondriální argininglycinamidinotransferasa	2.1.4.1	Guanidinoacetát Kreatin
Deficit GAMT	GAMTD	<i>GAMT</i>	Guanidinoacetátmethyltransferasa	2.1.1.2	Guanidinoacetát Kreatin
Deficit přenašeče kreatinu	CRTR-D	<i>SLC6A8</i>	Na <sup>+</sup> a Cl <sup>-</sup> dependentní přenašeč kreatinu	-	Kreatin

## 2.2.4 Dědičné poruchy cyklu močoviny

Močovina – odpadní dusíkatý produkt ureotelních živočichů – je syntetizována metabolickým pochodem označovaným jako močovinový (ornithinový) cyklus (Kodíček *et al.*, 2015). Funkce této metabolické dráhy, odehrávající se prakticky nepřetržitě v játrech, spočívá v odstranění přebytečného dusíku. Ten je v lidském těle přítomen ve formě amoniaku, eventuálně dalších dusíkatých derivátů, jež jsou pro tělo toxické. Cyklus močoviny však zajišťuje jejich přeměnu na netoxický produkt, močovinu (Leonard, 2008). Z fyzikálně-chemického hlediska se jedná o malou, nenabitou, ve vodě rozpustnou molekulu, díky čemuž jednoduše prochází skrze membrány. Toho využívá při transportu z jater, odkud putuje krevním řečištěm do ledvin, v nichž je glomerulární filtrací převedena do moče (Vodrážka, 1996; Koolman and Roehm, 2005).

Močovinový cyklus je charakterizován sledem 5 enzymových reakcí. K prvnímu kroku dochází v matrix mitochondrií, v níž je díky dekarboxylačním reakcím uvolňován oxid uhličitý. Ten je ve formě bikarbonátu a  $\text{NH}_4^+$  – konečného produktu metabolismu pyrimidinů – využit k tvorbě karbamoylfosfátu (CP) (Vodrážka, 1996; Koolman and Roehm, 2005). V rámci druhé reakce je karbamoylová skupina CP přenesena na aminoskupinu ornithinu, čímž dochází ke vzniku citrulinu. Ten je posléze přenesen do cytosolu pomocí antiportního přenašeče. V třetím kroku dochází ke kondenzaci citrulinu s aspartátem za vzniku argininosukcinátu, který je v další enzymové reakci štěpen za vzniku argininu a fumarátu. Důležitou roli hraje vznik fumarátu, neboť se jako meziprodukt močovinového cyklu dostává do Krebsova cyklu a postupně je přeměněn na aspartát, tolik nezbytný pro průběh dalšího cyklu močoviny. V posledním kroku vznikají hydrolytickým štěpením argininu isomočovina a ornithin, jenž je následně přenesen pomocí translokasy do matrix mitochondrie a celý cyklus močoviny je tím uzavřen. Isomočovina je neenzymatickou cestou přeměněna na močovinu a ta je z těla vylučována močí (Vodrážka, 1996; Kodíček *et al.*, 2015).

Pro každý enzym močovinového cyklu je v současné době známa metabolická porucha. Intermediáty močovinového cyklu (diagnostické biomarkery DMP) a odpovídající defektní enzymy/přenašeč jsou shrnuty v Tab. 4. Metabolická mapa na Obr. 4 zobrazuje lokalizaci patofyziologie v močovinovém cyklu.

Pro všechny poruchy močovinového cyklu je charakteristická hyperamonémie, která se může vyskytovat v různých formách lišících se závažností klinických důsledků. Těžká forma nastupuje již v prvních dnech života a klinicky se manifestuje např. odmítáním krmení, zvracením, hypotonií, podrážděností, záchvaty, podchlazením, letargií, spánkovou apnoe či smrtí. Pozdní nástup je obvykle spjat s lehčím průběhem (Summar and Mew, 2018).

Koncentrace aminokyselin v tělních tekutinách je nad enzymatickým defektem zvýšena, oproti tomu pod defektem snížena. U všech poruch dochází k akumulaci glutaminu v plasmě (Leonard, 2008). Ten vzniká v důsledku detoxikace amoniaku v mozkových astrocytech za katalýzy glutaminsynthetasy (EC 6.3.1.2). Glutamin působí na astrocyty toxicky. Má tím na svědomí vznik jejich otoků, což vyústí ve změny v glutamatergické neurotransmisi a ve vznik řady neurologických poruch s vysokou úmrtností (Diez-Fernandez and Häberle, 2017).

Vhodnou terapií těchto onemocnění může být např. nízkobílkovinná dieta (za současné suplementace esenciálních aminokyselin), doplňování deficitních živin (arginin, citrulin), užívání léků pro alternativní cestu odstranění dusíku (benzoát sodný, fenylbutyrát sodný, fenylacetát sodný, glycerol-fenylbutyrát) a hemodialýza. V jistých případech může být nejlepším řešením transplantace jater (Leonard, 2008; Diez-Fernandez and Häberle, 2017).

Nejčastější poruchou cyklu močoviny je X-vázaný deficit ornithintranskarbamylasy (OTCD; Choi *et al.*, 2015). Zde vězí důvod, proč se netvoří intermediáty (citrulin, arginin) močovinového cyklu, což má dopad na výrazný pokles jejich koncentrace v plasmě. V moči se hromadí kyselina orotová vznikající z nevyužitého CP, jenž vstupuje do *de novo* syntézy pyrimidinů (kapitola 2.2.2). Z hromadícího se lysinu v cytoplasmě vzniká homocitrulin, jehož zvýšenou hladinu v moči při onemocnění lze taktéž zaznamenat (Tab. 4) (Leonard, 2008; Lichter-Konecki, 2017; Wild *et al.*, 2019).

Onemocnění zvané citrulinémie I. typu (CTLN1; Summar and Mew, 2018) je charakterizováno několikanásobně zvýšenou hladinou citrulinu a zároveň nízkou koncentrací argininu v plasmě. V moči pacientů lze odhalit vyšší koncentraci kyseliny orotové (Tab. 4) (Häberle and Rubio, 2014).

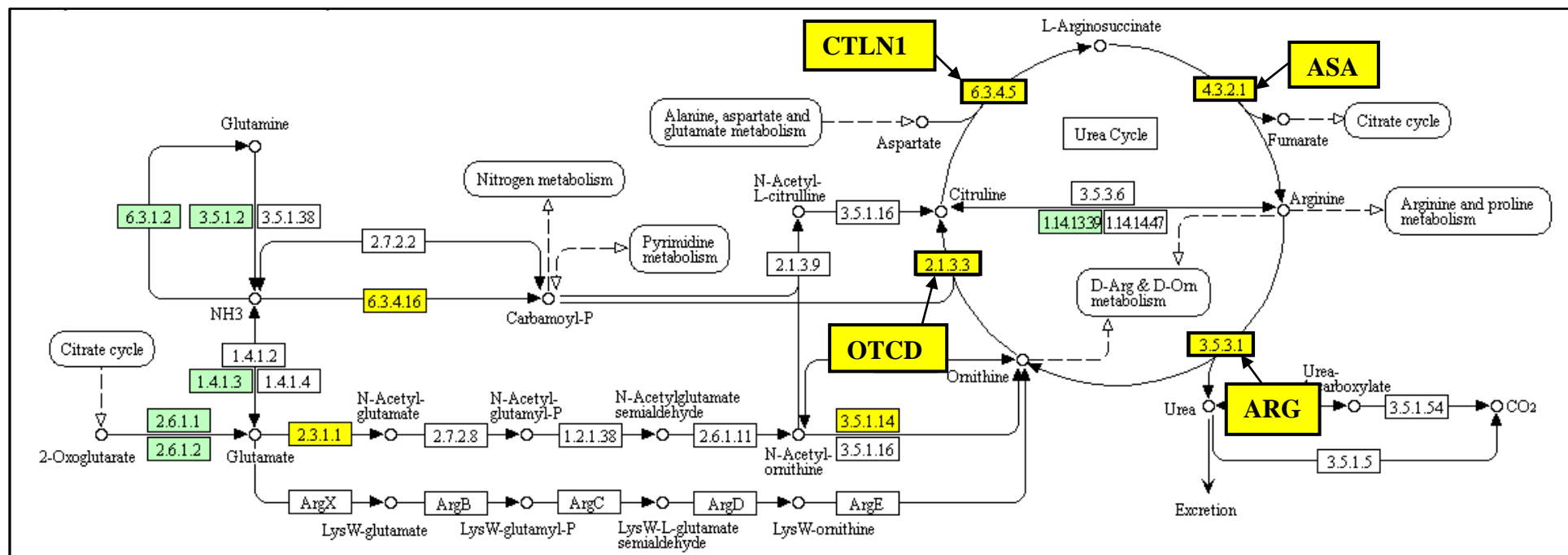
Dalším onemocněním močovinového cyklu je argininosukcinátová acidurie (ASA; Erez *et al.*, 2011). Následkem defektu se v moči kumulují argininosukcinát a kyselina orotová (Tab. 4). Dále se onemocnění projevuje zvýšenou koncentrací citrulinu, avšak na druhou stranu i snížením hladiny argininu v plasmě (Häberle and Rubio, 2014).

Při hyperargininémii (ARG; Scaglia and Lee, 2006) se v plasmě pacientů hromadí arginin, v moči pak kyselina orotová (Tab. 4) (Lichter-Konecki, 2017).

Nejvzácnější poruchou cyklu močoviny je HHH (hyperornithinémie, hyperamonémie, homocitrulinurie) syndrom, známý též jako deficit přenašeče ornithinu (ORNT1D; Wild *et al.*, 2019). Při něm dochází ke kumulaci ornithinu v plasmě (hyperornithinémie). Kromě kyseliny orotové je v moči (Tab. 4) výrazně zvýšená hladina homocitrulinu (homocitrulinurie) (Häberle and Rubio, 2014; Wild *et al.*, 2019).

Tab. 4: Vybrané dědičné poruchy cyklu močoviny a jejich močové biomarkery zahrnuté ve vyvinuté metodě.

<i>Onemocnění</i>	<i>Zkratka onemocnění</i>	<i>Mutovaný gen</i>	<i>Enzym</i>	<i>EC</i>	<i>Diagnostický biomarker</i>
Deficit ornithintranskarbamylyasy	OTCD	<i>OTC</i>	Mitochondriální ornithintranskarbamylyasa	2.1.3.3	Kyselina orotová Homocitrulin
Citrulinémie I. typu	CTLN1	<i>ASS1</i>	Argininosukcinátsynthetasa 1	6.3.4.5	Kyselina orotová Argininosukcinát
Argininosukcinátová acidurie	ASA	<i>ASL</i>	Argininosukcinátlyasa	4.3.2.1	Kyselina orotová
Hyperargininémie	ARG	<i>ARG1</i>	Arginasa 1	3.5.3.1	Kyselina orotová
Deficit přenašeče ornithinu, HHH syndrom	ORNT1D	<i>SLC25A15</i>	Mitochondriální ornithinový přenašeč 1	-	Kyselina orotová Homocitrulin



Obr. 4: Metabolická mapa cyklu močoviny s barevně vyznačenými enzymy (žlutě) podílejícími se na vzniku vybraných DMP. Rámečky označují enzymový defekt spojený s příslušnou poruchou (Tab. 4). Zdroj: KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)



### 2.2.5 Dědičné metabolické poruchy související s vylučováním glycinových konjugátů

Konjugáty glycinu s estery acyl-CoA (acylglyciny) se řadí mezi diagnostické biomarkery DMP mitochondriální  $\beta$ -oxidace mastných kyselin s krátkým a středním řetězcem, poruch metabolismu aminokyselin s rozvětveným řetězcem či organických acidémií (Hobert *et al.*, 2016; Nie *et al.*, 2018). Acylglyciny vznikají převážně v játrech transesterifikací esterů acyl-CoA s glycinem, a to za účasti mitochondriální acyltransferasy, glycin-N-acylasy (EC 2.3.1.13) (Gregersen *et al.*, 1986; Costa *et al.*, 2000).

Při poruchách  $\beta$ -oxidace a katabolismu aminokyselin s rozvětveným řetězcem nedochází k degradaci toxického acyl-CoA, s čímž je spojeno jeho následné hromadění v organismu. K jeho odstranění se využívá alternativních metabolických drah, kupř. konjugace acyl-CoA s glycinem, karnitinem nebo kyselinou glukoronovou, což rezultuje ve vznik polárních konjugátů, které lze vyloučit močí. Analýza jednotlivých konjugátů přítomných v plasmě a moči patří mezi cenný nástroj v diagnostice DMP (Costa *et al.*, 2000; Hobert *et al.*, 2016).

#### Poruchy $\beta$ -oxidace

Odbouráváním lipidů vznikají volné mastné kyseliny (MK), jež jsou ve své aktivní formě (acyl-CoA) přenášeny pomocí karnitinu do mitochondrií, kde se za pomoci specifických enzymů účastní  $\beta$ -oxidace. Předtím jsou volné mastné kyseliny esterifikovány s koenzymem A (CoA) za katalýzy acyl-CoA-ligasy (EC 6.2.1.3) (Masopust a Průša, 1999; Kodíček *et al.*, 2015).

Během  $\beta$ -oxidace – aerobního procesu degradace mastných kyselin – dochází v rámci 4 enzymových reakcí ke zkrácení acyl-CoA vždy o 2 uhlíkové atomy a zároveň ke vzniku acetyl-CoA a vysokoenergetického fosfátu, ATP. Větší část acetyl-CoA vstupuje do Krebsova cyklu, menší část je v játrech přeměněna na ketolátky. Zkrácený acyl-CoA vstupuje do dalšího kola procesu degradace mastných kyselin, dokud není zcela rozložen (Ledvina *et al.*, 2005). Ve výjimečných případech (nenasyčené mastné kyseliny, kyseliny s velmi dlouhým nebo rozvětveným řetězcem, kyseliny s lichým počtem uhlíků) probíhá modifikovaná  $\beta$ -oxidace, do níž jsou zapojeny další specifické enzymy (Ledvina *et al.*, 2005; Kodíček *et al.*, 2015).

V prvním kroku  $\beta$ -oxidace dochází k dehydrogenaci nasyceného acyl-CoA v beta poloze katalyzující acyl-CoA dehydrogenasa, jež je zvlášť specifická pro krátké (SCAD, z angl. short-chain acyl-CoA dehydrogenase, EC 1.3.8.1), středně dlouhé (MCAD, z angl. medium-chain acyl-CoA dehydrogenase, EC 1.3.8.7), dlouhé (LCAD, z angl. long-chain

acyl-CoA dehydrogenase, EC 1.3.8.8.) a velmi dlouhé řetězce (VLCAD, z angl. very long-chain acyl-CoA dehydrogenase, EC 1.3.8.9). Hydrogenace v poloze beta zapříčiňuje vznik dvojné vazby mezi druhým a třetím uhlíkem, čímž dochází ke vzniku nenasyceného enoyl-CoA. Ten vstupuje do druhé reakce katalyzované enoyl-CoA-hydratasou (EC 4.2.1.17). Jejím působením dochází k adici vody na nově vytvořenou dvojnou vazbu za vzniku hydroxylové skupiny. Výsledným produktem reakce je 3-hydroxyacyl-CoA, jenž podstupuje v dalším kroku dehydrogenaci zprostředkovávající 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenasa (EC 1.1.1.35). Produkt této reakce – 3-oxoacyl-CoA – se podrobuje thiolýze katalyzující thiolasa (EC 2.3.1.16) za vzniku finálního produktu – acetyl-CoA a nasyceného acylu kratšího o dva uhlíky (Ledvina *et al.*, 2005; Spiekerkoetter and Wood, 2010).

Vrozené defekty  $\beta$ -oxidace se řadí do skupiny neurometabolických onemocnění. Poruchy se mohou projevit v různém věku, přičemž jejich klinické projevy mohou být rozmanité. Charakteristickým znakem těchto poruch jsou epizodické symptomy, které se projevují zejména při hladovění, stresu nebo časově náročném cvičení. Tyto situace znemožňují mitochondriální schopnost oxidovat mastné kyseliny, což vede ke vzniku hypoglykemických záchvatů (energie je získávána prostřednictvím glykolýzy, čímž hladina glukosy v krvi klesá), rhabdomyolýzy, kardiomyopatie, metabolické acidózy nebo jaterní dysfunkce. Klinické příznaky u novorozenců jsou často spjaty s virovou nákazou, při které klesá intenzita krmení, takže se kojenci často dostávají do stavu hladovění. Pokud není porucha včasně diagnostikována, může vést až ke smrti, popř. k ireverzibilním neurologickým následkům (Kompore and Rizzo, 2008; Spiekerkoetter and Wood, 2010).

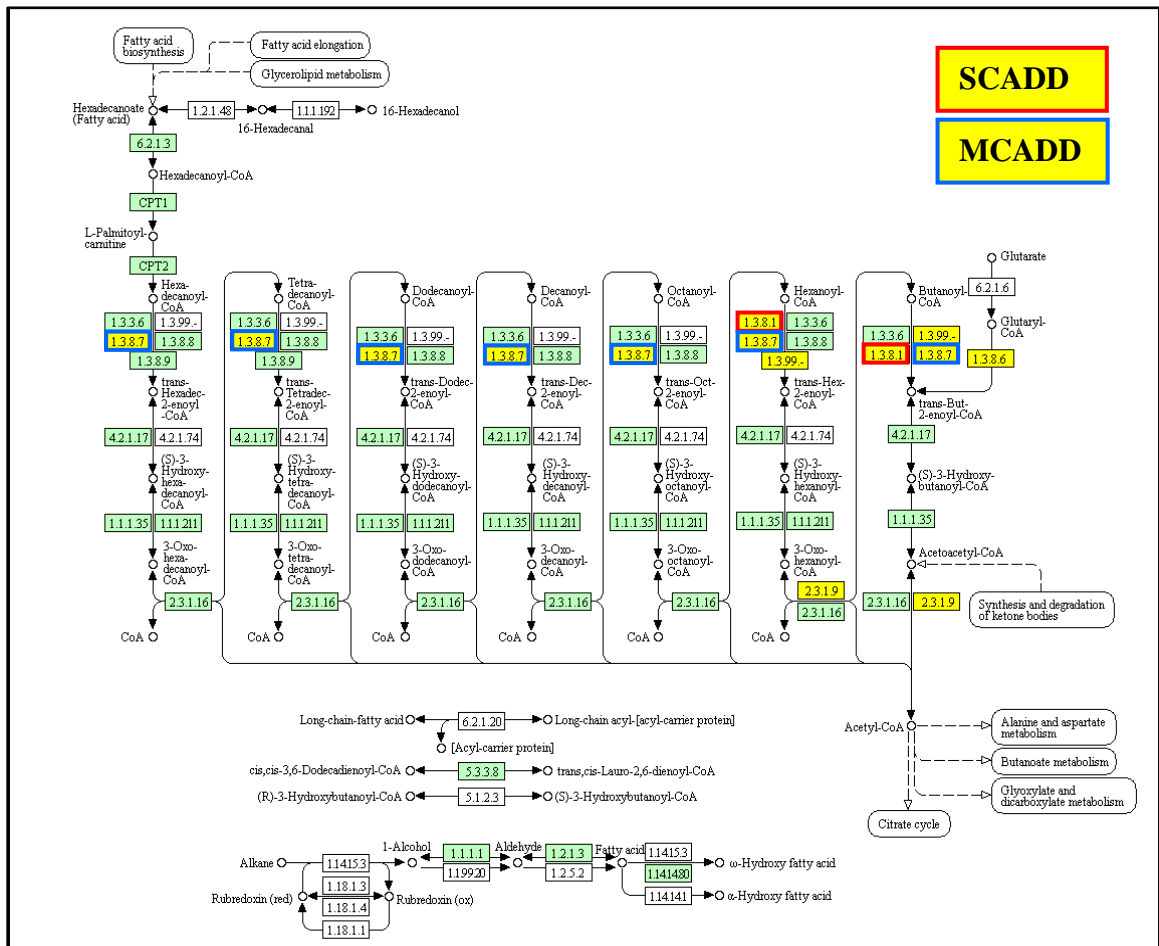
Specifické konjugáty acyl-CoA s glyciny plní funkci diagnostických biomarkerů některých onemocnění  $\beta$ -oxidace. Ty jsou spolu s příslušnými defektními enzymy jednotlivých poruch shrnuty v Tab. 5. Metabolická mapa na Obr. 5 zobrazuje lokalizaci patofyziologie vybraných poruch  $\beta$ -oxidace.

Deficit SCAD (SCADD; Merritt *et al.*, 2018) se projevuje zvýšenou hladinou butyrylkarnitinu v plasmě, v moči pacientů jsou zvýšené hladiny butyrylglycinu (Tab. 5) a kyselin ethylmalonové, máselné, methyljantarové, adipové, suberové a sebakové (Harding, 2017; Merritt *et al.*, 2018).

Pro deficit MCAD (MCADD; Harding, 2017) je charakteristická zvýšená koncentrace acylkarnitinů v plasmě (hexanoylkarnitin, oktanoylkarnitin, dekanoylkarnitin, dekenoylkarnitin) a acylglycinů v moči (propionylglycin, hexanoylglycin, fenylpropionylglycin, suberylglycin) (Tab. 5) (Harding, 2017; Merritt *et al.*, 2018).

Tab. 5: Vybrané poruchy  $\beta$ -oxidace související s vylučováním glycinových konjugátů a jejich močové biomarkery zahrnuté ve vyvinuté metodě.

<i>Onemocnění</i>	<i>Zkratka onemocnění</i>	<i>Mutovaný gen</i>	<i>Enzym</i>	<i>EC</i>	<i>Diagnostický biomarker</i>
Deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým řetězcem	SCADD	ACADS	Mitochondriální acyl-CoA dehydrogenasa mastných kyselin s krátkým řetězcem	1.3.8.1	Butyrylglycin
Deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem	MCADD	ACADM	Mitochondriální acyl-CoA dehydrogenasa mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem	1.3.8.7	Propionylglycin Hexanoylglycin Fenylpropionylglycin Suberylglycin



Obr. 5: Metabolická mapa  $\beta$ -oxidace s barevně vyznačenými enzymy (žlutě) podílejícími se na vzniku vybraných DMP. Rámcečky označují enzymový defekt spojený s příslušnou poruchou (Tab. 5).  
 Zdroj: KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

## **Poruchy metabolismu aminokyselin s rozvětveným řetězcem**

Aminokyseliny s rozvětveným řetězcem (BCAA, z angl. branched-chain amino acids) zahrnují valin, leucin a isoleucin. Jedná se o esenciální aminokyseliny, které jsou nepostradatelné např. pro syntézu dusíkatých sloučenin anebo regulaci metabolismu sacharidů, lipidů a proteinů.

Katabolická dráha zmíněných BCAA zahrnuje 3 společné kroky. V první enzymové reakci dochází k reverzibilní transaminaci aminokyselin zprostředkované aminotransferasou aminokyselin s rozvětveným řetězcem (BCAT, z angl. branched-chain amino acid aminotransferase, EC 2.6.1.42), která způsobuje ztrátu aminoskupiny. Produktem přeměny jsou 2-oxokyseliny, konkrétně tedy 3-methyl-2-oxobutanoát (degradace valinu), 4-methyl-2-oxopentanoát (degradace leucinu) a 3-methyl-2-oxopentanoát (degradace isoleucinu). Ve druhém kroku podléhají dehydrogenaci a dekarboxylaci za katalýzy enzymového komplexu dehydrogenasy 2-oxokyselin s rozvětveným řetězcem (BCKDC, z angl. branched-chain 2-keto acid dehydrogenase complex, EC 1.2.1.25). Výsledným produktem je příslušný acyl-CoA, zkrácený z původní délky o 1 uhlík, který v posledním kroku podléhá dehydrogenaci za vzniku nenasyčeného acylu. Tento mechanismus se uplatňuje také při  $\beta$ -oxidaci. Finálním produktem degradace valinu je sukcinyl-CoA, degradace leucinu 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (z něj vznikající acetoacetát a acetyl-CoA) a degradace isoleucinu propionyl-CoA (z něj vznikající sukcinyl-CoA) a acetyl-CoA. Acetyl-CoA a sukcinyl-CoA jsou využity v Krebsově cyklu (Ledvina *et al.*, 2005; Nie *et al.*, 2018).

Poruchy metabolismu BCAA jsou spojeny s akumulací organických kyselin v tělních tekutinách, důsledkem čehož je narušena acidobazická rovnováha. Typickým symptomem těchto poruch je mimo jiné progresivní encefalopatie, krom toho může být zasažena funkce pohybového, nervového, trávicího či cévního systému (Villani *et al.*, 2017).

Pro některé poruchy metabolismu BCAA plní funkci diagnostických biomarkerů specifické konjugáty acyl-CoA s glyciny, jež jsou spolu s příslušnými defektními enzymy shrnuty v Tab. 6. Lokalizaci patofyziologie vybraných poruch metabolismu BCAA předkládá metabolická mapa na Obr. 6.

Poruchy metabolismu BCAA spadají do tříd organických acidurií. Vůbec první popsanou acidurií leucinového katabolismu byla isovalerová acidurie (IVA; Villani *et al.*, 2017). Konsekvencí enzymového defektu je akumulace derivátů isovaleryl-CoA v plasmě a moči (isovalerylglycin, isovalerylkarnitin, kyselina 3-hydroxyisovalerová) (Tab. 6). Při akutním onemocnění vzniká charakteristický zápach moči „špinavých ponožek“, za který je zodpovědná v moči přítomná volná kyselina isovalerová. U jiných

organických acidurií není tento zápach přítomný, jelikož se nekonjugovaná kyselina isovalerová nevylučuje močí v tak značném množství. Onemocnění může být smrtelné, proto je včasná diagnostika a nastavení léčby životně důležité. Při včasné zachycení nemoci je pacientovi předepsána dieta s omezeným příjmem bílkovin (Vockley and Ensenauer, 2006).

Významným onemocněním katabolismu leucinu je deficit 3-methylkrotonyl-CoA karboxylasy (MCCD; Stadler *et al.*, 2006). V moči pacientů se kumulují 3-methylkrotonylglycin (Tab. 6) a kyselina 3-hydroxyisovalerová. V plasmě se zvyšuje hladina 3-hydroxyisovalerylkarnitinu (3-HIVA-C). Klinické projevy onemocnění jsou různě závažné. Jsou známy případy zcela bezpříznakových jedinců, leč i jedinců s poruchami psychomotorického vývoje, potažmo nervového systému (Stadler *et al.*, 2006).

Deficit 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyasy (HMGCLD; Grünert *et al.*, 2017) – vzácná porucha degradace leucinu a syntézy ketonů – je asociován s akumulací 3-methylkrotonylglycinu a kyselin 3-hydroxyisovalerové, 3-methylglutakonové a 3-hydroxy-3-methylglutarové v moči (Tab. 6). V krvi pacientů se hromadí zejména 3-hydroxyisovalerylkarnitin a 3-methylglutaryl-karnitin. Pacienti jsou náchylní k závažným metabolickým dekompenzacím s hypoketotickou hypoglykemií a metabolickou acidózou. Pokud není onemocnění zavčas diagnostikováno a léčeno, rozvíjí se trvalé neurologické poškození, končící nezřídka i smrtí (Grünert *et al.*, 2017).

Další poruchou – zasahující katabolismus isoleucinu a metabolismus ketonů – je deficit beta-ketothiolasy (BKTD; Law *et al.*, 2015). Ten může být diagnostikován na základě kumulujícího se butanonu, 2-methylacetoacetátu, 2-methyl-3-hydroxybutyrátu a tiglylglycinu v moči (Tab. 6). V krvi pacientů je možné odhalit zvýšení hladin 2-methyl-3-hydroxybutyrylkarnitinu a tiglylkarnitinu. Klinicky se onemocnění projevuje těžkou ketoacidózou u dětí ve věku 6–24 měsíců. Včasnou diagnostikou lze metabolickou dekompenzaci účinně zvrátit infuzí glukózy a následným omezením bílkovin (Law *et al.*, 2015).

Významným onemocněním katabolismu valinu je deficit isobutyryl-CoA dehydrogenasy (IBDD; Santra *et al.*, 2017). Při enzymovém nedostatku se hromadí butyrylkarnitin a isobutyrylkarnitin v plasmě a isobutyrylglycin v moči (Tab. 6). Onemocnění je velmi vzácné, většina pacientů je klinicky asymptomatická, může se ovšem výjimečně objevit např. ketotická hypoglykémie (Santra *et al.*, 2017).

Charakteristickým rysem deficitu acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým/rozvětveným řetězcem (SBCADD; Porta *et al.*, 2019) je nahromadění 2-methylbutyrylglycinu v moči (Tab. 6) a 2-methylbutyrylkarnitinu v krvi. Analýzou

karnitinů při novorozeneckém skríningu lze detekovat zvýšenou koncentrací C5-karnitinů (isovalerylkarnitin, 2-methylbutyrylkarnitin, pivaloylkarnitin) v plasmě. Onemocnění probíhá téměř asymptomaticky, vzácně se manifestuje např. opožděným vývojem (Porta *et al.*, 2019).

Vzácnou poruchou metabolismu isoleucinu je X-vázaný deficit 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenasy (MHBDD; Ofman *et al.*, 2003). Diagnostiku onemocnění lze provádět na základě zvýšené koncentrace 2-methyl-3-hydroxybutyrátu v tělních tekutinách. Abnormální je také zvýšená hladina tiglylglycinu v moči (Tab. 6). Klinická prezentace projevů se může vyznačovat velkou heterogeností. Klasická dětská forma onemocnění je charakterizována progresivním neurodegenerativním průběhem s retinopatií a kardiomyopatií, což má za následek smrt (Gilbert-Barness and Farrell, 2017; Stepien *et al.*, 2018).

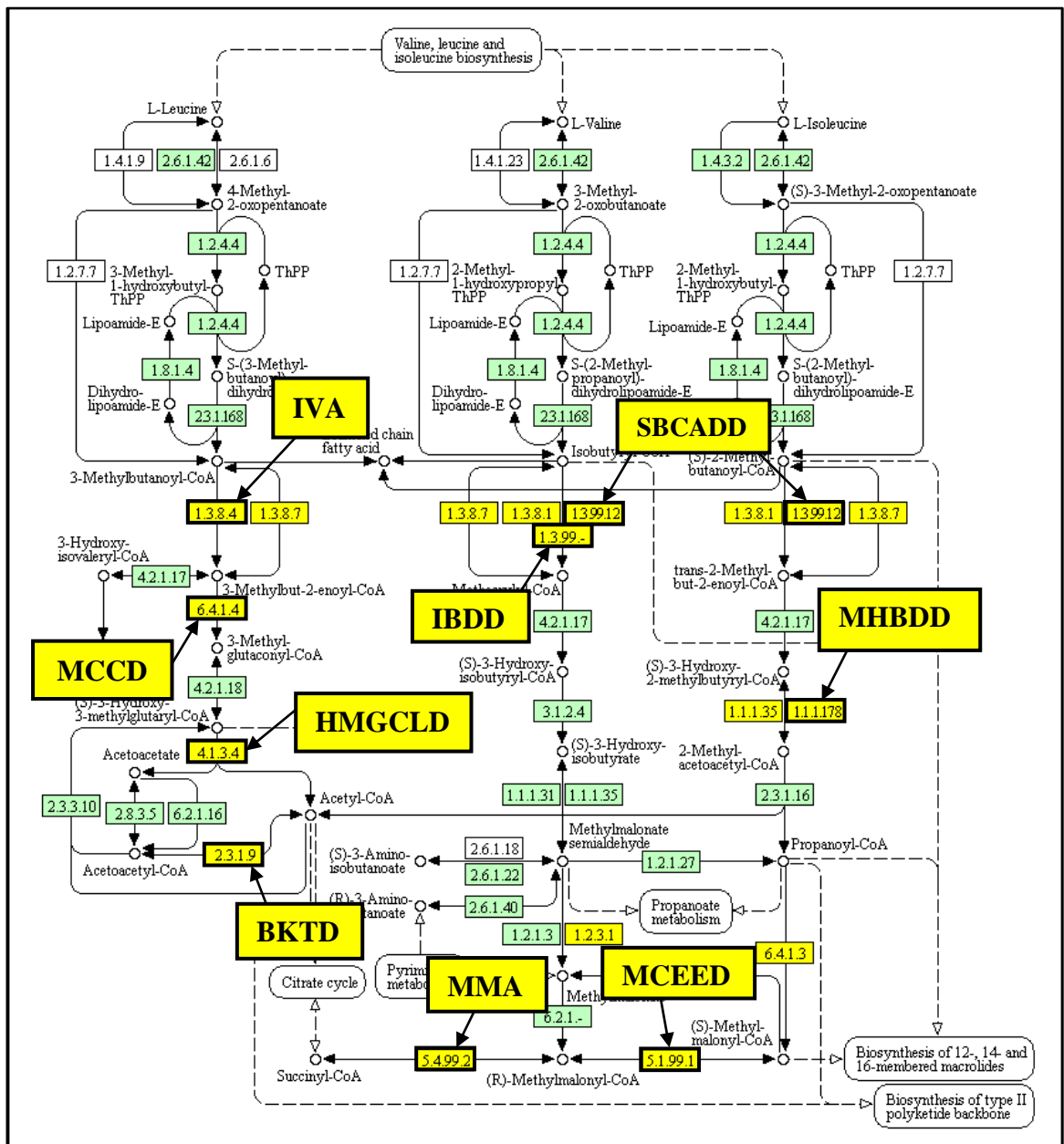
Smrtelnou poruchou metabolismu propionátu – intermediátu katabolismu valinu a isoleucinu – je methylmalonová acidurie (MMA; Hörster and Hoffmann, 2004). V tělních tekutinách pacientů se kromě kyselin methylmalonové a 3-hydroxypropionové kumulují 2-methylcitrát a tiglylglycin (Tab. 6) (Villani *et al.*, 2017). V prvních letech života s touto chorobou se dostavuje akutní život ohrožující metabolická krize, pacienti trpí metabolickou acidózou, hyperamonémií, hyperglycinémií a hypoglykemií. Klinicky se onemocnění manifestuje např. dýchacími potížemi, progresivní změnou vědomí, svalovou hypotonií a renální insuficiencí (Hörster and Hoffmann, 2004).

Extrémně vzácná forma methylmalonové acidurie způsobené deficitem methylmalonyl-CoA epimerasy (MCEED; Waters *et al.*, 2016) se projevuje zvýšenou koncentrací kyseliny methylmalonové, kyseliny 3-hydroxypropionové, 2-methylcitrátu a propionylglycinu v tělních tekutinách (Tab. 6). Klinické projevy onemocnění jsou stejné jako u MMA (Waters *et al.*, 2016, Villani *et al.*, 2017).

Tab. 6: Vybrané poruchy metabolismu BCAA související s vylučováním glycinových konjugátů a jejich močové biomarkery zahrnuté ve vyvinuté metodě.

<i>Onemocnění</i>	<i>Zkratka onemocnění</i>	<i>Mutovaný gen</i>	<i>Enzym</i>	<i>EC</i>	<i>Diagnostický biomarker</i>
Isovalerová acidémie	IVA	<i>IVD</i>	Mitochondriální isovaleryl-CoA dehydrogenasa	1.3.8.4	Isovalerylglycin
Deficit 3-methylkrotonyl-CoA karboxylasy	MCCD	<i>MCCA MCCB</i>	Mitochondriální alfa a beta podjednotky 3-methylkrotonyl-CoA karboxylasy	6.4.1.4	3-Methylkrotonylglycin
Deficit 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyasy	HMGCLD	<i>HMGCL</i>	Mitochondriální 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyasa	4.1.3.4	3-Methylkrotonylglycin
Deficit beta-ketothiolasy	BKTD	<i>ACAT1</i>	Mitochondriální 2-methylacetoacetyl-CoA thiolasa	2.3.1.9	Tiglylglycin
Deficit isobutyryl-CoA dehydrogenasy	IBDD	<i>ACAD8</i>	Mitochondriální isobutyryl-CoA dehydrogenasa	1.3.99.-	Isobutyrylglycin
Deficit acyl-CoA dehydrogenasy mastných kyselin s krátkým/rozvětveným řetězcem	SBCADD	<i>ACADSB</i>	Mitochondriální acyl-CoA dehydrogenasa mastných kyselin s krátkým/rozvětveným řetězcem	1.3.99.12	2-Methylbutyrylglycin
Deficit 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenasy	MHBDD	<i>HADH2</i>	Mitochondriální 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenasa	1.1.1.178	Tiglylglycin
Methylmalonová acidurie	MMA	<i>MUT</i>	Mitochondriální methylmalonyl-CoA mutasa	5.4.99.2	Tiglylglycin
Methylmalonová acidurie způsobená deficitem methylmalonyl-CoA epimerasy	MCEED	<i>MCEE</i>	Mitochondriální methylmalonyl-CoA epimerasa	5.1.99.1	Propionylglycin





Obr. 6: Metabolická mapa degradace BCAA s barevně vyznačenými enzymy (žlutě) podílejícími se na vzniku vybraných DMP. Rámečky označují enzymový defekt spojený s příslušnou poruchou (Tab. 6).

Zdroj: KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)

### 2.2.6 Dědičné metabolické poruchy spojené s vylučováním N-acetylovaných derivátů aminokyselin

N-acetylované deriváty aminokyselin vznikají cestou degradace proteinů, kterou zprostředkovává velký komplex, tzv. ATP-ubiquitin-dependetní proteasom. Proteiny jsou nejdříve degradovány na peptidy, z nichž N-acetylované peptidy jsou vzápětí rozštěpnuty acylpeptidhydrolasou (EC 3.4.19.1), a to za vzniku N-acetylovaných derivátů aminokyselin a zkrácených volných peptidů. Za fyziologického stavu je N-acetylovaný derivát aminokyseliny hydrolyzován za účasti aminoacylasy, což vede ke vzniku acetátu a volné aminokyseliny. Aminokyseliny jsou tímto způsobem recyklovány a využívány k tvorbě nových proteinů (Van Coster *et al.*, 2005). Při defektu aminoacylasy nedochází k deacetylaci N-acetylovaných derivátů specifických aminokyselin, jež se díky tomu akumuluje v moči. Jejich detekce a analýza je nezbytná pro stanovení diagnózy některých DMP (Tab. 7) (Sommer *et al.*, 2011).

Deficit aminoacylasy 1 (ACY1D, Sommer *et al.*, 2011) znemožňuje deacetylaci N-acetylovaných derivátů aminokyselin glycinu, alaninu, valinu, leucinu, isoleucinu, threoninu, serinu, glutaminu, asparaginu, methioninu a kyseliny glutamové, které se následkem enzymového defektu hromadí v moči (Tab. 7) (Van Coster *et al.*, 2005; Sommer *et al.*, 2011). U pacientů se vyskytují heterogenní neurologické symptomy, jimiž kromě snížené psychomotoriky mohou být i epileptické záchvaty a mentální retardace. ACY1D byl sledován rovněž u pacienta s autistickým chováním (Tylki-Szymanska *et al.*, 2010; Sommer *et al.*, 2011).

Deficit aminoacylasy 2 (ACY2, EC 3.5.1.15), též označované jako aspartoacylasa (ASPA), způsobuje Canavanovu chorobu (CD; Sommer *et al.*, 2011). Kvůli enzymového defektu není N-acetylaspartát deacetylován, s čímž je spojena jeho kumulace v moči (Tab. 7). CD se řadí mezi leukodystrofie, tj. neurodegenerativní onemocnění, které bývá často smrtelné pro děti. Emblematickým projevem této poruchy je degenerace mozku, v návaznosti na niž se rozvíjí psychomotorická regrese, spasticita, svalová hypotonie a závažné poškození zraku (Sass *et al.*, 2006; Sommer *et al.*, 2011).

Tab. 7: Vybrané DMP spojené s vylučováním N-acetylovaných aminokyselin a jejich močové biomarkery zahrnuté ve vyvinuté metodě.

<i>Onemocnění</i>	<i>Zkratka onemocnění</i>	<i>Mutovaný gen</i>	<i>Enzym</i>	<i>EC</i>	<i>Diagnostický biomarker</i>
Deficit aminoacylasy 1	ACY1D	ACY1	Aminoacylasy 1	3.5.1.14	N-Acetylvalin
					N-Acetylleucin
					N-Acetylserin
					N-Acetylglutamin
Canavanova choroba	CD	ACY2	Aminoacylasy 2	3.5.1.15	N-Acetylaspartát

### **2.2.7 Ostatní dědičné metabolické poruchy**

V předchozích kapitolách bylo představeno 34 vybraných poruch zasahujících do nejvýznamnějších metabolických dějů lidského organismu. Ostatní poruchy dotýkající se různých metabolických drah jsou shrnuty v Tab. 8. Jedná se např. o poruchy metabolismu aminokyselin (hawkinsinurie, tyrosinémie I. typu), poruchy metabolismu koenzymů (deficit molybdenového kofaktoru, typ A, B, C), poruchy metabolismu uhlovodíků (Fanconi-Bickelův syndrom, galaktosémie) anebo lysosomální poruchy (infantilní cystinóza, nemoc Salla).

Tab. 8: Ostatní DMP a jejich močové biomarkery zahrnuté ve vyvinuté metodě.

<i>Onemocnění</i>	<i>Zkratka onemocnění</i>	<i>Mutovaný gen</i>	<i>Enzym</i>	<i>EC</i>	<i>Diagnostický biomarker</i>	<i>Literatura</i>
<b>PORUCHY METABOLISMU AMINOKYSELIN</b>						
Hawkinsinurie	HAWK	<i>HPD</i>	4-hydroxyfenylpyruvát-dioxygenasa	1.13.11.27	Sukcinylaceton	Wilcken <i>et al.</i> , 1981 Holme and Mitchell, 2014
Hyperlysinémie a sacharopinurie	SDH	<i>AASS</i>	Mitochondriální 2-aminoadipát-semialdehydsynthasa	1.5.1.8 1.5.1.9	Homocitrulin	Hoffmann, 2008 Goodman and Duran, 2014
Tyrosinémie I. typu	HT1	<i>FAH</i>	Fumarylacetoacetylhydrolasa	3.7.1.2	Sukcinylaceton	Baydakova <i>et al.</i> , 2019
<b>PORUCHY METABOLISMU KOENZYMŮ</b>						
Deficit molybdenového kofaktoru, typ A	MoCDA	<i>MOCS1</i>	Molybden-kofaktor biosyntetický protein (MOCS1A, MOCS1B)	4.1.99.22 4.6.1.17	Xanthin	Schwarz and Veldman, 2014
Deficit molybdenového kofaktoru, typ B	MoCDB	<i>MOCS2</i>	Molybdopterin-synthasa (MOCS2A, MOCS2B)	2.8.1.12	Xanthin	Schwarz and Veldman, 2014
Deficit molybdenového kofaktoru, typ C	MoCDC	<i>GEPH</i>	Gephyrin	2.10.1.1 2.7.7.75	Xanthin	Schwarz and Veldman, 2014
Deficit biotinidasy	BTDD	<i>BTDD</i>	Biotinidasa	3.5.1.12	Propionylglycin 3-Methylkrotonylglycin	Barshop, 2014 Gilbert-Barnes and Farell, 2017
Deficit holokarboxylasy-synthetasy	HCSH	<i>HLCS</i>	Holokarboxylasa-synthetasa	6.3.4.9-11 6.3.4.15	Propionylglycin 3-Methylkrotonylglycin Tiglylglycin	Donti <i>et al.</i> , 2016 Gilbert-Barnes and Farell, 2017

PORUCHY METABOLISMU UHLOVODÍKŮ						
Fanconi-Bickelův syndrom	FBS	<i>GLUT2</i>	Přenašeč glukosy 2	-	Galaktitol Galaktosa	Santer <i>et al.</i> , 2014 Amita <i>et al.</i> , 2017
Galaktosémie I. typu	GALTD	<i>GALT</i>	Galaktosa-1-fosfáturidytransferasa	2.7.7.12	Galaktitol Galaktosa	Cuthbert <i>et al.</i> , 2008 Anderson, 2018
Galaktosémie II. typu	GALKD	<i>GALK1</i>	Galaktokinasa	2.7.1.6	Galaktitol Galaktosa	Cuthbert <i>et al.</i> , 2008 Anderson, 2018
Galaktosémie III. typu	GALED	<i>GALE</i>	UDPGalaktosa-4-epimerasa	5.1.3.2	Galaktitol Galaktosa	Cuthbert <i>et al.</i> , 2008
LYSOSOMÁLNÍ PORUCHY						
Infantilní cystinóza	IC	<i>CTNS</i>	Cystinosin	-	Glukosa Kyselina močová	Gibson and Duran, 2014 Levtchenko and Emma, 2014
Nemoc Salla	SD	<i>SLC17A5</i>	Sialin	-	Kyselina sialová	Matsuura <i>et al.</i> , 2018
PORUCHA ENERGETICKÉHO METABOLISMU						
Ethylmalonová encefalopatie	EE	<i>ETHE1</i>	Persulfiddioxygenasa	1.13.11.18	Isovalerylglycin 2-Methylbutyrylglycin	Burlina and Zeviani, 2014
OSTATNÍ						
Uridin-cytidinurie	URCTU	<i>SLC28A1</i>	Nukleosid-transportér	-	Cytidin Uridin	Wevers <i>et al.</i> , 2019

## 2.3 Metody pro diagnostiku dědičných metabolických poruch

K diagnostice DMP se využívá celé řady metod (Tab. 9). V posledních letech se však pro diagnostické účely začínají uplatňovat separační techniky v kombinaci s robustní hmotnostní spektrometrií. V rámci zjednodušení a včasné diagnostiky se tudíž pro stanovení vybraných biomarkerů jak skupin DMP, tak jednotlivých poruch nabízí zavedení „univerzální“ metody založené na kapalinové chromatografii v kombinaci s hmotnostní spektrometrií, což je ostatně cílem této práce.

Tab. 9: Metody užívané v diagnostice vybraných DMP.

	<i>Metody</i>	<i>Biologický materiál</i>	<i>Literatura</i>
<i>Poruchy metabolismu purinů a pyrimidinů</i>	HPLC/MS	Moč	Adam <i>et al.</i> , 1999 Adam <i>et al.</i> , 2002 Hornik <i>et al.</i> , 2006
	C-E		
	2D TLC		
	H <sup>1</sup> NMR		
<i>Poruchy metabolismu kreatinu</i>	GC/MS	Moč	Struys <i>et al.</i> , 2008
	LC-MS/MS	Plasma	
	Jaffé metoda	CSF	
	Enzymová analýza		
<i>Poruchy cyklu močovin</i>	GC/MS	Moč	Lichter-Konecki, 2017
<i>Poruchy související s vylučováním glycinových konjugátů</i>	GC/MS	Moč	Liu <i>et al.</i> , 2004 Rinaldo, 2008 Hobert <i>et al.</i> , 2016
	UPLC-MS/MS		
	C-E		
	H <sup>1</sup> NMR MS/MS		
<i>Poruchy spojené s vylučováním N-acetylovaných aminokyselin</i>	GC/MS	Moč	Van Coster <i>et al.</i> , 2005
	H <sup>1</sup> NMR		
<i>Poruchy metabolismu aminokyselin</i>	HPLC	Moč	Duran, 2008
	Analyzátor AMK	Plasma CSF	
<i>Poruchy metabolismu kyseliny sialové</i>	TLC	Moč	Verheijen, 2008
	HPLC	Kultivované kožní fibroblasty	
	Enzymová analýza	Trofoblast	

## 2.4 Kapalinová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Kapalinová chromatografie v kombinaci s hmotnostní spektrometrií (LC/MS) je v laboratořích běžně používanou analytickou separační technikou (Niessen and Tinke, 1995). Jednou z prvních oblastí, ve které tato metoda našla své využití, byl novorozenecký screening DMP v rámci analýz suchých krevních skvrn (Pitt, 2009).

### 2.4.1 Kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie (*Liquid Chromatography*, LC) má oproti plynové chromatografii (*Gas Chromatography*, GC) širší uplatnění v klinickém prostředí, a to zejména díky možnosti analýzy širší škály biologických molekul a jednodušší a rychlejší přípravě vzorků (Pitt, 2009).

Nejrozšířenější analytickou separační technikou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (*High Performance Liquid Chromatography*, HPLC). Důvody hojného využívání této techniky spočívají právě v její vysoké citlivosti, robustnosti a vhodnosti pro separaci netěkavých nebo tepelně nestálých látek (Skoog *et al.*, 1998; Nováková a Douša, 2013b). K separaci látek přítomných ve směsi dochází na základě jejich rozdílné distribuce mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fází. Stacionární fáze je ve formě pevné látky ukotvena na nosiči, čímž vzniká sorbent, který je umístěn do chromatografické kolony, v níž dochází k separaci. Tímto chromatografickým sorbentem protéká kapalná mobilní fáze (Nováková a Douša, 2013a). Vysokou účinnost separace zajišťují malé částice chromatografického sorbentu, které prostupující mobilní fázi kladou odpor. Z toho vyplývá nutnost užití vysokého tlaku pro překonání odporu (Klouda, 2003).

Stacionární fáze mohou být různého chemického složení, podle čehož je možné je také rozdělit. Dělíme je na fáze na bázi anorganických oxidů (např. silikagel, oxid zirkoničitý), chemicky vázané fáze na bázi silikagelu a na fáze na bázi polymerů, hybridů či grafitového uhlíku. Mezi polární stacionární fáze se řadí čistý silikagel nebo polární chemicky vázané fáze na silikagelovém nosiči, jež se mohou dále členit dle polaritý jejich funkční skupiny na skupinu slabě polární (diolová funkční skupina či nitroskupina), středně polární (kyanová či kyanopropylová skupina) a silně polární fáze (aminopropyl). Typickým příkladem nepolární stacionární fáze je chemicky vázaný alkyl C<sub>18</sub> (oktadecylsilikagel). Mobilní fáze se může stejně tak dělit na polární (směs vodné složky s polárními organickými rozpouštědly rozpustnými ve vodě – alkoholy, acetonitril, tetrahydrofuran) a nepolární (organická rozpouštědla, jako např. hexan, heptan, toluen) (Nováková a Douša, 2013a).

Podle principu retence látek na koloně dělíme chromatografické systémy na systémy s normálními fázemi (NP-HPLC) a systémy s reverzními fázemi (RP-HPLC). NP-HPLC využívá pro separaci látek polární stacionární fázi a mobilní fázi s polaritou nižší, než má fáze stacionární. NP-HPLC se využívá hlavně pro separaci isomerů nebo lipofilních látek. Při RP-HPLC je používána polární mobilní fáze, zatímco stacionární fáze je nepolární. Separace na reverzní fázi patří mezi nejčastější volbu metody pro separaci látek v jednoduchých, leč i velmi komplexních vzorcích. Vzhledem ke své univerzálnosti bývá



navíc uplatňována při vývoji a optimalizaci nových HPLC metod (Nováková a Douša, 2013a).

RP-HPLC s využitím C<sub>18</sub> stacionární fáze s velikostí částic 3–5 μm je v oblasti metabolomiky využívána velice hojně. Využívá se pro separaci středně polárních a nepolárních analytů. Pro separaci komplexnějších biologických vzorků může být ale nedostatečná, což se odráží na špatném rozlišení metabolitů. Jeden z moderních trendů LC tento nepříznivý jev překonal postupným zmenšováním částic sorbentu až na velikost menší než 2 μm. Jde o ultra-vysokoúčinnou kapalinovou chromatografii (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*, UHPLC), která poskytuje lepší účinnost, rozlišení a citlivost analýz. Nevýhodou tohoto přístupu je však potřebné zvýšení tlaku, s čímž je spojena úprava systémů (Dettmer *et al.*, 2007; Nováková a Douša, 2013a).

Vysoce polární látky nelze separovat pomocí RP-HPLC, poněvadž se nezadržují na stacionární fázi a eluují s mrtvým objemem. Jeden z nových trendů – hydrofilní interakční chromatografie (*Hydrophilic Interaction Chromatography*, HILIC) – ovšem analýzu vysoce polárních látek umožňuje. V tomto přístupu mobilní fáze obsahuje přidávaný podíl vodné složky (např. acetonitril), která vytváří na povrchu stacionární fáze stojatou vodní vrstvu, díky níž lze analyty rozdělit a zadržet (Dettmer *et al.*, 2007). Tento přístup je uplatňován při vývoji metody, dojde-li např. na matricové efekty nebo nedostatečnou selektivitu metody (Nováková a Douša, 2013a).

Pro HILIC techniku je příznačné zlepšení ionizace elektrosprejem (*Electrospray Ionization*, ESI), a to v důsledku vyššího podílu vodné složky v mobilní fázi. Za těchto podmínek je dosaženo vyšší citlivosti LC/MS analýz (Jandera, 2011).

#### **2.4.2 Hmotnostní spektrometrie**

V současnosti se hmotnostní spektrometrie (*Mass Spectrometry*, MS) považuje za jednu z nepostradatelných analytických technik využívaných v analytických laboratořích (Gross, 2011). Své uplatnění našla napříč obory, jako je lékařství, potravinářství, zemědělství, průmysl a environmentalistika (Friedecký a Lemr, 2012).

Počátky této přelomové techniky pro chemickou analýzu sahají ke konci 19. století a jsou připisovány experimentálnímu fyzikovi a objeviteli elektronu Siru Josephu J. Thomsonovi. Od té doby se MS stala předmětem velkého množství studií. Byly objeveny další principy využití MS, včetně spojení techniky s dalšími (LC, GC). Zaznamenán byl též technologický pokrok v instrumentaci MS, což se podepsalo na zlepšení zejména diagnostické senzitivity a robustnosti výsledků měření. Díky tomu je MS v dnešní době

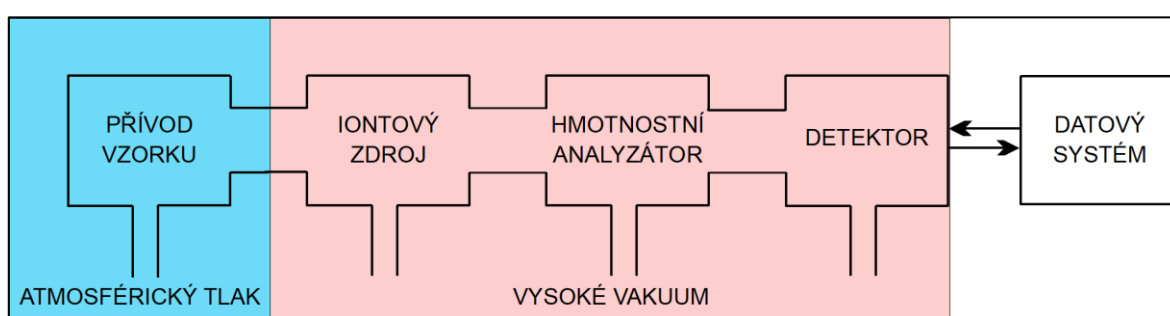
využívána ve všech laboratořích, které vyžadují nepřetržitý a bezporuchový provoz (Friedecký a Lemr, 2012).

MS se používá k identifikaci známé či neznámé chemické látky v komplexních biologických vzorcích z molekulové anebo atomové hmotnosti přítomných složek (Gross, 2011; Musilová a Glatz, 2011).

MS pracuje na principu ionizace (např. elektrickým polem, nárazem elektronů, nárazem fotonů) organické či anorganické molekuly s následnou separací vzniklých iontů dle poměru jejich hmotnosti a náboje ( $m/z$ ), a to prostřednictvím statických nebo dynamických elektrických či magnetických sil ve vakuu a jejich následnou detekcí podle poměru  $m/z$  (kvalitativní analýza) a množství (kvantitativní analýza) (Gross, 2011).

### Hmotnostní spektrometr

Hmotnostní spektrometr (Obr. 7) se skládá ze 3 hlavních částí – iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru. Iontový zdroj slouží k ionizaci vzorku, hmotnostní analyzátor k separaci vzniklých iontů dle  $m/z$  a detektor k zaznamenání vybraných iontů. Vzorek je přiváděn z atmosférického tlaku do prostředí vakua iontového zdroje pomocí vakuového zámku. Na detektor je napojen datový systém, který shromažďuje a zpracovává data MS analýzy. Výsledkem analýzy je hmotnostní spektrum, čímž se rozumí dvourozměrné znázornění intenzity signálu (píku) a  $m/z$  v daném čase. Intenzita píku přináší informaci o množství daného iontu, zatímco poloha hmotnostního píku udává informaci o  $m/z$  příslušného iontu (Gross, 2011). Na základě získaných údajů je možné určit složení analyzovaného vzorku.



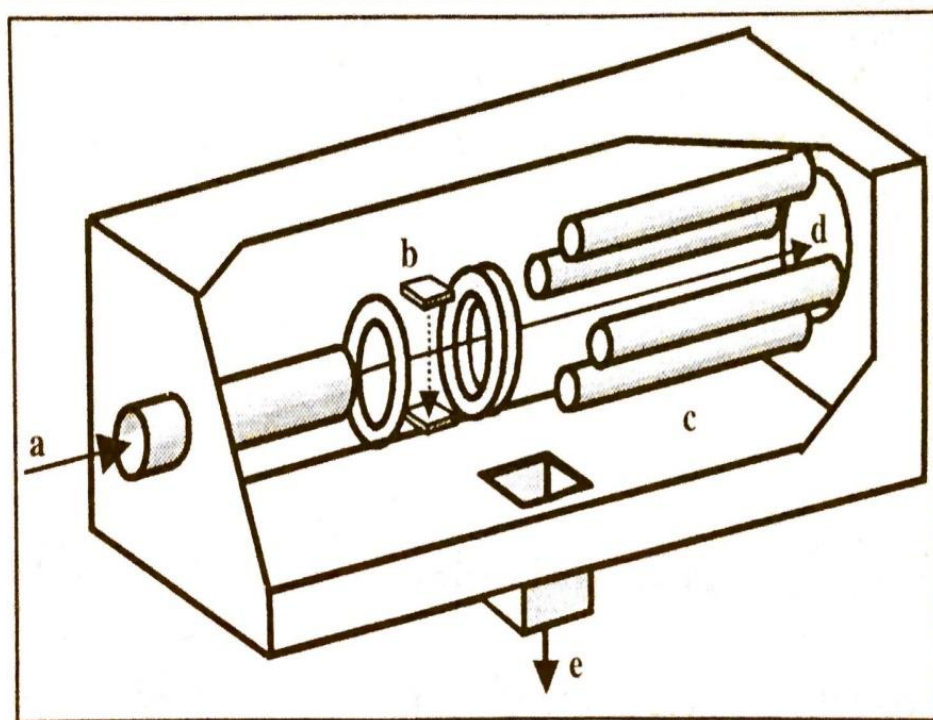
Obr. 7: Schéma hmotnostního spektrometru (převzato a upraveno podle Gross, 2011).

Pro MS analýzu je stěžejní částí hmotnostního spektrometru analyzátor, neboť právě zde probíhá separace iontů dle poměru  $m/z$  (Friedecký a Lemr, 2012). Při separaci iontů jsou využívána statická nebo dynamická elektrická či magnetická pole, ať už samostatně, nebo v různé kombinaci. Hmotnostní analyzátoři lze na základě rozdílu ve způsobu separace iontů rozdělit do tří skupin.

První z nich představují skenující analyzátory, které separují ionty postupně v daném čase, tudíž na detektor jsou vždy přenášeny ionty pouze s vybranou hodnotou  $m/z$ . Mezi skenující analyzátory řadíme kvadrupólové a magnetické sektorové analyzátory (De Hoffmann and Stroobant, 2007). Druhá skupina analyzátorů pracuje na principu současného přenosu všech iontů do letové trubice, v níž následně dochází k separaci iontů podle doby letu, kterou při dopadu zaznamenává detektor. Tento princip využívají průletové analyzátory (*Time of Flight*, TOF analyzátory). Poslední skupinu analyzátorů představují iontové pasti, iontově cyklotronové rezonance (ICR), potažmo elektrostatické iontové pasti (Orbitrapy), pro něž je typický záchyt separovaných iontů v cele či pasti (Friedecký a Lemr, 2012).

Kvadrupólové analyzátory (*Quadrupole*, Q), jakož i 2D nebo 3D iontové pasti využívají pohyb iontu po stabilní trajektorii v oscilujícím elektrickém poli k separaci dle poměru  $m/z$ . Nejpoužívanějším analyzátozem dnešní doby je kvadrupól (Obr. 8), skládající se ze 4 tyčových elektrod o kruhovém či hyperbolickém řezu (De Hoffmann and Stroobant, 2007; Friedecký a Lemr, 2012). Protilehlé tyče nesou vždy shodný náboj, přičemž je na ně aplikována kombinace střídavého a stejnosměrného napětí. Právě velikost stejnosměrného napětí a amplituda střídavého napětí v čase umožňuje iontům s vybranou  $m/z$  pohybovat se až k detektoru, pakliže mají stabilní trajektorii. Ionty, které z důvodu vychýlení nemají při pohybu stabilní trajektorii, jsou vakuem odsáty pryč. Kvadrupólový analyzátor je malý, levný, rychlý, má široký dynamický rozsah a v QQQ uspořádání (trojitý kvadrupól) je vysoce citlivý. Jeho rozlišení je ovšem nízké a rozsah měřených hmotností je menší (Klouda, 2003; Friedecký a Lemr, 2012).

Moderním trendem MS je vytváření kombinací hmotnostních analyzátorů, čímž dochází ke vzniku přístrojů tandemové hmotnostní spektrometrie (Friedecký a Lemr, 2012). V současné době je rozšířená kombinace tří kvadrupólů, tzv. trojitý kvadrupól (QQQ). Svou popularitu na trhu získal kvůli své vysoké citlivosti, specificitě, robustnosti a cenové dostupnosti. Jeho principem je separace a izolace prekurzorových iontů v prvním kvadrupólu (Q-1, první hmotnostní analyzátor). Tyto ionty následně přecházejí do druhého kvadrupólu (Q-2, kolizní cela), kde v důsledku kolize rychle se pohybujících iontů s atomy kolizního plynu (dusík, argon) dochází k jejich další ionizaci. Následkem těchto srážek se zvyšuje vnitřní energie iontů, čímž se ionty začnou fragmentovat na specifické produktové ionty, jež přecházejí do třetího kvadrupólu (Q-3, druhý hmotnostní analyzátor), kde jsou opět separovány (Skoog *et al.*, 1998; Friedecký a Lemr, 2012).



Obr. 8: Hmotnostní spektrometr s kvadrupólem: a – vstup vzorku, b – zdroj iontů, c – kvadrupól, d – detektor, e – vakuum (převzato z Klouda, 2003).

Způsob skenování QQQ může být různý. Jsou známy 4 módy, přičemž každý z nich má jiné využití. První mód – sken produktových iontů – se využívá zejména pro kvalitativní analýzu, popř. ke zjištění vhodných přechodů pro kvantitativní analýzu. Principem je vznik prekurzorového iontu v Q-1 o definované hodnotě  $m/z$ , načež je vzniklý ion fragmentován v Q-2. Vzniklé fragmenty jsou skenovány v Q-3 (v definovaném rozsahu hodnot  $m/z$ ) a detekovány. Na konci módu získáváme spektrum fragmentů příslušného prekurzorového iontu, což je užitečné pro identifikaci molekuly.

Druhý mód – sken prekurzorových iontů – se uplatňuje při sledování látek nesoucích shodnou funkční skupinu, jelikož se vyznačují charakteristickou fragmentací. Tento přístup využívá Q-1 pro skenování iontů v definovaném rozsahu hodnot  $m/z$  tak, že ionty se zvyšující se hodnotou  $m/z$  postupně propouštějí do Q-2, kde se fragmentují. Q-3 pak propouští pouze jeden produktový ion o definované  $m/z$ , který je v návaznosti na to zaznamenán detektorem.

Třetí mód – sken neutrálních ztrát – se využívá při sledování látek nesoucích shodnou strukturní část. Tento přístup uplatňuje skenování určitého rozsahu hodnot  $m/z$  v Q-1 i Q-3 s posunem, který odpovídá hmotnostní diferenciaci, jež vzniká při odštěpení neutrálního fragmentu v Q-2, specifického pro určitou strukturní složku.

Čtvrtý mód – sledování rozpadu iontu (*Selected Reaction Monitoring, SRM*) – se používá především pro kvantitativní analýzu látek. Jedná se o velmi citlivý a selektivní přístup, jehož výhodou je vysoká rychlost měření, což umožňuje při jedné SRM analýze kvantifikovat až stovky analytů (*Multiple Reaction Monitoring, MRM*). SRM mód využívá Q-1 pro výběr prekurzorového iontu, jenž je v Q-2 fragmentován kolizní energií definovanou Q-3 (Friedecký a Lemr, 2012; Anon., 2017).

## **2.5 Validace bioanalytické metody**

Vývoj bioanalytické metody představuje soubor postupů, díky nimž je stanovena koncentrace příslušných analytů v biologických vzorcích. V současné době musí být každá vyvinutá bioanalytická metoda validována, čímž je zaručena analytická a diagnostická kvalita, jakož i spolehlivost analytických výsledků (European Medicines Agency, 2019).

Validací metod se zabývá řada organizací jako je např. EMA (*European Medicines Agency*), FDA (*Food and Drug Administration*) nebo IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*). Tyto organizace vydávají směrnice s požadavky pro validaci metody. Jelikož se každá z těchto organizací zaměřuje na validaci metod pro odlišné aplikační oblasti (farmaceutika x potravinářství), mohou se směrnice v jednotlivých akceptačních kritériích validačních parametrů lišit (Nováková a Douša, 2013b).

Se zřetelem na doporučení směrnice od organizace EMA zahrnuje validace chromatografických metod celkem 11 validačních parametrů (Tab. 10). Jedná se o selektivitu, specificitu, matricový efekt, kalibrační křivku, měřicí rozsah (dolní mez kvantifikace – LLOQ, horní mez kvantifikace – ULOQ), správnost, přesnost, přenos analytu mezi vzorky (carry-over), integritu ředění, stabilitu a reprodukovatelnost reinjekce.

Tab. 10: Validační parametry a jejich limity dle EMA (2019)

<i>Validační kritéria</i>		<i>Limity</i>
<i>Selektivita / specificita</i>	Slepé vzorky nejméně 6 šarží	Bez interference Pro případné interferenční odezvy < 20 % LLOQ (analyt) a < 5 % LLOQ (IS)
<i>Matricový efekt</i>	Minimálně 3 replikáty nízkých a vysokých koncentrací QC (Quality Control) vzorků (matrice nejméně 6 šarží)	Správnost ± 15 % Přesnost < 15 %
<i>Kalibrační křivka</i>	Slepý vzorek, nulový kalibrátor (slepý vzorek + IS) a nejméně 6 koncentračních úrovní kalibračních standardů včetně LLOQ a ULOQ	Minimálně 3 na sobě nezávislé analytické běhy v rozmezí několika dní Správnost ± 20 % pro LLOQ, pro ostatní ± 15 % V případě použití replikátů nutné splnit tyto podmínky nejméně pro 50 % kalibračních standardů/koncentrační úroveň
<i>Měřicí rozsah</i>	Vychází z kalibrační závislosti	LLOQ/ULOQ
<i>Správnost</i>	Nejméně 4 koncentrační úrovně v rozsahu kalibrační křivky (LLOQ, LQC*, MQC**, HQC***)	Správnost ± 20 % pro LLOQ, pro ostatní ± 15 %
<i>Přesnost</i>	Minimálně 5 replikátů pro každou koncentrační úroveň QC vzorku Alespoň 3 analytické běhy v průběhu minimálně 2 dnů	Přesnost ± 20 % pro LLOQ, pro ostatní ± 15 %
<i>Přenos analytu mezi vzorky</i>	Analýza slepých vzorků za kalibračním standardem ULOQ Použití stejné matrice při ředění jako při přípravě QC vzorků	Odezva ve slepých vzorcích < 20 % LLOQ (analyt) a < 5 % (IS)
<i>Integrita ředění</i>	Testování nejméně 5 replikátů na jeden ředící faktor (při vyšší koncentraci než ULOQ) v jednom analytickém běhu	Správnost ± 15 % Přesnost < 15 %
<i>Stabilita</i>	Použití nízké a vysoké koncentrace QC vzorku Analýza stability minimálně 3 QC vzorků podle koncentrační úrovně /skladovacích podmínek/doby uchovávání	Správnost ± 15 %
<i>Reprodukovatelnost reinjekce</i>	Opakované měření QC vzorků	Pro posouzení správnosti a přesnosti (v případě poruchy zařízení)

\*LQC = nízký koncentrační bod QC (3 × LLOQ)

\*\*MQC = střední koncentrační bod QC (30–50 % rozsahu kalibrační křivky)

\*\*\*HQC = horní koncentrační bod QC (minimálně 75 % ULOQ)

## 3 Experimentální část

### 3.1 Přístrojové vybavení

Příprava vzorků pro LC/MS analýzu:

- analytické váhy AND HR 120 (BioTech)
- automatické pipety (Eppendorf)
- digestoř (Flores Valles)
- skleněné a plastové chemické nádoby, plastové špičky, víčka
- třepačka MS 3 basic (IKA)
- ultrazvuková lázeň Elmasonic S 100 H s ohřevem (Elma)

LC/MS analýza:

- Tandemový hmotnostní spektrometr typu trojitý kvadrupól Triple Quad 6500 (SCIEX, Framingham, MA, USA)
- Kapalinový chromatograf UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, CA, USA)
- Aminopropylová kolona Luna (3  $\mu\text{m}$ , 100 x 2 mm, Phenomenex, Torrance, USA)

Procesování a analýza dat:

- Microsoft Office Excel 2013
- Analyst Software 1.6.2 (SCIEX)
- MultiQuant Software 3.0 (SCIEX)

### 3.2 Chemikálie

Standardy:

- 10mM SAICAr (FN Olomouc\*)
- 10mM stachyosa (FN Olomouc)
- 2,8-dihydroxyadenin (Sigma-Aldrich, USA)
- 20mM erythritol (FN Olomouc)
- 20mM glukosa (FN Olomouc)
- 20mM maltosa (FN Olomouc)
- 20mM maltotriosa (FN Olomouc)
- 20mM myo-inositol (FN Olomouc)
- 20mM perseitol (FN Olomouc)
- 20mM rhamnosa (FN Olomouc)
- 20mM ribosa (FN Olomouc)

- 20mM sedoheptulosa (FN Olomouc)
- 20mM sorbitol (FN Olomouc)
- 20mM xylitol (FN Olomouc)
- 2-deoxyuridin (Sigma-Aldrich, Jižní Korea)
- 30mM 2-methylbutyrylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
- 30mM 3-methylkrotonylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
- 30mM acetylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
- 30mM butyrylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
- 30mM fenylpropionylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
- 30mM hexanoylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
- 30mM isobutyrylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
- 30mM isovalerylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
- 30mM propionylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
- 30mM suberylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
- 30mM tiglylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
- 30mM valerylglycin (VU Medical Center, Nizozemsko)
- Adenin (Sigma-Aldrich, USA)
- Adenosin (Sigma-Aldrich, Čína)
- AICAr (Sigma-Aldrich, Kanada)
- Argininosukcinát (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)
- Deoxyadenosin (Sigma-Aldrich, USA)
- Deoxyguanosin (Sigma-Aldrich, Čína)
- Deoxyinosin (Sigma-Aldrich, Čína)
- Dihydrothymidin (Sigma-Aldrich, USA)
- Dihydrouracil (Sigma-Aldrich, USA)
- Galaktitol (Sigma-Aldrich, USA)
- Glutarylglýcin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Guanidinoacetát (Calbiochem, USA)
- Guanosin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Homocitrulin (Sigma-Aldrich, USA)
- Hypoxanthin (Sigma-Aldrich, Japonsko)
- Inosin (Sigma-Aldrich, Čína)
- Kreatin (Sigma-Aldrich, Švýcarsko)



- Kreatinin (Sigma-Aldrich, Japonsko)
- Kyselina močová (Sigma-Aldrich, Maďarsko)
- Kyselina orotová (ICN Biomedicals, USA)
- Kyselina oxalová (Sigma-Aldrich, USA)
- Kyselina sialová (Sigma-Aldrich, USA)
- N-Acetylaspartát (Sigma-Aldrich, Itálie)
- N-Acetylglutamin (Sigma-Aldrich, USA)
- N-Acetylleucin (Sigma-Aldrich, Německo)
- N-Acetylserin (Sigma-Aldrich, USA)
- N-Acetylvalin (Merck KGaA, Švýcarsko)
- Orotidin (Toronto Research Chemicals, Kanada)
- Sukcinylaceton (Sigma-Aldrich, USA)
- Sukcinyladenosin (Toronto Research Chemicals, Kanada)
- Thymidin (Sigma-Aldrich, Čína)
- Thymin (Sigma-Aldrich, USA)
- Uracil (Sigma-Aldrich, USA)
- Uridin (Sigma-Aldrich, Německo)
- Xanthin (Sigma-Aldrich, USA)

Interní standardy:

- 10mM  $^{13}\text{C}_2^{15}\text{N}$ -hexanoylglycin (FN Olomouc)
- 13,3mM  $^{13}\text{C}_6$ -galaktitol (FN Olomouc)
- 3,2mM  $^{13}\text{C}_3$ -kyselina sialová (FN Olomouc)
- 3,8mM  $^{13}\text{C}_5$ -adenosin (FN Olomouc)
- 52mM D<sub>3</sub>-kreatinin (FN Olomouc)
- 6,3mM  $^{15}\text{N}_2$ -kyselina orotová (FN Olomouc)
- 6,5mM D<sub>3</sub>-kreatin (FN Olomouc)
- 6,8mM  $^{15}\text{N}_2$ -xanthin (FN Olomouc)
- 7,1mM D<sub>2</sub>-hypoxanthin (FN Olomouc)
- 8,6mM D<sub>2</sub>-guanidinoacetát (FN Olomouc)
- 8,7mM  $^{15}\text{N}_2$ -uracil (FN Olomouc)

\* v laboratoři používáno pro rutinní analýzu moči pomocí GC/MS

Biologický materiál:

- 2 vzorky moče pacientů s DMP a 6 vzorků externí kontroly kvality s definovanou diagnózou (ERNDIM, *European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism*) (FN Olomouc)
- 57 vzorků močí zdravých jedinců (FN Olomouc)

Další:

- 100% acetonitril – mobilní fáze B (Honeywell Riedel-de-Haën, Německo)
- 20mM octan amonný (pH 9,75) – mobilní fáze A (FN Olomouc)
- 25% roztok amoniaku (Merck KGaA, Německo)
- LC/MS voda (Honeywell Riedel-de-Haën, Německo)
- Sigmatrix močový diluent (Sigma-Aldrich, USA)

### 3.3 Příprava zásobních roztoků standardů

Zásobní roztoky standardů 2-deoxyuridinu, adeninu, adenosinu, deoxyadenosinu, deoxyguanosinu, deoxyinosinu, dihydrothyminu, dihydrouracilu, galaktitolu, glutarylglycinu, guanidinoacetátu, guanosinu, homocitrulinu, hypoxanthinu, inosinu, kreatinu, kreatininu, kyseliny močové, kyseliny orotové, kyseliny oxalové, N-acetylaspartátu, N-acetylglutaminu, N-acetylleucinu, N-acetylserinu, N-acetylvalinu, sukcinylacetonu, thymidinu, thyminu, uracilu, uridinu a xanthinu byly připraveny o koncentraci 20 mM. Standardy, u nichž nebylo možné zajistit 20mM roztoky, byly připraveny v následujících koncentracích: 2,8-dihydroxyadenin (4,3 mM), orotidin a sukcinyladenosin (5 mM), AICAr, kyselina sialová a argininosukcinát (10 mM). Všechny standardy byly naváženy podle vypočítané navážky a rozpuštěny v odpovídajícím objemu LC/MS vody. K látkám se špatnou rozpustností bylo přidáno 10–100  $\mu$ l 25% roztoku amoniaku a po důkladném promíchání byly látky umístěny do ultrazvukové lázně (cca 15 min, 50 °C). Připravené zásobní roztoky byly zamrazeny (-20 °C).

Zásobní roztoky standardů SAICAr, acylglycinů (acetylglycin, propionylglycin, butyrylglycin, isobutyrylglycin, valerylglycin, isovalerylglycin, 2-methylbutyrylglycin, hexanoylglycin, 3-methylkrotonylglycin, tiglylglycin, fenypropionylglycin, suberylglycin), cukrů (glukosa, rhamnosa, sedoheptulosa, ribosa, maltotriosa, maltosa, stachyosa), alkoholů (xylitol, erythritol, sorbitol, perseitol, myo-inositol) a značených interních standardů ( $^{13}\text{C}_5$ -adenosin,  $^{13}\text{C}_6$ -galaktitol, D<sub>2</sub>-guanidinoacetát,  $^{13}\text{C}_2^{15}\text{N}$ -hexanoylglycin,

D<sub>2</sub>-hypoxanthin, D<sub>3</sub>-kreatin, D<sub>3</sub>-kreatinin, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-kyselina orotová, <sup>13</sup>C<sub>3</sub>-kyselina sialová, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-uracil, <sup>15</sup>N<sub>2</sub>-xanthin) byly již připraveny o definované koncentraci (kapitola 3.2).

### 3.4 Příprava směsi značených interních standardů

Směs značených interních standardů (IS) byla připravena smícháním 11 zásobních roztoků, jejichž původní koncentrace, objem a výsledná koncentrace ve směsi jsou uvedeny v Tab. 11. Směs byla poté doplněna 20mM octanem amonným na celkový objem 50 ml. Hotová směs značených IS byla rozdělena na alikvoty (1 ml), které byly zamrazeny (-20 °C).

Tab. 11: Seznam značených IS v 50ml směsi s 20mM octanem amonným.

Značený IS	Koncentrace zásobního roztoku (mM)	Objem IS ve směsi (μl)	Výsledná koncentrace IS ve směsi (μM)
<sup>13</sup> C <sub>5</sub> -Adenosin (IS-Ado)	3,8	133,0	10,0
<sup>13</sup> C <sub>6</sub> -Galaktitol (IS-Gal)	13,3	376,0	100,0
D <sub>2</sub> -Guanidinoacetát (IS-GAA)	8,6	292,0	50,0
<sup>13</sup> C <sub>2</sub> <sup>15</sup> N-Hexanoylglycin (IS-HG)	10,0	25,0	5,0
D <sub>2</sub> -Hypoxanthin (IS-Hx)	7,1	72,0	10,2
D <sub>3</sub> -Kreatin (IS-Krea)	6,5	364,0	47,4
D <sub>3</sub> -Kreatinin (IS-Kr)	52,0	180,0	187,2
<sup>15</sup> N <sub>2</sub> -Kyselina orotová (IS-OA)	6,3	80,0	10,0
<sup>13</sup> C <sub>3</sub> -Kyselina sialová (IS-SA)	3,2	366,0	23,6
<sup>15</sup> N <sub>2</sub> -Uracil (IS-U)	8,7	58,0	10,1
<sup>15</sup> N <sub>2</sub> -Xanthin (IS-X)	6,8	77,0	10,4

### 3.5 Optimalizace MRM přechodů

Nezbytnou součástí při vývoji metody bylo nastavení specifických parametrů studovaných látek (+/-MRM přechody, retenční čas, deklasterační potenciál, vstupní potenciál, kolizní energie a výstupní potenciál). Toho bylo dosaženo tzv. „laděním“ standardů jednotlivých metabolitů.

Ze zásobních roztoků standardů (kapitola 3.3) byly připraveny 10–100μM roztoky, které byly ředěny v mobilní fázi A a B (1:1). Mobilní fáze A obsahovala 20mM octan amonný (pH 9,75) a mobilní fáze B 100% acetonitril. Každý vzorek byl přímou infuzí zaveden do hmotnostního spektrometru Triple Quad 6500 a následně bylo spuštěno manuální a poté automatické ladění v programu Analyst. Pro jednotlivé analyty bylo získáno 4–5 +MRM (v některých případech i -MRM) přechodů s dalšími údaji (viz výše), které byly uloženy pod novou metodou a využity v další fázi vývoje metody.

### 3.5.1 LC/MS analýza směsí standardů

Z 10–100 $\mu$ M standardů (kapitola 3.5) byly jejich smícháním ve stejném poměru připraveny směsné roztoky: purinů a pyrimidinů (1), N-acetylovaných aminokyselin, homocitrulinu, argininosukcinátu a sukcinylacetonu (2), acylglycinů (3), kreatinu, kreatininu a kyseliny močové (4), kyseliny oxalové, kyseliny sialové a guanidinoacetátu (5), alkoholů (6), cukrů (7) a značených IS (8).

Takto nachystané směsi byly připraveny k LC/MS analýze nově zavedenou metodou (kapitola 3.5). Separace standardů byla provedena pomocí kapalinového chromatografu UltiMate 3000 RS na aminopropylové koloně Luna. K detekci byl použit hmotnostní spektrometr Triple Quad 6500.

Jednotlivé analýzy byly vyhodnoceny pomocí programu Analyst. Pro každý analyt byl vybrán nejcitlivější MRM přechod, který byl přidán do finální metody. Nastavení dalších parametrů metody (doba analýzy, gradientová eluce, průtok aj.) popisuje kapitola 4.1.

#### Eluční chování isomerů acylglycinů

Ze zásobních roztoků acylglycinů (acetylglycin, propionylglycin, butyrylglycin, isobutyrylglycin, valerylglycin, isovalerylglycin, 2-methylbutyrylglycin, hexanoylglycin, 3-methylkrotonylglycin, tiglylglycin, fenypropionylglycin, suberylglycin, glutarylglycin) byly připraveny 30 $\mu$ M roztoky (řaděno v LC/MS vodě). Od každého standardu bylo odebráno 30  $\mu$ l do vialky. Takto připravené standardy acylglycinů byly analyzovány na LC/MS finální metodou (kapitola 3.5.1).

Zároveň byl připraven směsný vzorek acylglycinů, a to smícháním výše zmíněných 30 $\mu$ M standardů ve stejném poměru. Výsledná koncentrace jedné látky ve směsi byla 2,3  $\mu$ M. Směsný vzorek byl následně taktéž analyzován finální metodou (kapitola 3.5.1).

Pomocí programů Analyst a MultiQuant byly vyhodnoceny MRM přechody isomerů (butyrylglycin/isobutyrylglycin, valerylglycin/isovalerylglycin/2-methylbutyrylglycin, 3-methylkrotonylglycin/tiglylglycin) a jejich retenční chování.

### 3.6 Stanovení validačních parametrů – linearita, limit detekce, limit kvantifikace

Vyvinutá metoda byla následně validována. Byly stanoveny validační parametry linearita, limit detekce (LOD), limit kvantifikace (LOQ), opakovatelnost (přesnost v sériích), mezilehlá přesnost (přesnost mezi sériemi) a výtěžnost (recovery).

Validace proběhla ve 2 experimentech, přičemž prvním z nich byla stanovena linearita, LOD a LOQ.

V rámci experimentu bylo připraveno 6 směsí standardů o definované koncentraci (kapitola 3.6.1–6), které byly použity jako horní body 10tíbodových kalibračních řad dvojnásobného ředění. Matricí jednotlivých koncentračních bodů byl močový diluent, jehož použitím se simulovaly reálné podmínky analytů v moči. Pro směs standardů kreatinu, kreatininu a kyseliny močové byl použit 20mM octan amonný, vzhledem k přítomnosti těchto látek v diluentu, jehož užitím by byla analýza zkreslená.

Rozsah kalibračního rozmezí příslušných analytů byl určen podle fyziologických koncentračních rozmezí analytů v moči (převzato z databáze HMDB – *The Human Metabolome Database* a z předpisu užívaných mezí v laboratoři metabolomiky, LF UPOL). Rozsah byl zvolen tak, aby co nejlépe pokrýval jak fyziologické, tak patologické koncentrační hodnoty analytů v moči.

Připravené kalibrační směsi standardů byly po LC/MS analýze finální metodou (kapitola 3.5.1) vyhodnoceny prostřednictvím MultiQuant. Byla vyhodnocena linearita kalibračních řad a v návaznosti na to byl stanoven LOD a LOQ pro jednotlivé analyty.

### **3.6.1 Příprava kalibrační směsi purinů a pyrimidinů (PP)**

Purinová a pyrimidinová směs (PP) obsahovala následující standardy (22): 2,8-dihydroxyadenin, 2-deoxyuridin, adenin, adenosin, AICAr, deoxyadenosin, deoxyguanosin, deoxyinosin, dihydrothymidin, dihydrouracil, guanosin, hypoxanthin, inosin, kyselina orotová, orotidin, SAICAr, sukcinyladenosin, thymidin, thymidin, uracil, uridin a xanthin. Z jejich zásobních roztoků byly připraveny 2,2mM roztoky, ředěné v močovém diluentu, jejichž smícháním ve stejném poměru vznikl výchozí směsný vzorek. Výsledná koncentrace látky ve směsi byla 100  $\mu$ M.

Z této směsi byla vytvořena kalibrační řada dvojnásobného ředění (0,2–100  $\mu$ M). Celkem bylo připraveno 10 koncentračních hladin (ke každému koncentračnímu bodu byla přidána směs značených IS v poměru 1:1), slepý vzorek (močový diluent) a nulový kalibrátor (močový diluent se směsí značených IS v poměru 1:1).

### **3.6.2 Příprava kalibrační směsi N-acetylovaných aminokyselin, homocitrulinu, argininosukcinátu a sukcinylacetonu (AMKHAS)**

Ze zásobních roztoků standardů N-acetylaspartátu, N-acetylleucinu, N-acetylglutaminu, N-acetylvalinu, N-acetylserinu, homocitrulinu, argininosukcinátu a sukcinylacetonu byly připraveny 0,8mM roztoky ředěné v močovém diluentu. Smícháním těchto roztoků ve stejném poměru vznikl směsný vzorek, v němž výsledná koncentrace látky ve směsi činila 100  $\mu$ M.

Z připravené směsi byla vytvořena kalibrační řada dvojnásobného ředění (0,2–100  $\mu\text{M}$ ). Dohromady bylo připraveno 10 koncentračních hladin, slepý vzorek a nulový kalibrátor stejným způsobem jako u PP (kapitola 3.6.1).

### **3.6.3 Příprava kalibrační směsi acylglycinů (ACGLY)**

Směs acylglycinů (ACGLY) obsahovala 13 standardů: acetylglycin, propionylglycin, butyrylglycin, isobutyrylglycin, valerylglycin, isovalerylglycin, 2-methylbutyrylglycin, hexanoylglycin, 3-methylkrotonylglycin, tiglylglycin, fenylpropionylglycin, suberylglycin a glutarylglycin. Ze zásobních roztoků těchto standardů byly připraveny 650 $\mu\text{M}$  roztoky, které byly ředěny močovým diluentem. Připravené roztoky byly smíchány ve stejném poměru, čímž vznikl směsný vzorek, v němž výsledná koncentrace látky ve směsi byla 50  $\mu\text{M}$ .

Ze směsi acylglycinů byla vytvořena kalibrační řada dvojnásobného ředění (0,1–50  $\mu\text{M}$ ). Jednotlivé koncentrační body kalibrační řady, slepý vzorek a nulový kalibrátor byly připraveny stejným způsobem jako u PP (kapitola 3.6.1).

### **3.6.4 Příprava kalibrační směsi kreatinu, kreatininu a kyseliny močové (KREA)**

Ze zásobních roztoků standardů kreatinu, kreatininu a kyseliny močové byly připraveny 6mM roztoky, které byly ředěny v 20mM octanu amonném. Smícháním těchto roztoků v poměru 1:1:1 vznikl směsný vzorek, v němž výsledná koncentrace látky ve směsi byla 2 mM.

Z takto připravené směsi byla v další fázi vytvořena kalibrační řada dvojnásobného ředění (4–2000  $\mu\text{M}$ ). Ke každému koncentračnímu bodu kalibrační řady byla přidána směs značených IS v poměru 1:1. Dále byl připraven slepý vzorek (20mM octan amonný) a nulový kalibrátor (20mM octan amonný se směsí značených IS v poměru 1:1).

### **3.6.5 Příprava kalibrační směsi kyseliny oxalové, guanidinoacetátu a kyseliny sialové (OXA)**

Ze zásobních roztoků standardů kyseliny oxalové, guanidinoacetátu a kyseliny sialové byly připraveny 1,5mM roztoky, ředěné močovým diluentem, jejichž smícháním v poměru 1:1:1 vznikl směsný vzorek. Výsledná koncentrace látky ve směsi byla 500  $\mu\text{M}$ .

Ze směsi byla vytvořena kalibrační řada dvojnásobného ředění (1–500  $\mu\text{M}$ ). Příslušné koncentrační body kalibrační řady, slepý vzorek a nulový kalibrátor byly připraveny jako u PP (kapitola 3.6.1).

### 3.6.6 Příprava kalibrační směsi cukrů a alkoholů (CA)

Směs cukrů a alkoholů (CA) obsahovala standardy (12): glukosu, rhamnosu, sedoheptulosu, ribosu, maltotriosu, maltosu, stachyosu, galaktitol, xylitol, erythritol, perseitol a myo-inositol. Z jejich zásobních roztoků byly připraveny 6mM roztoky, jež byly ředěné močovým diluentem. Smícháním těchto roztoků ve stejném poměru vznikl směsný vzorek. Výsledná koncentrace látky ve směsi byla 500  $\mu$ M.

Ze směsného vzorku byla vytvořena kalibrační řada dvojnásobného ředění (1–500  $\mu$ M). Koncentrační body kalibrační řady, slepý vzorek a nulový kalibrátor byly připraveny jako u PP (kapitola 3.6.1).

### 3.7 Stanovení validačních parametrů – opakovatelnost, mezilehlá přesnost a výtěžnost

V rámci validace metody se ke stanovení opakovatelnosti (přesnost v sériích), mezilehlé přesnosti (přesnost mezi sériemi) a celkové výtěžnosti (recovery) využívá kontrolních vzorků, tzv. vzorků kontroly kvality (QC vzorky). Nezbytnou součástí jejich analýzy je taktéž přítomnost kalibračních řad standardů obsažených v QC vzorcích v rámci přídavek. Jejich prostřednictvím je možné analyty kvantifikovat a v návaznosti na to určit validační parametry.

Byly připraveny 2 přídávky standardů pro QC – každý na 3 koncentračních hladinách. Koncentrační hladiny analytů v jednotlivých přídávkách byly určeny z rozsahu kalibračních křivek (kapitola 3.6.1–6).

Přídavek pro nízký koncentrační bod QC (LQC) byl upraven tak, aby odpovídal spodní hranici fyziologických hodnot analytů v moči (porovnáváno s hodnotami v databázi HMDB a s hodnotami z předpisu užívaných mezí v laboratoři metabolomiky, LF UPOL). Přídavek pro střední koncentrační bod QC (MQC) představoval 25 % a pro horní koncentrační bod QC (HQC) 75 % rozsahu kalibrační křivky.

Každý koncentrační bod QC vzorku byl připraven v 5 replikátech pro analýzu v rámci 1 dne. Pro stanovení mezilehlé přesnosti byl totožný experiment opakován po další 2 dny. Matricí QC vzorků byl směsný vzorek moči zdravých jedinců, tzv. poolovaná moč (kapitola 3.7.1).

Následně byly připraveny 2 vzorky kalibračních standardů pro kalibrační řady čtyřnásobného ředění (5 koncentračních bodů). Při ředění byl v prvním případě použit močový diluent, ve druhém 20mM octan amonný.

V rámci 1 dne bylo tedy analyzováno 30 QC vzorků, 10 vzorků poolované moče, 10 kalibračních bodů, 3 slepé vzorky a 2 nulové kalibrátory. Analýzou vzorků poolované

moče byly zjištěny koncentrační hladiny analytů v moči, které byly při vyhodnocování QC vzorků přičteny k příslušným koncentracím analytů v přídatku.

### 3.7.1 Příprava směsného vzorku moče

Pro přípravu směsného vzorku moče (tzv. poolované) bylo vybráno 38 vzorků moči zdravých jedinců. Vzorky moče s koncentrací kreatininu vyšší než 2 mmol/l byly naředěny na tuto koncentrační hladinu. Poolovaná moč vznikla smícháním 200  $\mu$ l od každého z 38 vzorků moče. Takto připravená poolovaná moč byla rozpipetována na alikvoty (400  $\mu$ l), které byly zamrazeny (-20 °C).

Poolovaná moč byla naředěna na koncentraci kreatininu 2 mmol/l, aby bylo po jejím smíchání s přídatky QC v poměru 1:1 dosaženo výsledné koncentrace kreatininu v moči 1 mmol/l.

### 3.7.2 Příprava směsí pro výrobu QC vzorků a kalibračních standardů

QC vzorky a kalibrační standardy byly připraveny ze směsí standardů. Jednotlivé směsi byly smíchány ze zásobních roztoků standardů příslušných pro danou směs (kapitola 3.6.1–6). Finální koncentrace směsi PP byla 654  $\mu$ M, směsi AMKHAS 2,22 mM, směsi ACGLY 2,62 mM, směsi KREA 6 mM, směsi OXA 5 mM a směsi CA 1,7 mM.

#### Příprava QC vzorků

Ze směsí byly připraveny 2 přídatky pro QC vzorky – QC1 a QC2 – na 3 koncentračních úrovních (HQC, MQC, LQC). Vzorek QC1 obsahoval standardy směsí PP, AMKHAS a ACGLY (kapitola 3.6.1–3). Požadovaná koncentrace standardů v přídatku pro LQC1, MQC1 a HQC1 je uvedena v Tab. 12.

Tab. 12: Požadovaná koncentrace standardů (obsažených ve směsích PP, AMKHAS a ACGLY, kapitola 3.6.1–3) v přídatku pro LQC1, MQC1 a HQC1.

	<i>PP</i> ( $\mu$ M)	<i>AMKHAS</i> ( $\mu$ M)	<i>ACGLY</i> ( $\mu$ M)
<i>HQC1</i>	75,0	75,0	37,5
<i>MQC1</i>	25,0	25,0	15,0
<i>LQC1</i>	1,0	2,0	1,0

Vzorek QC2 obsahoval standardy směsí KREA, OXA a CA (kapitola 3.6.4–6). Jednotlivé hladiny QC2 vzorku byly připraveny dle Tab. 13. Pro stachyosu byly koncentrační hladiny zvlášť upraveny.



Tab. 13: Požadovaná koncentrace standardů (obsažených ve směsích KREA, OXA a CA, kapitola 3.6.4–6) v přídávku pro LQC2, MQC2 a HQC2.

	<i>KREA</i> ( $\mu\text{M}$ )	<i>OXA</i> ( $\mu\text{M}$ )	<i>CA</i> ( $\mu\text{M}$ )	<i>Stachyosa</i> ( $\mu\text{M}$ )
HQC2	75,0	75,0	37,5	50,0
MQC2	25,0	25,0	15,0	31,0
LQC2	1,0	2,0	1,0	12,5

Každý QC vzorek byl připraven z 30  $\mu\text{l}$  dvojnásobku požadované koncentrace standardu ve směsi (Tab. 12–13), 30  $\mu\text{l}$  poolované moče naředěné na koncentraci kreatininu 2 mmol/l (kapitola 3.7.1) a 10  $\mu\text{l}$  směsi značených IS. Ve výsledku tak bylo dosaženo požadované koncentrace přídávku a zároveň koncentrace kreatininu v moči 1 mmol/l.

Pro každý QC vzorek byly připraveny 3 koncentrační hladiny v 5 replikátech. Před každou trojicí koncentračních bodů byl v rámci analýzy zařazen vzorek poolované moče (30  $\mu\text{l}$  poolované moče naředěné na koncentraci kreatininu 2 mmol/l, 30  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O a 10  $\mu\text{l}$  směsi značených IS). Pro první analýzu byl připraven slepý vzorek (H<sub>2</sub>O). QC vzorky byly po LC/MS analýze vyvinutou metodou (kapitola 3.5.1) vyhodnoceny pomocí MultiQuant.

#### Příprava kalibračních standardů

Ze směsí byly taktéž připraveny 2 vzorky kalibračních standardů – CAL1 a CAL2. Ty představovaly zároveň horní bod kalibrací čtyřnásobného ředění. CAL1 byl připraven smícháním směsí obsažených v QC1, zatímco CAL2 obsahoval standardy směsí přítomných v QC2. Požadovaná koncentrace standardů v rámci směsí pro CAL1 a CAL2 je uvedena v Tab. 14–15.

Tab. 14: Požadovaná koncentrace standardů v rámci směsí pro CAL1 (zároveň horní bod kalibrace).

	<i>PP</i> ( $\mu\text{M}$ )	<i>AMKHAS</i> ( $\mu\text{M}$ )	<i>ACGLY</i> ( $\mu\text{M}$ )
<i>CAL1</i>	100	100	50

Tab. 15: Požadovaná koncentrace standardů v rámci směsí pro CAL2 (zároveň horní bod kalibrace).

	<i>KREA</i> ( $\mu\text{M}$ )	<i>OXA</i> ( $\mu\text{M}$ )	<i>CA</i> ( $\mu\text{M}$ )	<i>Stachyosa</i> ( $\mu\text{M}$ )
<i>CAL2</i>	1709	500	484	50

Kalibrační standardy CAL1 a CAL2 byly použity jako horní koncentrační bod kalibrací čtyřnásobného ředění. CAL1 byl ředěn v močovém diluentu (Sigmatrix) pro simulování reálných podmínek analytů v moči, CAL2 byl ředěn 20mM octanem amonným.

V rámci jednoho kalibračního standardu bylo připraveno 5 koncentračních hladin (ke každému koncentračnímu bodu byla přidána směs značených IS v poměru 1:6), slepý vzorek (močový diluent/20mM octan amonný) a nulový kalibrátor (močový diluent/20mM octan amonný se směsí značených IS v poměru 6:1).

Kalibrace standardů byly po LC/MS analýze vyvinutou metodou (kapitola 3.5.1) vyhodnoceny pomocí MultiQuant.

### **3.8 Aplikace vyvinuté LC/MS metody na vzorky pacientů s vybranými dědičnými metabolickými poruchami**

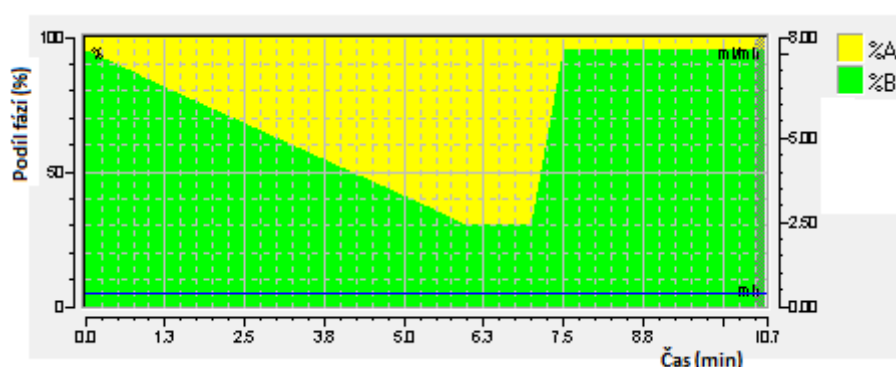
Dva vzorky moči pacientů s DMP, 6 vzorků externí kontroly kvality (ERNDIM) s prokázánými DMP a 19 vzorků moči zdravých jedinců (kontrolní vzorky) byly naředěny na koncentraci kreatininu 1 mmol/l. Ke každému vzorku byla přidána směs značených IS v poměru 6:1. K takto nachystaným vzorkům byly připraveny také kalibrační řady (popisující kapitola 3.7.2), aby bylo možné přítomné metabolity v moči kvantifikovat.

Byla provedena analýza vzorků finální LC/MS metodou (kapitola 3.5.1). Analýzy byly vyhodnoceny prostřednictvím MultiQuant. Naměřené koncentrace analytů ve všech vzorcích byly statisticky vyhodnoceny pomocí Z-skóre. Chromatografické profily moči pacientů byly srovnány s profily kontrolních močí.

## 4 Výsledky

### 4.1 Experimentální podmínky finální LC/MS metody

Separace byly provedeny na kapalinovém chromatografu UltiMate 3000 RS v kombinaci s trojitým kvadrupólem Triple Quad 6500. Pro vlastní separaci byla použita aminopropylková kolona Luna. Mobilní fáze A obsahovala 20mM octan amonný (pH 9,75) a mobilní fáze B 100% acetonitril. Byla nastavena gradientová eluce (Obr. 9): 0–6 min: 95 % → 30 % B, 6–7 min: 30 % B, 7–7,5 min: 30 % → 95 % B, 7,5–10,7 min: 95 % B s průtokovou rychlostí 0,4 ml/min. Nástřik vzorku činil 0,5  $\mu$ l. Délka jedné analýzy byla 10,7 min.



Obr. 9: Průběh gradientové eluce.

Pomocí trojitého kvadrupólu bylo dosaženo detekce látek, a to jak v pozitivním, tak negativním MRM módu. Ionizace analytů byla zajištěna elektrosprejem. Nastavení iontového zdroje bylo následující: teplota iontového zdroje 400 °C, tlak zmlžujícího a pomocného plynu 40 arb, napětí spreje +/-4,5 kV, tlak kolizního plynu 6 arb a tlak clonícího plynu 35 arb. Parametry pro jednotlivé metabolity (retenční čas, deklasterační potenciál, vstupní potenciál, kolizní energie a výstupní potenciál) byly získány při ladění standardů v Analyst. Kvadrupóly Q1 a Q3 byly nastaveny na jednotková rozlišení, čas přepínání polarit v rámci analýzy byl nastaven na 20 ms a pauza mezi měřeními činila 5 ms.

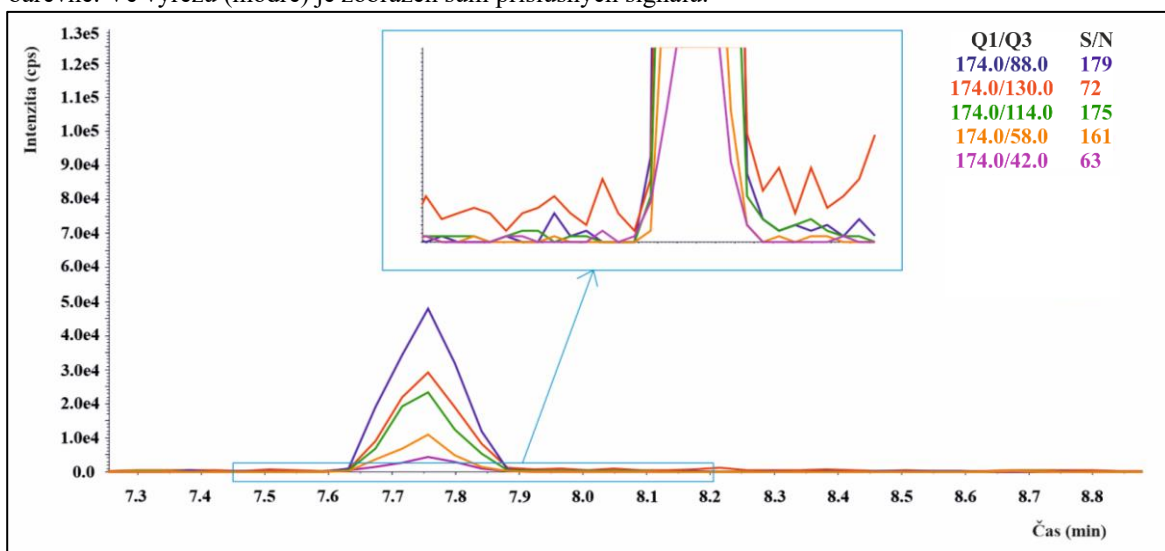
### 4.2 Vývoj a validace LC/MS metody

Vývoj metody započal rešerší o specifických diagnostických močových biomarkerech pro vybrané DMP, jež popisuje kapitola 2.2.1–7. Ty byly následně prostřednictvím standardů laděny na hmotnostním spektrometru nejdříve manuálně a poté automaticky pomocí Analyst. Při manuálním ladění byla pro potvrzení identity hmotnostní spektra analytů porovnávána se spektry z databáze HMDB. Po kontrole spekter bylo spuštěno

automatické ladění. Pro každou látku bylo získáno 4–5 specifických MRM přechodů v negativním, v některých případech i v pozitivním ionizačním módu, včetně dalších parametrů (retenční čas, deklasterační potenciál, vstupní potenciál, kolizní energie a výstupní potenciál). Získané parametry analytů byly uloženy pod novou metodou v programu Analyst.

Následně byly analyzovány směsné vzorky standardů. Po jejich LC/MS analýze byly pomocí Analyst vyhodnoceny všechny MRM přechody pro jednotlivé látky. Názorná ukázka získaných signálů -MRM přechodů pro N-Acetylaspartát je zobrazena na Obr. 10. Na základě poměru signálů k šumu (S/N, *signal to noise*) byl pro každý analyt vybrán nejcitlivější MRM přechod s jeho specifickým produktovým iontem a tímto způsobem upravená metoda byla uložena jako finální. Z Obr. 10 je tedy zřejmé, že do finální metody byl pro N-Acetylaspartát vybrán přechod (174,0/88,0 – S/N 179), který je označen fialově.

Obr. 10: Získané –MRM přechody pro N-Acetylaspartát při ladění metody. Jednotlivé signály jsou rozlišeny barevně. Ve výřezu (modře) je zobrazen šum příslušných signálů.

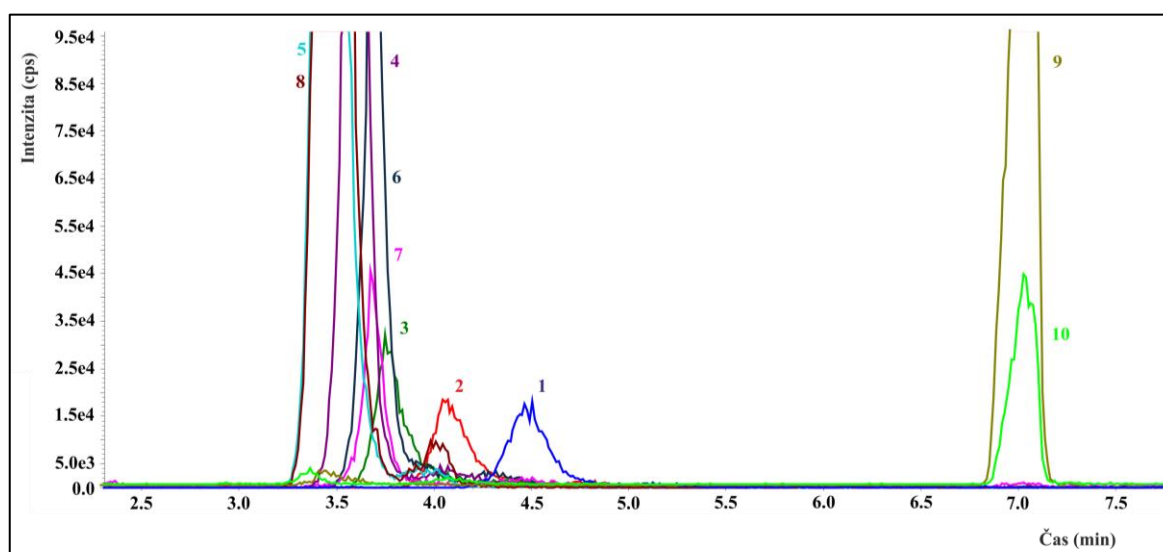


V další fázi vývoje metody bylo testováno eluční chování acylglycinových isomerů (butyrylglycin/isobutyrylglycin, valerylglycin/isovalerylglycin/2-methylbutyrylglycin, 3-methylkrotonylglycin/tiglylglycin), u nichž se obvykle používá společný glycinový fragment s  $m/z$  74,0. Analýzou směsi acylglycinů byly pomocí programů Analyst a MultiQuant vyhodnoceny MRM přechody acylglycinů v negativním (Tab. 16) i pozitivním módu a jejich retenční chování. Z retenčních časů a MRM přechodů isomerů uvedených v Tab. 16 vyplývá, že vyvinutá metoda neumožňuje rozlišení isomerů butyrylglycinu od isobutyrylglycinu, stejně tak valerylglycinu, isovalerylglycinu a 2-methylbutyrylglycinu a 3-methylkrotonylglycinu a tiglylglycinu v negativním módu. Obr. 11 znázorňuje eluční chování nejen zmíněných isomerů. Z Tab. 16 a Obr. 11 tedy plyne, že isomery

(butyrylglycin/isobutyrylglycin, valerylglycin/isovalerylglycin/2-methylbutyrylglycin, 3-methylkrotonylglycin/tiglylglycin) koelují, ale že tiglylglycin má navíc svůj specifický přechod lišící se od ostatních svým produktovým iontem (156,0/112,0).

Tab. 16: -MRM přechody a retenční chování acylglycinů (Q1 – prekurzorový ion, Q3 – produktový ion, RT – retenční čas).

<i>Acylglyciny</i>	<i>Q1 (Da)</i>	<i>Q3 (Da)</i>	<i>RT (min)</i>
Acetylglycin	116,0	74,0	4,7
Propionylglycin	130,0	74,0	4,2
Butyrylglycin		74,0	3,9
Isobutyrylglycin	144,0	74,0	3,9
Valerylglycin		74,0	3,7
Isovalerylglycin	158,0	74,0	3,7
2-Methylbutyrylglycin		74,0	
Hexanoylglycin	172,0	74,0	3,5
3-Methylkrotonylglycin		74,0	
Tiglylglycin	156,0	74,0	3,8
Tiglylglycin	156,0	112,0	3,8
Fenylpropionylglycin	206,0	74,0	3,5
Suberylglycin	230,0	74,0	7,7
Glutarylglycin	188,0	74,0	7,7



Obr. 11: Eluční chování acylglycinů (negativní mód).

1 – acetylglycin, 2 – propionylglycin, 3 – butyrylglycin, isobutyrylglycin, 4 – valerylglycin, isovalerylglycin, 2-methylbutyrylglycin, 5 – hexanoylglycin, 6 – methylkrotonylglycin, tiglylglycin, 7 – tiglylglycin, 8 – fenylpropionylglycin, 9 – suberylglycin, 10 – glutarylglycin.

Dále byla porovnána a vyhodnocena intenzita odezev jednotlivých +/-MRM přechodů acylglycinů, načež byl do finální metody vybrán pouze nejcitlivější MRM přechod pro každého z nich. Vybrané MRM přechody všech analytů byly uloženy pod finální

metodou (Tab. 17). Vzhledem ke své povaze měla většina analytů vyšší citlivost v negativním módu (Obr. 12), až na výjimky propionylglycinu, isomerů valerylglycinu a glutarylglycinu, jež dosáhly vyšší citlivosti v módu pozitivním (Obr. 13).

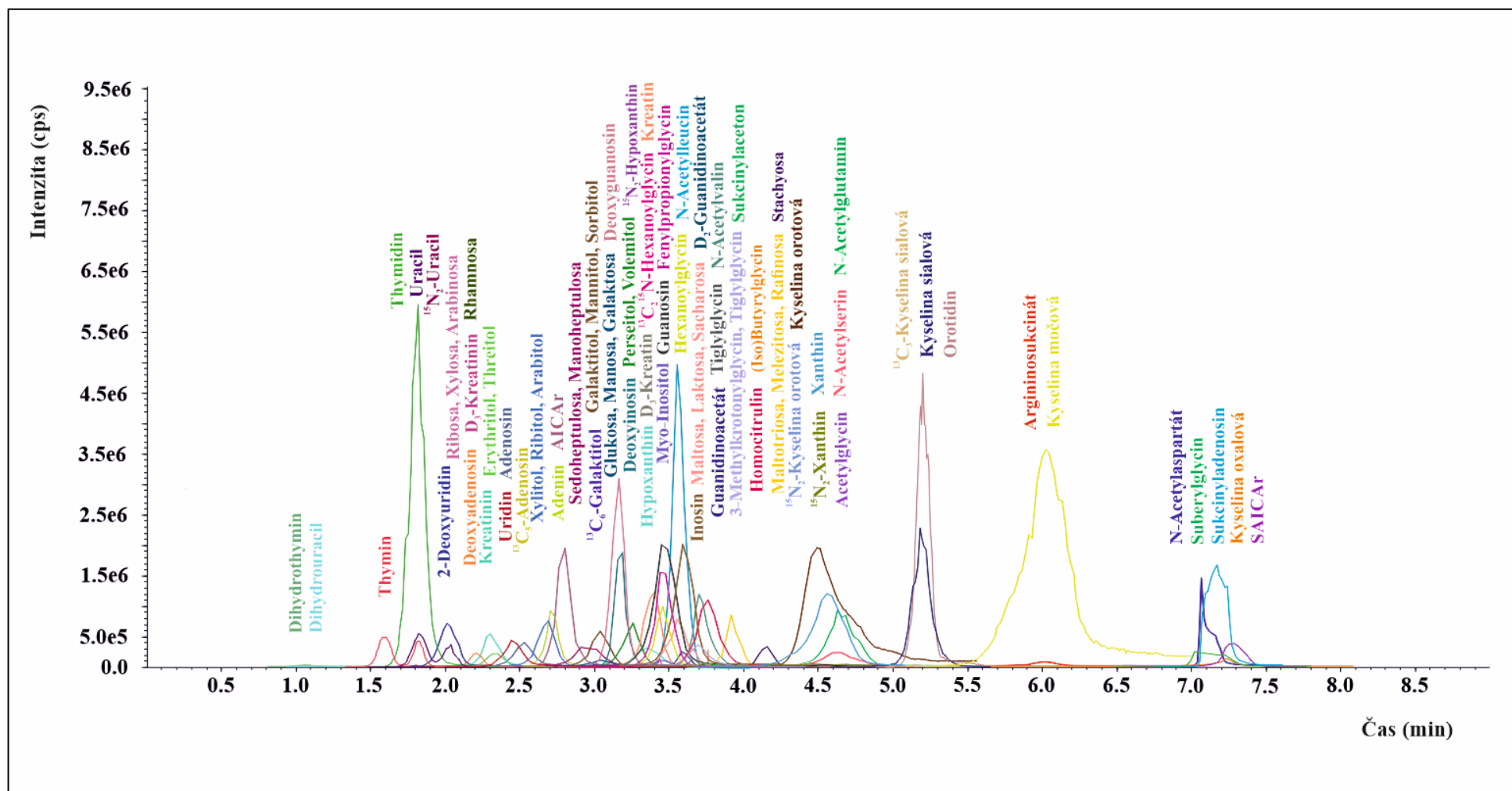
Vzhledem k tomu, že vyvinutá metoda neumožnila rozlišení jednotlivých isomerů v negativním ani pozitivním módu, do validačního experimentu byl vybrán pouze jeden zástupce za danou skupinu isomerů (valerylglycin, butyrylglycin).

Tab. 17: Souhrn +/-MRM přechodů diagnostických biomarkerů ve finální metodě (Q1 – prekurzorový ion, Q3 – produktový ion, RT – retenční čas, DP – deklasterační potenciál, EP – vstupní potenciál, CE – kolizní energie, CXP – výstupní potenciál).

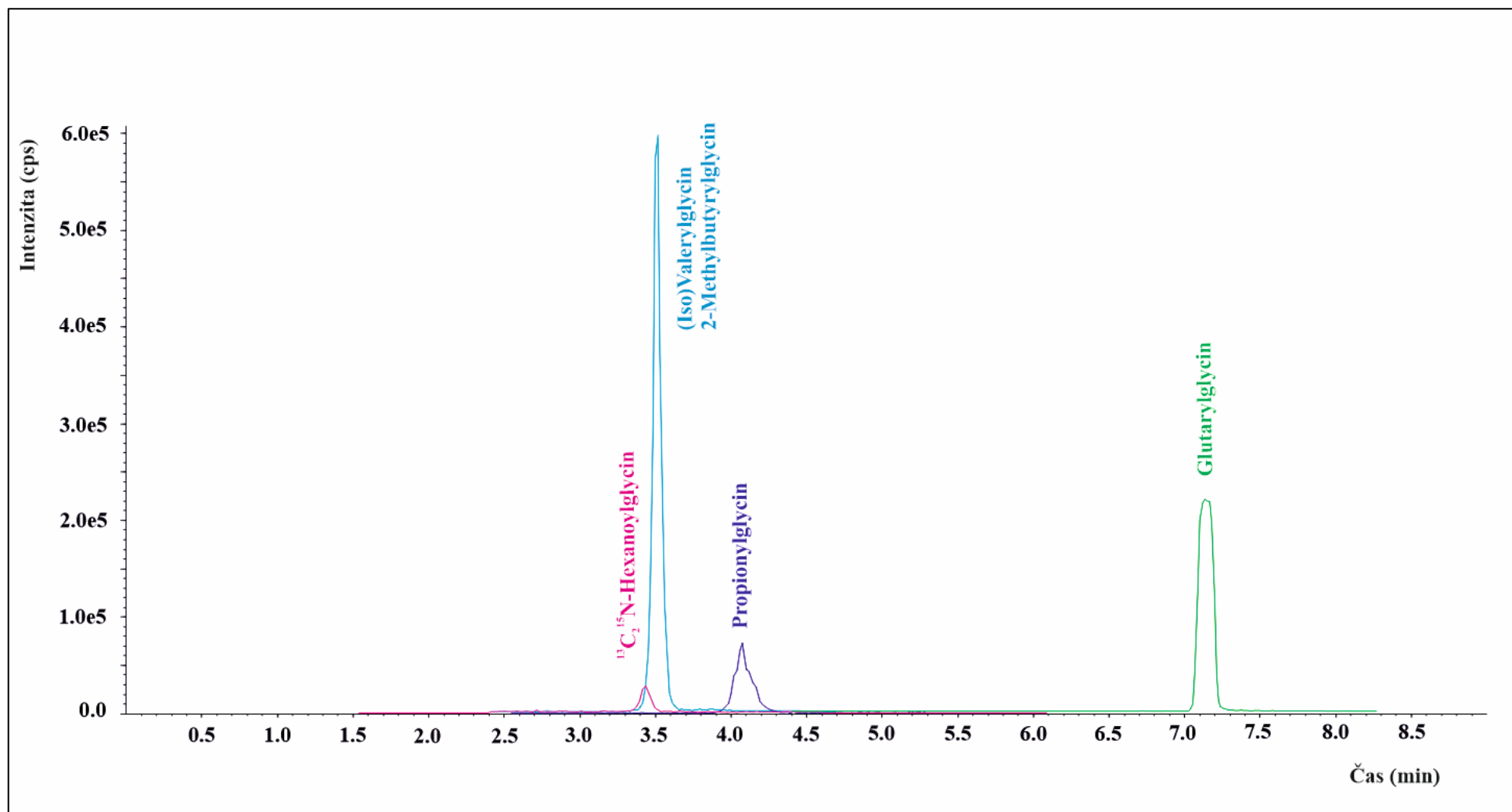
<i>Diagnostický biomarker</i>	<i>Q1 (Da)</i>	<i>Q3 (Da)</i>	<i>RT (min)</i>	<i>DP (V)</i>	<i>EP (V)</i>	<i>CE (V)</i>	<i>CXP (V)</i>
(Iso)Butyrylglycin	144,0	74,0	3,9	-40	-10	-14	-10
(Iso)Valerylglycin, 2-Methylbutyrylglycin	160,0	75,8	3,7	10	10	13	10
2,8-Dihydroxyadenin	166,0	123,0	5,0	-55	-10	-16	-10
2-Deoxyuridin	227,0	183,8	2,1	-60	-10	-20	-5
3-Methylkrotonylglycin, Tiglylglycin	156,0	74,0	3,8	-40	-10	-14	-10
Adenin	133,9	106,8	2,9	-60	-10	-24	-5
Adenosin	265,9	133,7	2,7	-40	-10	-10	-5
AICAr	257,1	124,9	2,9	-60	-10	-16	-10
Argininosukcinát	289,0	131,9	5,5	-50	-10	-30	-10
Deoxyadenosin	250,0	133,8	2,3	-55	-10	-11	-5
Deoxyguanosin	265,9	149,9	3,2	-70	-10	-24	-8
Deoxyinosin	251,0	134,8	3,3	-60	-10	-24	-10
Dihydrothymidin	127,0	42,0	2,0	-35	-10	-22	-5
Dihydrouracil	112,9	42,1	2,0	-40	-10	-22	-5
Erythritol, Threitol (C4ol)	121,0	88,9	2,4	-35	-10	-14	-11
Fenylpropionylglycin	206,0	74,0	4,2	-45	-10	-18	-10
Galaktitol, Mannitol, Sorbitol (C6ol)	180,9	88,9	2,9	-70	-10	-20	-5
Glukosa, Manosa, Galaktosa (C6)	178,9	88,9	3,0	-35	-10	-12	-11
Glutarylglýcin	190,2	76,0	7,7	11	10	11	10
Guanidinoacetát	115,9	73,9	3,6	-40	-10	-12	-5
Guanosin	281,9	149,9	3,5	-75	-10	-24	-9
Hexanoylglycin	172,0	74,0	3,5	-40	-10	-18	-10
Homocitrulin	188,0	145,1	3,8	-50	-10	-18	-5
Hypoxanthin	134,8	91,8	3,5	-60	-10	-22	-5
Inosin	266,8	134,8	3,6	-55	-10	-24	-7
IS-HG	175,0	77,0	3,5	-40	-10	-18	-10
IS-SA	311,1	89,9	5,0	-50	-10	-22	-5
IS-Ado	271,0	133,8	2,7	-45	-10	-12	-5
IS-Gal	187,0	91,9	3,1	-60	-10	-22	-5
IS-OA	156,9	112,8	5,3	-25	-10	-12	-5
IS-U	113,0	42,9	2,1	-55	-10	-24	-5
IS-X	152,9	108,8	4,5	-25	-10	-22	-5
IS-GAA	118,0	75,9	3,6	-50	-10	-12	-5
IS-Hx	137,0	92,9	3,5	-50	-10	-22	-5
IS-Kreatin	133,0	90,9	3,5	-40	-10	-12	-5
IS-Kr	115,0	67,9	2,4	-50	-10	-22	-5
Kreatin	129,9	87,7	3,5	-40	-10	-12	-5
Kreatinin	112,0	67,8	2,4	-50	-10	-22	-5
Kyselina močová	167,0	124,0	6,0	-45	-10	-22	-15
Kyselina orotová	154,8	110,9	5,3	-35	-10	-14	-9
Kyselina oxalová	88,9	60,9	7,7	-10	-10	-12	-9
Kyselina sialová	307,9	86,8	5,0	-55	-10	-24	-5
Maltosa, Laktosa, Sacharosa (C12)	341,0	160,9	3,6	-65	-10	-12	-5
Maltotriosa, Melezitosa, Rafinosa (C18)	503,1	341,0	3,9	-110	-10	-12	-21

Myo-Inositol (C6-ol)	178,9	140,9	3,5	-95	-10	-18	-9
N-Acetylaspartát	174,0	88,0	7,8	-5	-10	-22	-11
N-Acetylglutamin	187,0	145,0	4,9	-45	-10	-18	-7
N-Acetylglycin	116,0	74,0	4,7	-35	-10	-14	-10
N-Acetylleucin	172,0	130,1	3,7	-20	-10	-18	-9
N-Acetylserin	146,0	84,0	4,8	-20	-10	-18	-7
N-Acetylvalin	158,0	116,0	3,9	-15	-10	-18	-13
Orotidin	287,0	111,0	5,0	-60	-10	-25	-10
Perseitol, Volemitol (C7ol)	211,0	100,7	3,3	-80	-10	-22	-11
Propionylglycin	131,9	75,7	4,2	10	10	11	10
Rhamnosa (C6)	163,0	102,9	2,3	-45	-10	-10	-5
Ribosa, Xylosa, Arabinosa (C5)	149,0	88,8	2,2	-35	-10	-10	-11
SAICAr	372,9	124,9	6,5	-75	-10	-36	-10
Sedoheptulosa, Manoheptulosa (C7)	209,0	119,0	3,0	-35	-10	-10	-9
Stachyosa (C24)	665,1	382,9	4,1	-100	-10	-44	-23
Suberylglycin	230,0	74,0	7,7	-50	-10	-25	-10
Sukcinylaceton	156,9	98,8	3,8	-35	-10	-12	-5
Sukcinyladenodin	382,1	206,0	6,5	-60	-10	-20	-10
Thymidin	241,0	124,9	2,1	-60	-10	-12	-5
Thymin	125,0	42,1	2,1	-45	-10	-24	-5
Tiglylglycin	156,0	112,0	3,8	-45	-10	-14	-10
Uracil	110,9	42,1	2,1	-45	-10	-24	-5
Uridin	243,2	200,0	2,6	-60	-10	-20	-10
Xanthin	150,8	107,8	4,5	-60	-10	-22	-7
Xylitol, Ribitol, Arabitol (C5ol)	151,0	88,8	2,7	-55	-10	-16	-11





Obr. 12: Chromatogram standardů zahrnutých ve finální LC/MS metodě (negativní mód).



Obr. 13: Chromatogram standardů zahrnutých ve finální LC/MS metodě (pozitivní mód).

#### 4.2.1 Linearita, LOD a LOQ

Součástí validace metody bylo stanovení LOD a LOQ analytů z kalibračních křivek a jejich porovnání s fyziologickými koncentračními mezemi v moči.

Kalibrační řady směsných vzorků standardů byly po LC/MS analýze vyhodnocovány v MultiQuant. Po automatické integraci píků jednotlivých analytů byla provedena manuální kontrola integrovaných píků. Následně byla vyhodnocena integrace píků na přítomné interní standardy (Tab. 18–23). Poté byla vyhodnocena linearita kalibračních řad (korelační koeficient) za použití vážení  $1/y$ , LOD (trojnásobek šumu základní linie) a LOQ (desetinásobek šumu základní linie) pro jednotlivé analyty v rámci směsí (Tab. 18–23). V tabulkách jsou v rámci přehledu uvedeny fyziologické koncentrační meze (>1 rok) jednotlivých analytů v moči (převzato z databáze HMDB a z předpisu užívaných mezí v laboratoři metabolomiky, LF UPOL).

Většina metabolitů dosáhla korelačního koeficientu vyššího než 0,99, to znamená, že se docílilo lineární odezvy. Pouze 5 metabolitů mělo hodnotu nižší, jež je v tabulkách vyznačena červeně. V případě 2,8-dihydroxyadeninu nebylo možné stanovit žádný z těchto validačních parametrů, jelikož se nepodařilo detekovat jeho odezvy. Důvodem je jeho špatná rozpustnost, která ovlivnila přípravu jeho standardu.

Tab. 18: Stanovení korelačních koeficientů standardů směsi PP; LOD a LOQ. Dále je uveden IS, kalibrační rozsah a přehled fyziologických koncentračních mezí (>1 rok) příslušných analytů v moči.

<i>Analyt</i>	<i>Kalibrační rozsah (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	<i>IS</i>	<i>LOD (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	<i>LOQ (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	<i>Fyziologická mez (mmol/mol kr.)</i>	<i>Korelační koeficient</i>
2,8-Dihydroxyadenin	0,2–100	-	n.s.	n.s.	< 2	n.s.
2-Deoxyuridin	0,2–100	IS-U	0,07	0,23	< 2	0,9989
Adenin	0,2–100	IS-Ado	0,01	0,02	< 2	0,9982
Adenosin	0,2–100	IS-Ado	0,19	0,63	< 2	0,9990
AICAr	0,2–100	IS-Ado	0,01	0,03	< 5	0,9945
Deoxyadenosin	0,2–100	IS-Ado	0,13	0,44	< 2	0,9997
Deoxyguanosin	0,2–100	IS-Ado	0,10	0,34	< 2	0,9995
Deoxyinosin	0,2–100	IS-Ado	0,05	0,17	< 2	0,9991
Dihydrothymin	0,2–100	IS-Gal	3,40	11,33	< 10	0,9982
Dihydrouracil	0,2–100	IS-Ado	12,50	41,63	< 15	0,9560
Guanosin	0,2–100	IS-Krea	0,13	0,43	< 2	0,9993
Hypoxanthin	0,2–100	IS-Krea	0,18	0,59	< 30	0,9980
Inosin	0,2–100	IS-Krea	0,03	0,11	< 2	0,9967
Kyselina orotová	0,2–100	IS-SA	0,22	0,75	< 5	0,9932
Orotidin	0,2–100	IS-X	0,04	0,13	< 5	0,9971
SAICAr	0,2–100	IS-Ado	0,02	0,06	*	0,9992
Sukcinyladenosin	0,2–100	IS-X	0,08	0,25	< 21	0,9989
Thymidin	0,2–100	IS-U	0,03	0,09	< 2	0,9984
Thymin	0,2–100	IS-U	0,08	0,25	< 4	0,9998

Uracil	0,2–100	IS-U	0,14	0,47	< 20	0,9997
Uridin	0,2–100	IS-Ado	0,13	0,45	< 9	0,9973
Xanthin	0,2–100	IS-X	0,10	0,32	< 30	0,9981

n.s.: nebylo stanoveno

\* nedohledáno

Tab. 19: Stanovení korelačních koeficientů standardů směsi AMKHAS; LOD a LOQ. Dále je uveden IS, kalibrační rozsah a přehled fyziologických koncentračních mezí (>1 rok) příslušných analytů v moči.

<i>Analyt</i>	<i>Kalibrační rozsah (μM)</i>	<i>IS</i>	<i>LOD (μM)</i>	<i>LOQ (μM)</i>	<i>Fyziologická mez (mmol/mol kr.)</i>	<i>Korelační koeficient</i>
Argininosukcinát	0,2–100	IS-SA	0,59	1,95	< 5,4	0,9963
Homocitrulin	0,2–100	IS-GAA	0,10	0,32	< 8,0	0,9982
N-Acetylaspartát	0,2–100	IS-X	0,81	2,69	< 44,3	0,9976
N-Acetylglutamin	0,2–100	IS-SA	0,29	0,95	11,1–26,1	0,9961
N-Acetylleucin	0,2–100	IS-Krea	0,07	0,24	*	0,9990
N-Acetylserin	0,2–100	IS-X	1,17	3,90	*	0,9984
N-Acetylvalin	0,2–100	IS-GAA	0,11	0,38	*	0,9973
Sukcinylaceton	0,2–100	IS-Krea	2,62	8,73	< 5,0	0,9985

\* nedohledáno

Tab. 20: Stanovení korelačních koeficientů standardů směsi ACGLY; LOD a LOQ. Dále je uveden IS, kalibrační rozsah a přehled fyziologických koncentračních mezí (>1 rok) příslušných analytů v moči.

<i>Analyt</i>	<i>Kalibrační rozsah (μM)</i>	<i>IS</i>	<i>LOD (μM)</i>	<i>LOQ (μM)</i>	<i>Fyziologická mez (mmol/mol kr.)</i>	<i>Korelační koeficient</i>
Acetylglycin	0,1–50	IS-HG	1,44	4,80	0,420–3,470	0,9978
Propionylglycin	0,1–50	IS-HG	0,06	0,20	< 2,100	0,9988
(Iso)Butyrylglycin	0,1–50	IS-HG	0,14	0,48	< 1,650	0,9991
(Iso)Valerylglycin, 2-Methylbutyrylglycin	0,1–50	IS-HG	0,08	0,27	< 0,110	0,9994
Hexanoylglycin	0,1–50	IS-HG	0,03	0,11	< 2,880	0,9995
3-Methylkrotonylglycin, Tiglylglycin	0,1–50	IS-HG	0,43	1,44	< 10,000	0,9994
Tiglylglycin	0,1–50	IS-HG	3,58	11,91	< 7,000	0,9954
Fenylpropionylglycin	0,1–50	IS-HG	0,01	0,05	< 2,000	0,9995
Suberylglycin	0,1–50	IS-HG	0,03	0,10	0,050–0,530	0,9994
Glutarylglýcin	0,1–50	IS-HG	0,09	0,29	0,003–0,052	0,9993

Tab. 21: Stanovení korelačních koeficientů standardů směsi KREA; LOD a LOQ. Dále je uveden IS, kalibrační rozsah a přehled fyziologických koncentračních mezí (>1 rok) příslušných analytů v moči.

<i>Analyt</i>	<i>Kalibrační rozsah (μM)</i>	<i>IS</i>	<i>LOD (μM)</i>	<i>LOQ (μM)</i>	<i>Fyziologická mez (mmol/mol kr.)</i>	<i>Korelační koeficient</i>
Kreatin	4–2000	IS-Krea	1,90	6,32	5–1000	0,9983
Kreatinin	4–2000	IS-Kr	4,68	15,58		0,9989
Kyselina močová	4–2000	IS-SA	0,04	0,13	275–750	0,9938

Tab. 22: Stanovení korelačních koeficientů standardů směsi OXA; LOD a LOQ. Dále je uveden IS, kalibrační rozsah a přehled fyziologických koncentračních mezí (>1 rok) příslušných analytů v moči.

<i>Analyt</i>	<i>Kalibrační rozsah (μM)</i>	<i>IS</i>	<i>LOD (μM)</i>	<i>LOQ (μM)</i>	<i>Fyziologická mez (mmol/mol kr.)</i>	<i>Korelační koeficient</i>
Kyselina oxalová	1–500	IS-SA	139,2 9	463,82	< 53	<b>0,9751</b>
Guanidinoacetát	1–500	IS-Krea	0,13	0,44	< 135	0,9993
Kyselina sialová	1–500	IS-SA	0,16	0,54	< 50	0,9971

Tab. 23: Stanovení korelačních koeficientů standardů směsi CA; LOD a LOQ. Dále je uveden IS, kalibrační rozsah a přehled fyziologických koncentračních mezí (>1 rok) příslušných analytů v moči.

<i>Analyt</i>	<i>Kalibrační rozsah (μM)</i>	<i>IS</i>	<i>LOD (μM)</i>	<i>LOQ (μM)</i>	<i>Fyziologická mez (mmol/mol kr.)</i>	<i>Korelační koeficient</i>
Glukosa	1–500	IS-Gal	1,46	4,85	15,6–4,6	0,9986
Rhamnosa	1–500	IS-Gal	4,01	13,36	*	<b>0,9722</b>
Sedoheptulosa	1–500	IS-Kr	0,31	1,04	*	<b>0,9858</b>
Ribosa	1–500	IS-Gal	7,80	25,97	20,9–58,7	0,9905
Maltotriosa	1–500	IS-Krea	0,90	2,98	*	0,9912
Maltosa	1–500	IS-Gal	1,16	3,88	9,9–23,0	0,9938
Stachyosa	1–500	IS-OA	0,29	0,97	22,9–45,5°	<b>0,9845</b>
Galaktitol	1–500	IS-Gal	1,36	4,52	< 200,0	0,9973
Xylitol	1–500	IS-Gal	2,18	7,27	4,9–7,0	0,9969
Erythritol	1–500	IS-Gal	0,46	1,53	65,0–121,0	0,9968
Perseitol	1–500	IS-Krea	0,14	0,46	*	0,9938
Myoinositol	1–500	IS-Krea	0,03	0,11	4,1–66,0	0,9982

\* nedohledáno

° referenční mez tetrasacharidu glukosy (isomeru stachyosy), převzato z An *et al.*, 2005

#### 4.2.2 Opakovatelnost, mezilehlá přesnost a výtěžnost

V druhém validačním experimentu byla stanovena opakovatelnost, mezilehlá přesnost a výtěžnost (recovery) LC/MS metody na vzorcích LQC, MQC a HQC. Hodnoty jednotlivých validačních parametrů jsou pro všechny analyty (různých koncentračních

přídavků v LQC, MQC a HQC) uvedeny v Přílohách 1–3. Názorná ukázka z příloh je zobrazena v Tab. 24–26.

Opakovatelnost představuje přesnost v sériích, tedy přesnost analytických výsledků získaných ze tří dnů. Mezilehlá přesnost udává přesnost mezi jednotlivými sériemi a celková výtěžnost (recovery) reflektuje extrakční účinnost vyvinuté metody.

Prostřednictvím Microsoft Excel byly získané koncentrace analytů statisticky vyhodnoceny – byly vypočítány průměrné koncentrace příslušných sérií a v návaznosti na to směrodatné odchylky.

Ze získaných dat (viz Přílohy 1–3) je patrné, že ne všechny analyty splňují limit max. 15% odchylky (dle validační příručky od EMA). Například maltotriosa (a její isomery), N-Acetylaspartát, stachyosa, suberylglycin či sukcinyladenosin nedosáhly očekávané výtěžnosti metody (velmi nízké hodnoty až 43 %). Stejně tak u dalších analytů lze sledovat procentuální odchylku opakovatelnosti, mezilehlé přesnosti nebo výtěžnosti i větší než 30 %. V těchto případech lze metodu považovat za semikvantitativní, což je však pro diagnostické účely dostačující.

Tab. 24: Stanovení opakovatelnosti, mezilehlé přesnosti a výtěžnosti pro vybrané analyty (LQC).

<i>Analyt (LQC)</i>	<i>Opakovatelnost (%)</i>	<i>Mezilehlá přesnost (%)</i>	<i>Výtěžnost (%)</i>
(Iso)Butyrylglycin	13,2	11,9	124,2
(Iso)Valerylglycin, 2-Methylbutyrylglycin	12,1	10,7	92,9
2,8-Dihydroxyadenin	n.s.	n.s.	n.s.
2-Deoxyuridin	3,6	3,7	64,0
3-Methylkrotonylglycin, Tiglylglycin	9,5	5,7	111,8

n.s.: nebylo stanoveno

Tab. 25: Stanovení opakovatelnosti, mezilehlé přesnosti a výtěžnosti pro vybrané analyty (MQC).

<i>Analyt (MQC)</i>	<i>Opakovatelnost (%)</i>	<i>Mezilehlá přesnost (%)</i>	<i>Výtěžnost (%)</i>
(Iso)Butyrylglycin	9,4	7,6	111,4
(Iso)Valerylglycin, 2-Methylbutyrylglycin	10,1	7,5	76,5
2,8-Dihydroxyadenin	n.s.	n.s.	n.s.
2-Deoxyuridin	4,9	3,4	77,1
3-Methylkrotonylglycin, Tiglylglycin	5,0	4,6	89,7

n.s.: nebylo stanoveno

Tab. 26: Stanovení opakovatelnosti, mezilehlé přesnosti a výtěžnosti pro vybrané analyty (HQC).

<i>Analyt (HQC)</i>	<i>Opakovatelnost (%)</i>	<i>Mezilehlá přesnost (%)</i>	<i>Výtěžnost (%)</i>
(Iso)Butyrylglycin	12,6	10,8	115,7
(Iso)Valerylglycin, 2-Methylbutyrylglycin	12,9	10,7	91,5
2,8-Dihydroxyadenin	n.s.	n.s.	n.s.
2-Deoxyuridin	6,5	4,9	84,5
3-Methylkrotonylglycin, Tiglylglycin	7,0	5,9	90,0

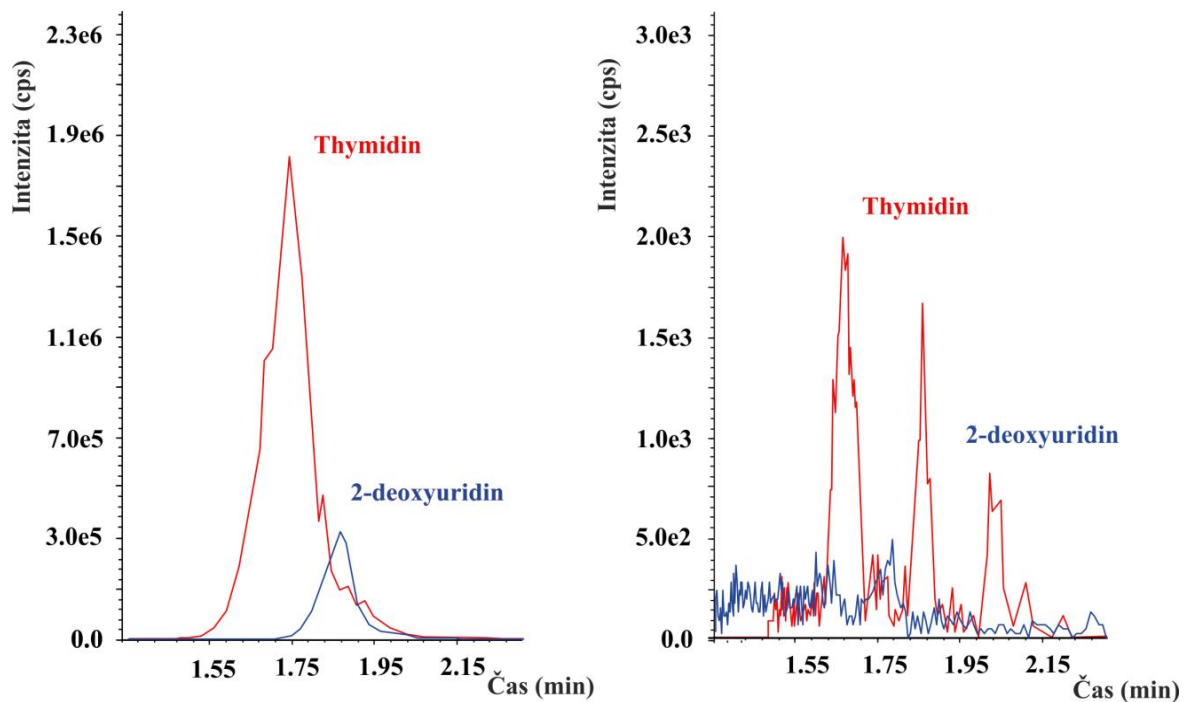
n.s.: nebylo stanoveno

### 4.2.3 Diagnostika pacientů s dědičnými metabolickými poruchami vyvinutou LC/MS metodou

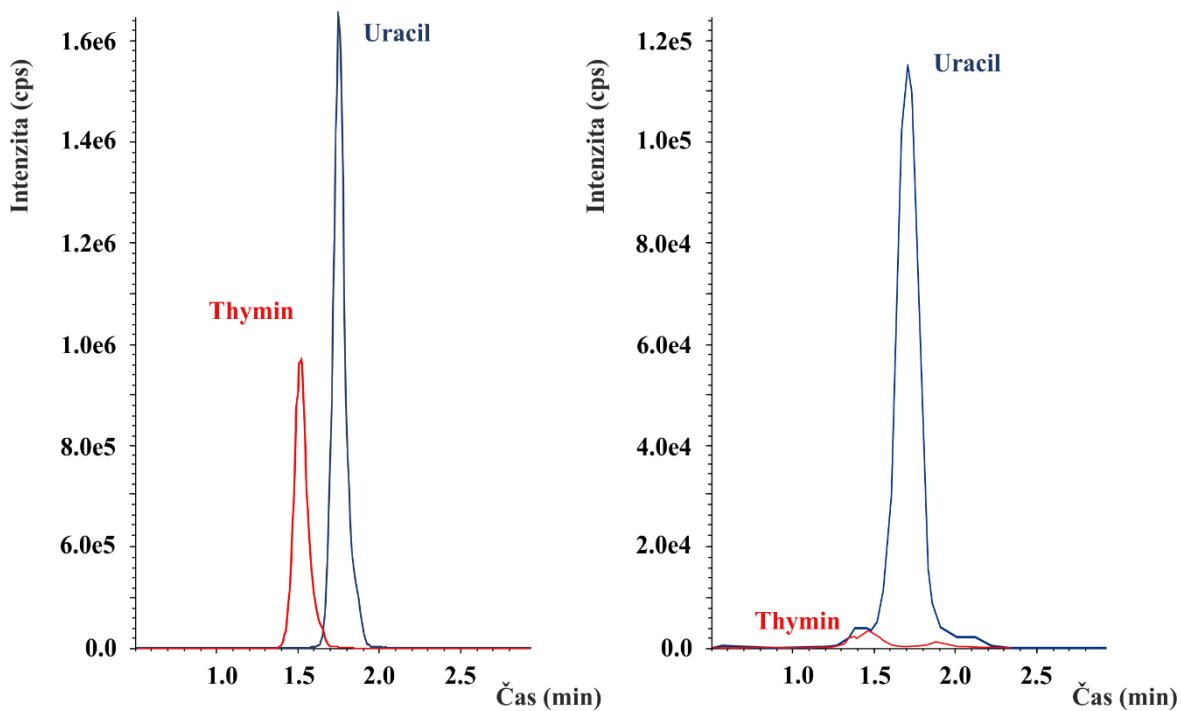
Pomocí vyvinuté LC/MS metody byly analyzovány 2 vzorky moči pacientů s DMP a 6 vzorků externí kontroly kvality (ERNDIM), u kterých byla prokázána DMP. Pomocí kalibrací byly diagnostické biomarkery vybraných DMP kvantifikovány a v návaznosti na to byla dle srovnání s fyziologickými koncentracemi (převzatými z databáze HMDB a z předpisu užívaných mezí v laboratoři metabolomiky, LF UPOL) provedena diagnostika pacientů (Tab. 27). Metabolické profily studovaných vzorků jsou zobrazeny na Obr. 14–21. Z naměřených koncentrací analytů jak ve zdravých kontrolách, tak ve vzorcích pacientů byla provedena statistická analýza prostřednictvím Z-skóre (Obr. 22).

Tab. 27: Koncentrace biomarkerů specifických pro DMP ve vzorcích pacientů nebo vzorcích externí kontroly kvality

<i>Onemocnění</i>	<i>Diagnostický biomarker</i>	<i>Koncentrace (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	<i>Fyziologické meze (<math>\mu\text{M}</math>)</i>	<i>Z-skóre</i>
MNGIE	Thymin	32,9	< 2,0	10,1
	2-Deoxyuridin	52,3	< 2,0	13,9
DPDD	Uracil	185,6	< 20,0	7,7
	Thymin	70,4	< 4,0	16,5
CTLN1	Kyselina orotová	61,3	< 5,0	4,6
ASA	Argininosukcinát	11190,0	< 5,4	13,7
	Kyselina orotová	21,0	< 5,0	3,6
ORNT1D	Kyselina orotová	97,9	< 5,0	5,0
	Homocitrulin	27,1	< 8,0	4,6
MCADD	Hexanoylglycin	24,8	< 2,9	8,5
	Fenylpropionylglycin	221,0	< 2,0	3,0
IVA	Isovalerylglycin	3436,0	< 0,1	8,3
GALT/K/E-D	Galaktitol	24600,0	< 200,0	7,3
	Galaktosa	46410,0	15,6–47,6	8,3

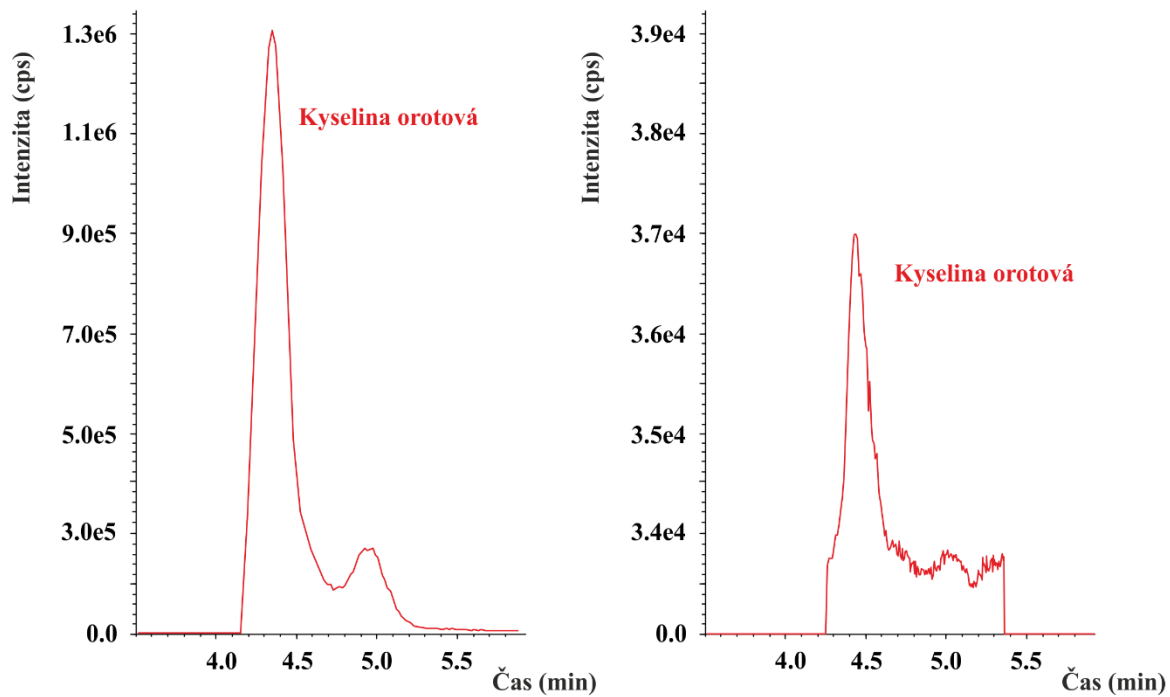


Obr. 14: Metabolický profil biomarkerů u pacienta s MNGIE a vzorku zdravého jedince.

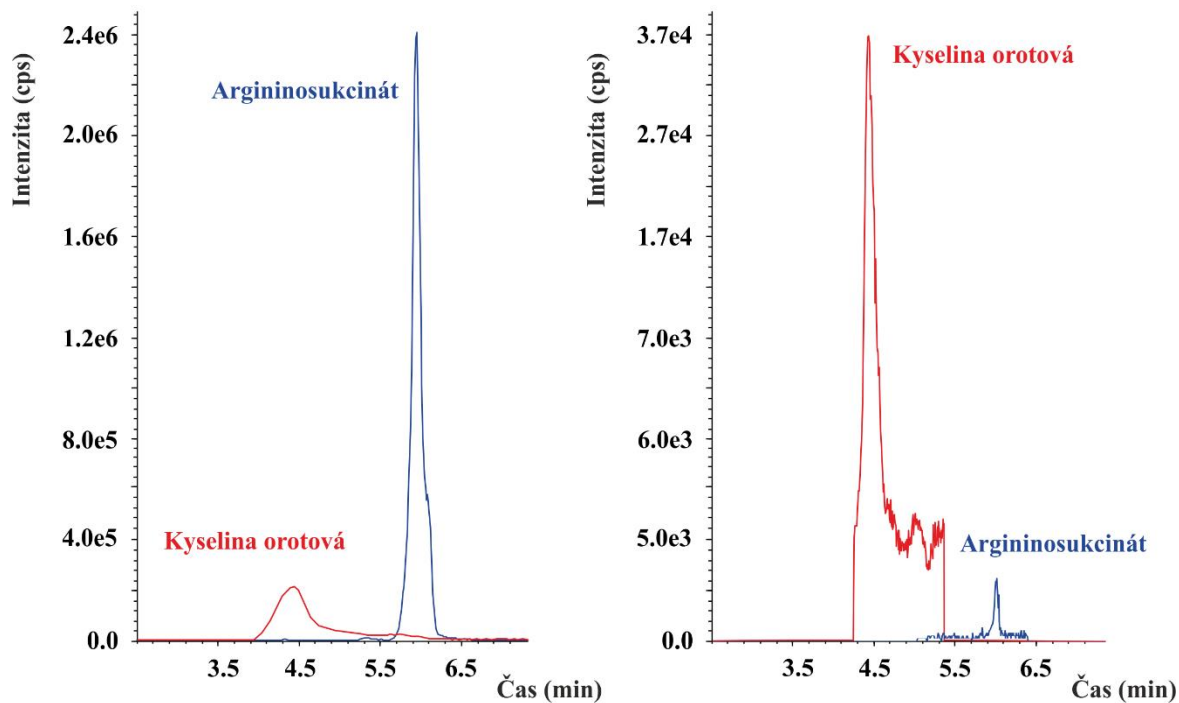


Obr. 15: Metabolický profil biomarkerů u pacienta s DPDD a vzorku zdravého jedince.

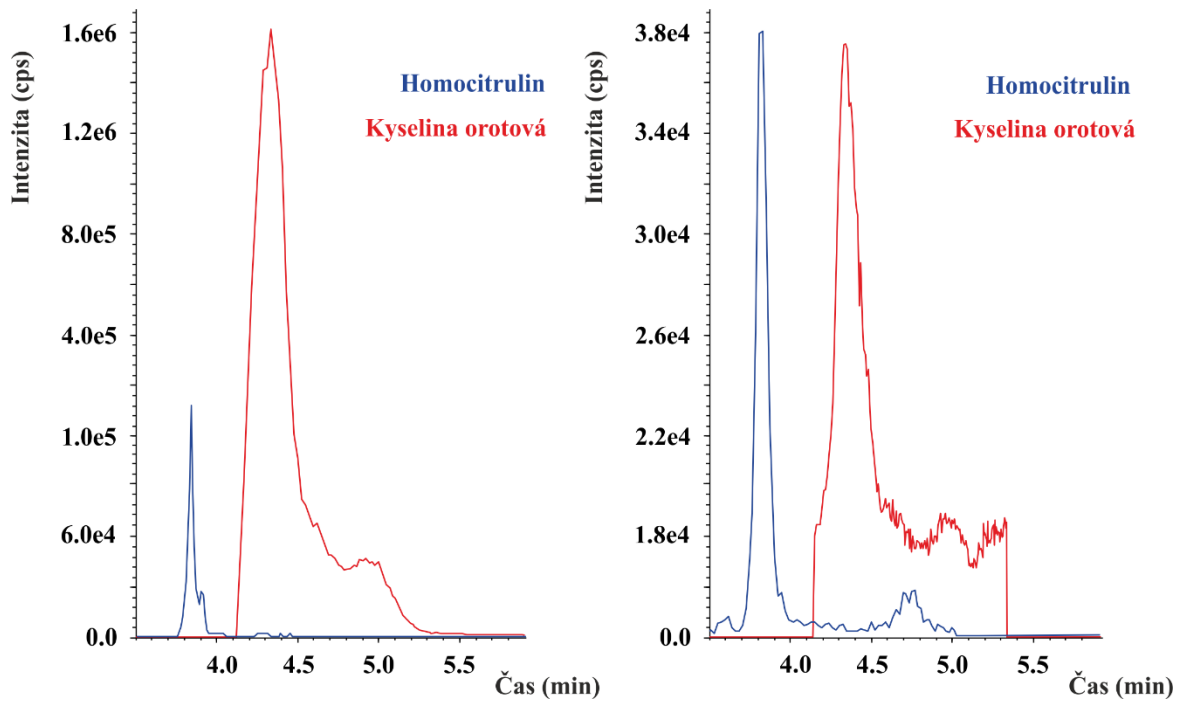




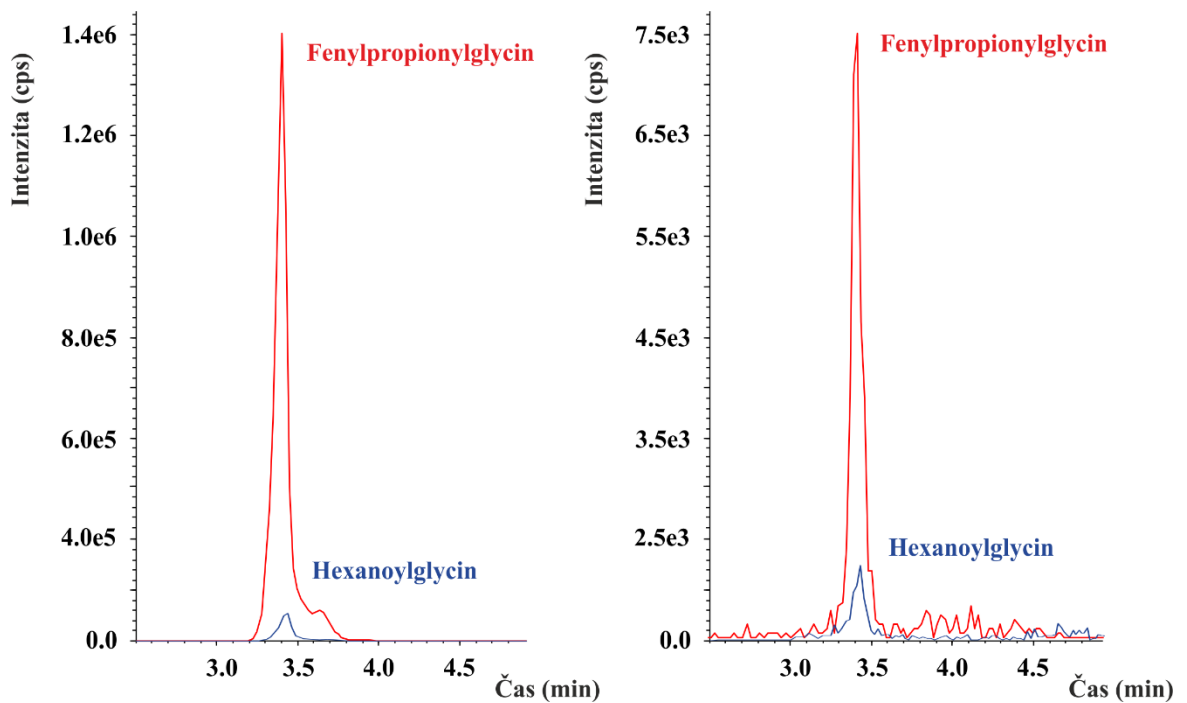
Obr. 16: Metabolický profil biomarkeru u pacienta s CTLN1 a vzorku zdravého jedince.



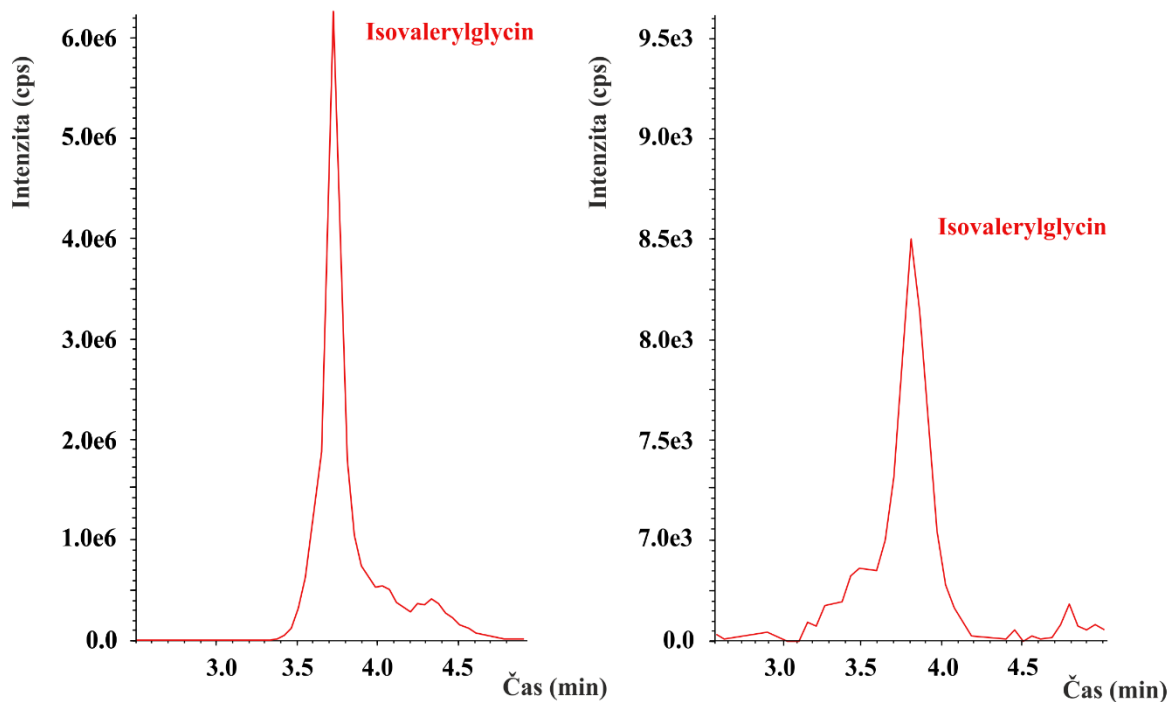
Obr. 17: Metabolický profil biomarkerů u pacienta s ASA a vzorku zdravého jedince.



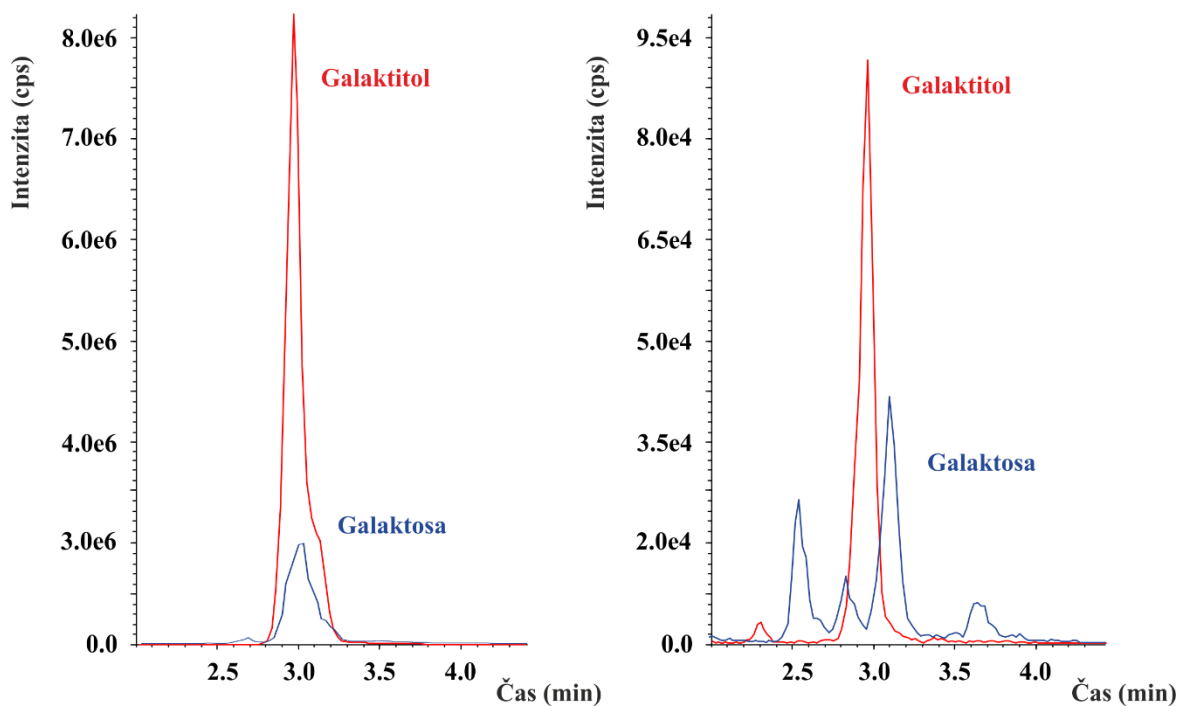
Obr. 18: Metabolický profil biomarkerů u pacienta s ORNT1D a vzorku zdravého jedince.



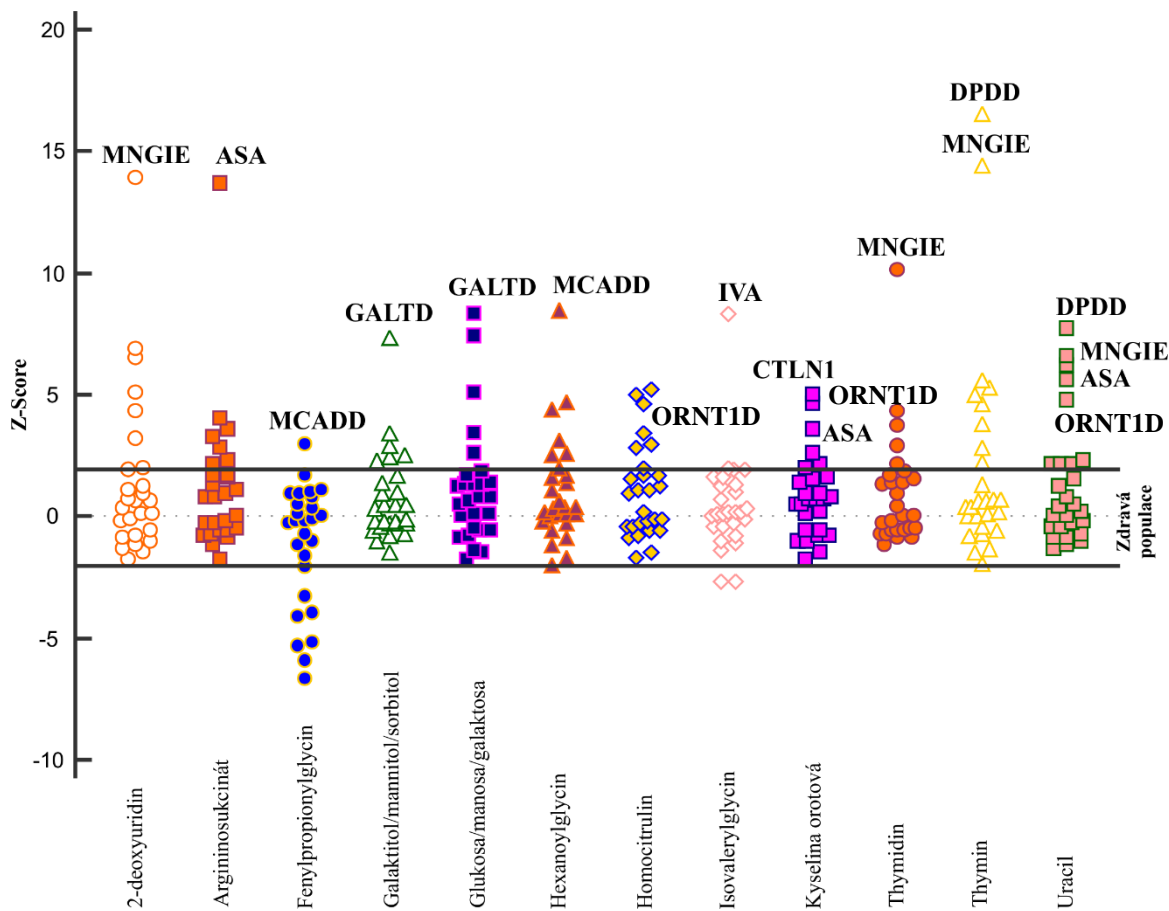
Obr. 19: Metabolický profil biomarkerů u pacienta s MCADD a vzorku zdravého jedince.



Obr. 20: Metabolický profil biomarkeru u pacienta s IVA a vzorku zdravého jedince.



Obr. 21: Metabolický profil biomarkerů u pacienta s GALT/K/E-D a vzorku zdravého jedince.



Obr. 22: Z-score znázorňující distribuci koncentrací analytů v moči zdravých jedinců a pacientů s DMP.

Výpočet Z-score:  $\frac{\text{koncentrace analytu} - \text{průměrná hodnota}}{\text{směrodatná odchylka}}$ .

V rozmezí od +/-2 jsou distribuovány fyziologické koncentrace analytů.

## 5 Diskuze

Diagnostika DMP je v současné době založena na analýze metabolitů charakteristických pro jednotlivá onemocnění. V rámci této práce byly řešeny biomarkery pro vybrané skupiny DMP lokalizovaných zejména v metabolismu purinů, pyrimidinů, kreatinu, močovinového cyklu,  $\beta$ -oxidace mastných kyselin a BCAA. Z chemického hlediska se jedná o látky velmi různorodé, zahrnující purinové a pyrimidinové báze a ribosidy, N-acetylované aminokyseliny, acylglyciny, cukry, alkoholy a další vybrané důležité diagnostické biomarkery. Vyskytují se v tělních tekutinách v širokém koncentračním rozmezí, a proto se k jejich analýze využívá pokročilých analytických technik (kapitola 2.3). V současnosti však neexistuje „univerzální“ metoda, která by umožnila multikomponentní analýzu pro celou Širokou skupinu DMP.

V této práci byla vyvinuta LC/MS metoda, zahrnující 76 metabolitů, pro diagnostiku více než 50 onemocnění. Metoda se vyznačuje snadnou přípravou vzorku a rychlou analýzou. Rychlost hraje důležitou roli pro diagnostiku DMP, a to především onemocnění z intermediárního metabolismu, pro něž je důležité zahájit včasnou léčbu.

Pro rutinní diagnostiku organických acidurií, která je na základě přítomnosti acylglycinů také zahrnuta v nově vyvinuté metodě, se primárně používá GC/MS technika, která je však časově náročná kvůli nezbytné derivatizaci netěkavých látek – organických kyselin (Ivanovová, 2018). Vysoká separační účinnost a selektivita stacionárních fází umožňuje rozlišit látky o stejné molekulové hmotnosti, jež se liší prostorovým uspořádáním atomů (isomery) (Dettmer *et al.*, 2007; Nguyen *et al.*, 2013). GC/MS je navíc poměrně málo citlivá pro analýzu acylglycinů (nízká extrakční a separační účinnost, tvorba více derivatizačních produktů) a kvantifikace představuje velkou výzvu. Proto byla pro rychlou diagnostiku vybraných DMP zvolena právě metoda LC/MS.

Touto metodou se podařilo analyzovat 76 metabolitů v moči. S cílem zajistit co nejlepší kvantifikaci analytů bylo použito celkem 11 izotopicky značených IS, podobně jako v roce 2019 použili při validaci LC/MS metody pro diagnostiku purinů a pyrimidinů Monostori *et al.* Použití značených IS poskytlo spolehlivou kvantifikaci analytů. Při výběru značených IS pro jednotlivé analyty byla stěžejní zejména podobnost retenčního času, případně struktury látek. Na základě získaných hodnot opakovatelnosti, mezilehlé přesnosti a výtěžnosti lze metodu v rámci některých analytů považovat za semikvantitativní, jelikož jsou odchylky u některých z nich větší než 30 %.

Validačními experimenty bylo zjištěno, že metoda v 5 případech neposkytuje zcela lineární odezvu. Jedná se o dihydrouracil, kyselinu oxalovou, rhamnosu, sedoheptulosu (a její isomer) a stachyosu. Stachyosa, přirozeně se v organismu nevyskytující, byla do metody přidána jako isomer pro tetrasacharid glukosy, jenž se využívá jako biomarker pro sledování terapeutické odpovědi na enzymovou substituční terapii při Pompeho chorobě (An *et al.*, 2005). Případnou odezvu -MRM přechodu stachyosy lze tedy přiřadit právě tetrasacharidu glukosy.

U některých acylglycinů, cukrů a alkoholů metoda neposkytuje dostatečnou separaci. Pro tyto biomarkery tato metoda slouží ke skríninku.

Názorná ukázka koeluce acylglycinových isomerů je zobrazena na Obr. 11. Ačkoliv nelze koelující isomery separovat, lze je semikvantifikovat, vzhledem k jejich strukturní podobnosti. Diferenciální diagnostika pro zjištění konkrétního onemocnění pak spočívá v následném testování za využití dalších biomarkerů. Nicméně, tiglylglycin kvantifikovat lze, jelikož má jako jediný z isomerů specifický MRM přechod (Tab. 16).

Vyvinutá LC/MS metoda byla aplikována na vzorky moči zdravých jedinců a pacientů s DMP. Vzorky zdravých jedinců sloužily k ověření referenčních mezí zdravé populace. Dále byly v rámci práce analyzovány vzorky pacientů s 8 různými DMP. Byly získány metabolické profily biomarkerů specifických pro daná onemocnění (Obr. 14–21). Získaná data byla statisticky zpracována, výsledkem čehož bylo Z-skóre (Obr. 22) znázorňující distribuci koncentrací studovaných analytů v moči zdravých jedinců a pacientů. Za pozitivní je vzorek považován tehdy, pokud je hodnota Z-skóre vyšší než 2. U vzorků pacientů lze pozorovat jak signifikantní odchylky u diagnostických biomarkerů příslušné DMP, tak i (v některých případech) zvýšení či snížení dalších analytů z důvodu metabolické nerovnováhy.

V moči pacienta s MNGIE, defektem thymidinfosforylasy (EC 2.4.2.4), katalyzující reverzibilní fosforolýzu 2-deoxyuridinu na uracil a thymidinu na thymin (Filosto *et al.*, 2018), byly nalezeny substráty této enzymové reakce, 2-deoxyuridin a thymidin. Jejich hladina byla zvýšená o více než jeden řád – ve srovnání s fyziologickými hodnotami. Navíc byly nalezeny sekundárně zvýšené samotné pyrimidinové báze uracil a thymin, které nejsou uváděny v literatuře jakožto charakteristické biomarkery pro MNGIE.

V moči pacienta s DPDD, defektem dihydropyrimidindehydrogenasy (EC 1.3.1.2), jež katalyzuje přeměnu uracilu a thyminu na dihydrouracil a dihydrothymin (Van den Berghe *et al.*, 2008), byly ve zvýšené koncentraci (o jeden řád) detekovány substráty této enzymové reakce, uracil a thymin.

V moči pacienta s CTLN1, za niž je zodpovědný defekt argininosukcinátsynthetasy 1 (EC 6.3.4.5) podílející se na konjugaci citrulinu s aspartátem za vzniku argininosukcinátu (Leonard, 2008), byla jako produkt vedlejší reakce nalezena kyselina orotová. Její hladina byla ve srovnání s fyziologickou hodnotou o jeden řád vyšší.

V moči pacienta s ASA, defektem argininosukcinátlyasy (EC 4.3.2.1) uplatňující se při degradaci argininosukcinátu za vzniku argininu a fumarátu (Leonard, 2008; Erez *et al.*, 2011), byl detekován o čtyři řády zvýšený argininosukcinát (substrát enzymové reakce) a o jeden řád zvýšená kyselina orotová (produkt vedlejší reakce) ve srovnání s fyziologickými hodnotami.

V moči pacienta s ORNT1D, defektem přenašeče ornithinu, vychytávající a přenášející ornithin z buněčného cytosolu do matrix mitochondrie (Häberle and Rubio, 2014; Wild *et al.*, 2019), byly nalezeny produkty vedlejších reakcí, kyselina orotová a homocitrulin. Jejich hladina byla o jeden řád zvýšená ve srovnání s fyziologickými hodnotami.

V moči pacienta s MCADD, defektem MCAD (EC 1.3.8.7), jež v rámci počátečního kroku  $\beta$ -oxidace katalyzuje přeměnu MK se středně dlouhým řetězcem (C6–C12) (Harding, 2017), byly nalezeny ve zvýšené koncentraci produkty vedlejších reakcí, fenylpropionylglycin a hexanoylglycin. Hladina fenylpropionylglycinu byla o dva řády zvýšená, zatímco hladina hexanoylglycinu byla zvýšená pouze o jeden řád.

V moči pacienta s IVA, defektem isovaleryl-CoA dehydrogenasy (EC 1.3.8.4), zprostředkovávající přeměnu isovaleryl-CoA na 3-methylkrotonyl-CoA (Vockley and Ensenauer, 2006), byl ve zvýšené koncentraci detekován produkt vedlejší reakce, isovalerylglycin. Jeho hladina byla zvýšená o čtyři řády ve srovnání s fyziologickou hodnotou.

V moči pacienta s galaktosémií byla zvýšená koncentrace galaktitolu a galaktosy. V případě galaktitolu byla hladina zvýšená o 2 řády, zatímco u galaktosy o 3 řády. Pro určení přesné diagnózy je však tato informace nedostačující, neboť může predikovat GALTD, GALKD či dokonce GALED. Pro přesné stanovení diagnózy je proto nezbytné provést další testy v rámci diferenciální diagnostiky týkající se např. enzymové aktivity (Cuthbert *et al.*, 2008). Za vyšší odezvy galaktitolu/mannitolu/sorbitolu a glukosy/manosy/galaktosy u ostatních pacientů může být zodpovědný nadměrný přísun glukosy nebo terapie léčivem obsahující mannitol.

Výše uvedené příklady analýzy moči pacientů s DMP prezentují úspěšnou aplikaci nově vyvinuté LC/MS metody.

## 6 Závěr

Na základě rešerše byly nalezeny specifické diagnostické močové biomarkery DMP. Ty byly použity při vývoji LC/MS metody, který zahrnoval optimalizaci MS parametrů a pozorování elučního chování acylglycinových isomerů. V rámci validace byla stanovena linearita, LOD, LOQ, opakovatelnost, mezilehlá přesnost a celková výtěžnost metody. Validovaná metoda byla aplikována na vzorky močí pacientů s DMP, načež potvrdila příslušné diagnózy pacientů.

Nově vyvinutou, semikvantitativní metodou lze analyzovat široké spektrum močových metabolitů (celkem 76), a tak diagnostikovat DMP, zejména metabolismu purinů, pyrimidinů, kreatinu, močovinnového cyklu,  $\beta$ -oxidace či BCAA.

Výhodou této metody je vysoká citlivost a selektivita umožňující stanovit látky širokého koncentračního rozmezí. Na úkor rychlé analýzy však neposkytuje rozlišení některých isomerů. To však není vzhledem k účelu metody, jímž je skrínink širokého spektra DMP za krátký čas, překážkou.

Nově vyvinutá LC/MS metoda byla v Laboratoři dědičných metabolických poruch, oddělení Klinické biochemie, Fakultní nemocnice Olomouc zavedena k rutinní diagnostice DMP. Její aplikace v praxi přinesla jednodušší a rychlejší analýzu vzorků. Zlepšením diagnostiky DMP lze předejít závažným klinickým projevům jednotlivých onemocnění prostřednictvím zahájení včasné terapie.



## 7 Literatura

Adam T., Friedecký D., Fairbanks L. D., Ševčík J., Barták P. (1999) Capillary Electrophoresis for Detection of Inherited Disorders of Purine and Pyrimidine Metabolism. *Clinical Chemistry* **45**, 2086–2093.

Adam T., Lochman P., Friedecký D. (2002) Screening method for inherited disorders of purine and pyrimidine metabolism by capillary electrophoresis with reversed electroosmotic flow. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **767**, 333–340.

Alhusani A., Obaid A., Blom H. J., Wedell A., Alfadhel M. (2019) Adenosine Kinase Deficiency: Report and Review. *Neuropediatrics* **50**, 46–50.

Amita M., Srivastava P., Mandal K., De S., Phadke S. R. (2017) Fanconi-Bickel Syndrome: Another Novel Mutation in *SLC2A2*. *Indian Journal of Pediatrics* **84**, 236–237.

An Y., Young S. P., Kishnani P. S., Milington D. S., Amalfitano A., Corz D., Chen Y.-T. (2005) Glucose Tetrasaccharide as a Biomarker for Monitoring the Therapeutic Response to Enzyme Replacement Therapy for Pompe Disease. *Molecular Genetics and Metabolism* **85**, 247–254.

Anderson S. (2018) GALT Deficiency Galatosemia. *MCN. The American Journal of Maternal Child Nursing* **43**, 44–51.

Anon. (2017) Český lékopis, pp. 135, Grada Publishing, Praha, ČR.

Arnold G. L. (2018) Inborn errors of metabolism in the 21<sup>st</sup> century: past to present. *Annals of Translational Medicine* **6**, 467.

Barness L. A., Wong K. (2017) Mitochondrial Myopathies and Disorders. In *Metabolic Diseases, 2<sup>nd</sup> ed.* (Enid Gilbert-Barness, Lewis A. Barness, Philip M. Farrell, eds.), pp. 191–269, IOS Press, Amsterdam, Netherlands.

Barshop B. A. (2014) Biotin Disorders. In *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases* (Nenad Blau, Marinus Duran, K. Michael Gibson, Carlo Dionisi-Vici, eds.), pp. 219–225, Springer, Berlin/Heidelberg, Germany.

Baydakova G. V., Ivanova T. A., Mikhaylova S. V., Saydaeva D. Kh., Dzhudinova L. L., Akhlakova A. I., Gamzatova A. I., Bychkov I. O., Zakharova E. Yu. (2019) The Unique

Spectrum of Mutations in Patients with Hereditary Tyrosinemia Type 1 in Different Regions of the Russian Federation. *JIMD Reports* **45**, 89–93.

Bierau J., Šebesta I. (2014) Purine and Pyrimidine Disorders. In *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases* (Nenad Blau, Marinus Duran, K. Michael Gibson, Carlo Dionisi-Vici, eds.), pp. 641–660, Springer, Berlin/Heidelberg, Germany.

Bollée G., Dollinger C., Boutaud L., Guillemot D., Bensman A., Harambat J., Deteix P., Daudon M., Knebelmann B., Ceballos-Picot I. (2010) Phenotype and Genotype Characterization of Adenine Phosphoribosyltransferase Deficiency. *Journal of the American Society of Nephrology* **21**, 679–688.

Burlina A., Zeviani M. (2014) Ethylmalonic Encephalopathy. In *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases* (Nenad Blau, Marinus Duran, K. Michael Gibson, Carlo Dionisi-Vici, eds.), pp. 157–163, Springer, Berlin/Heidelberg, Germany.

Cagdas D., Gur Cetinkaya P., Karaatmaca B., Esenboga S., Tan C., Yilmaz T., Gümüş E., Bariş S., Kuşkonmaz B., Ozgur T. T., Bali P., Santisteban I., Orhan D., Yüce A., Cetinkaya D., Boztug K., Hershfield M., Sanal O., Tezcan İ. (2018) ADA Deficiency: Evaluation of the Clinical and Laboratory Features and the Outcome. *Journal of Clinical Immunology* **38**, 484–493.

Choi J.-H., Lee B. H., Kim J. H., Kim G.-H., Kim Y.-M., Cho J., Cheon C.-K., Ko J. M., Lee J. H., Yoo H.-W. (2015) Clinical outcomes and the mutation spectrum of the OTC gene in patients with ornithine transcarbamylase deficiency. *Journal of Human Genetics* **60**, 501–507.

Costa C. G., Guérand W. S., Struys E. A., Holwerda U., ten Brink H. J., Tavares de Almeida I., Duran M., Jakobs C. (2000) Quantitative analysis of urinary acylglycines for the diagnosis of  $\beta$ -oxidation defects using GC-NCI-MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **21**, 1215–1224.

Cuthbert C., Klapper H., Elsas L. (2008) Diagnosis of Inherited Disorders of Galactose Metabolism. *Current Protocols in Human Genetics* **17**, 5.

De Hoffmann E., Stroobant V. (2007) Mass spectrometry: principles and applications, 3<sup>rd</sup> ed., pp. 85–88, John Wiley and Sons Ltd, Chichester, UK.

- Dettmer K., Aronov P. A., Hammock B. D. (2007) Mass spectrometry-based metabolomics. *Mass Spectrometry Reviews* **26**, 51–78.
- Diez-Fernandez C., Häberle J. (2017) Targeting CPS1 in the treatment of Carbamoyl phosphate synthetase 1 (CPS1) deficiency, a urea cycle disorder. *Expert Opinion on Therapeutic Targets* **21**, 391–399.
- Donti T. R., Blackburn P. R., Atwal P. S. (2016) Holocarboxylase synthetase deficiency pre and post newborn screening. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* **7**, 40–44.
- Duran M. (2008) Amino Acids. In *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics* (Nenad Blau, Marinus Duran, K. Michael Gibson, eds.), pp. 53–89, Springer, Berlin/Heidelberg, Germany.
- Erez A., Nagamani S. C., Lee B. (2011) Argininosuccinate lyase deficiency-argininosuccinic aciduria and beyond. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* **157**, 45–53.
- European Medicines Agency (2019) ICH guideline M10 on bioanalytical method validation, pp.6, London, UK.
- Fang Y., Cai C., Wang C., Sun B., Zhang X., Fan W., Hu W., Meng Y., Lin S., Zhang C., Zhang Y., Shu J. (2019) Clinical and genetic analysis of 7 Chinese patients with  $\beta$ -ureidopropionase deficiency. *Medicine* **98**, e14021.
- Fekrvand S., Yazdani R., Abolhassani H., Ghaffari J., Aghamohammadi A. (2019) The First Purine Nucleoside Phosphorylase Deficiency Patient Resembling IgA Deficiency and a Review of the Literature. *Immunological Investigations* **48**, 410–430.
- Ficicioglu C. (2017) Disorders of Amino Acid Metabolism. In *Metabolic Diseases, 2<sup>nd</sup> ed.* (Enid Gilbert-Barness, Lewis A. Barness, Philip M. Farrell, eds.), pp. 47–116, IOS Press, Amsterdam, Netherlands.
- Filosto M., Piccinelli S. C., Caria F., Cassarino S. G., Baldelli E., Galvagni A., Volonghi I., Scarpelli M., Padovani A. (2018) Mitochondrial Neurogastrointestinal Encefalomyopathy (MNGIE-MTDPS1). *Journal of Clinical Medicine* **7**, 1–13.
- Fleger M., Willomitzer J., Meinsma R., Alders M., Meijer J., Hennekam R. C. M., Huemer M., Van Kuilenburg A. B. P (2017) Dihydropyrimidine Dehydrogenase Deficiency: Metabolic Disease or Biochemical Phenotype? *JIMD Reports* **37**, 49–54.

Friedecký D., Lemr K. (2012) Úvod do hmotnostní spektrometrie. *Klinická biochemie a metabolismus* **20**, 152–157.

Gibson K. M., Duran M. (2014) Simple Tests. In *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases* (Nenad Blau, Marinus Duran, K. Michael Gibson, Carlo Dionisi-Vici, eds.), pp. 743–747, Springer, Berlin/Heidelberg, Germany.

Gilbert-Barness E., Farrell P. M. (2017) Approach to Diagnosis of Metabolic Diseases. In *Metabolic Diseases, 2<sup>nd</sup> ed.* (Enid Gilbert-Barness, Lewis A. Barness, Philip M. Farrell, eds.), pp. 1–18, IOS Press, Amsterdam, Netherlands.

Goodman S. I., Duran M. (2014) Biochemical Phenotypes of Questionable Clinical Significance. In *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases* (Nenad Blau, Marinus Duran, K. Michael Gibson, Carlo Dionisi-Vici, eds.), pp. 691–705, Springer, Berlin/Heidelberg, Germany.

Gregersen N., Kølvrå S., Mortensen P. B. (1986) Acyl-CoA: glycine N-Acyltransferase: In Vitro Studies on the Glycine Conjugation of Straight- and Branched-Chained Acyl-CoA Esters in Human Liver. *Biochemical Medicine and Metabolic Biology* **35**, 210–218.

Gross J. H. (2011) Mass spectrometry: a textbook, 2<sup>nd</sup> ed., pp. 1–10, Springer, Berlin, Germany.

Grünert S. C., Schlatter S. M., Schmitt R. N., Gemperle-Britschgi C., Mrázová L., Balci M. C., Bischof F., Coker M., Das A. M., Demirkol M., de Vries M., Gökçay G., Häberle J., Uçar S. K., Lotz-Havla A. S., Lücke T., Roland D., Rutsch F., Santer R., Schlune A., Staufner C., Schwab K. O., Mitchell G. A., Sass J. O. (2017) 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A lyase deficiency: Clinical presentation and outcome in a series of 37 patients. *Molecular Genetics and Metabolism* **121**, 206–215.

Harding C. O. (2017) Fatty Acid  $\beta$ -Oxidation Defects. In *Metabolic Diseases, 2<sup>nd</sup> ed.* (Enid Gilbert-Barness, Lewis A. Barness, Philip M. Farrell, eds.), pp. 155–189, IOS Press, Amsterdam, Netherlands.

Harris J. C. (2015) Disorders of purine and pyrimidine metabolism. In *Nelson Textbook of Pediatrics, 20<sup>th</sup> ed.* (Robert M. Kliegman, Bonita M. D. Stanton, Joseph St. Geme, Nina F. Schor, eds.), pp. 744–752, Elsevier, PA, USA.

- Hobert J. A., Liu A., Pasquali M. (2016) Acylglycine Analysis by Ultra-Performance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS). *Current Protocols in Human Genetics* **91**, 17.25.1–17.25.12.
- Holme E., Mitchell G. A. (2014) Tyrosine Metabolism. In *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases* (Nenad Blau, Marinus Duran, K. Michael Gibson, Carlo Dionisi-Vici, eds.), pp. 23–31, Springer, Berlin/Heidelberg, Germany.
- Honzík T., Tesařová M., Hansíková H., Krijt J., Beneš P., Zámečník J., Wenchich L., Zeman J. (2006) Mitochondriální neurogastrointestinální encefalomyopatie (syndrom MNGIE). *Časopis lékařů českých* **8**, 665–670.
- Hornik P., Vyskočilová P., Friedecký D., Adam T. (2006) Diagnosing AICA-ribosiduria by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **843**, 15–19.
- Häberle J., Rubio V. (2014) Hyperammonemias and Related Disorders. In *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases* (Nenad Blau, Marinus Duran, K. Michael Gibson, Carlo Dionisi-Vici, eds.), pp. 47–62, Springer, Berlin/Heidelberg, Germany.
- Hörster F., Hoffmann G. F. (2004) Pathophysiology, diagnosis, and treatment of methylmalonic aciduria-recent advances and new challenges. *Pediatric Nephrology* **19**, 1071–1074.
- Ichida K., Amaya Y., Okamoto K., Nishino T. (2012) Mutations associated with functional disorder of xanthine oxidoreductase and hereditary xanthinuria in humans. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 15475–15495.
- Ivanovová E. (2018) Vliv pH na aktivitu ureasy pro GC/MS metabolomiku lidské moči, Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci.
- Jandera P. (2011) HILIC chromatografie: perspektivní technika separace polárních látek na polárních stacionárních fázích ve vodně-organických mobilních fázích. *Chemagazín* **2**, 8–9.
- Jurecka A., Zikanova M., Kmoch S., Tylki-Szymańska A. (2015) Adenylosuccinate lyase deficiency. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **38**, 231–242.

- Klouda P. (2003) *Moderní analytické metody*, 2. upravené vydání, pp. 25–51, Pavel Klouda, Ostrava, ČR.
- Kodíček M., Valentová O., Hynek R. (2015) *Biochemie: chemický pohled na biologický svět*, pp. 328–329, 331–332, 353–359, Vysoká škola chemicko-technologická, Praha, ČR.
- Kompare M., Rizzo W. B. (2008) Mitochondrial Fatty-Acid Oxidation Disorders. *Seminars in Pediatric Neurology* **15**, 140–149.
- Koolman J., Roehm K.-H. (2005) *Color Atlas of Biochemistry*, 2<sup>nd</sup> ed., pp. 182, 336–337, 417, Thieme, Stuttgart, Germany.
- Law C. Y., Lam C. W., Ching C. K., Yau K. C., Ho T. W., Lai C. K., Mak C. M. (2015) NMR-based urinalysis for beta-ketothiolase deficiency. *Clinical Chimica Acta* **438**, 222–225.
- Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J. (2005) *Biochemie pro studující medicíny*, I. díl, pp.137–140, 207–208, 222–223, Karolinum, Praha, ČR.
- Leonard J. V. (2008) Poruchy cyklu močoviny a příbuzných enzymů. In *Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch: 4. vyd.* (John Fernandes *et al.*, eds.), pp. 299–308, Triton, Praha, ČR.
- Levtchenko E., Emma F. (2014) Cystinosis. In *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases* (Nenad Blau, Marinus Duran, K. Michael Gibson, Carlo Dionisi-Vici, eds.), pp. 475–482, Springer, Berlin/Heidelberg, Germany.
- Lichter-Konecki U. (2017) Defects of the Urea Cycle. In *Metabolic Diseases*, 2<sup>nd</sup> ed. (Enid Gilbert-Barness, Lewis A. Barness, Philip M. Farrell, eds.), pp. 137–154, IOS Press, Amsterdam, Netherlands.
- Liu A., Kushmir M. M., Roberts W. L., Pasquali M. (2004) Solid phase extraction procedure for urinary organic acid analysis by gas chromatography mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **806**, 283–287.
- Löffler M., Fairbanks L. D., Zameitat E., Marinaki A. M., Simmonds H. A. (2005) Pyrimidine pathways in health and disease. *Trends in Molecular Medicine* **11**, 430–437.

Marie S., Heron B., Bitoun P., Timmerman T., Van den Berghe G., Vincent M.-F. (2004) AICA-Ribosiduria: A Novel, Neurologically Devastating Inborn Error of Purine Biosynthesis Caused by Mutation of *ATIC* **74**, 1276–1281.

Masopust J, Průša R. (1999) Patobiochemie metabolických drah, pp. 64, 97–98, Univerzita Karlova, Praha, ČR.

Matsuura R., Hamano S., Iwamoto T., Shimizu K., Ohashi H. (2018) First Patient with Salla Disease Confirmed by Genomic Analysis in Japan. *Pediatric Neurology* **81**, 52–53.

Merritt J. L. II, Norris M., Kanungo S. (2018) Fatty acid oxidation disorders. *Annals of Translational Medicine* **6**, 473.

Monostori P., Klinke G., Hauke J., Richter S., Bierau J., Garbade S. F., Hoffmann G. F., Langhans C.-D., Haas D., Okun J. G. (2019) Extended Diagnosis of Purine and Pyrimidine Disorders From Urine: LC MS/MS Assay Development and Clinical Validation. *PLoS One* **28**, e0212458.

Musilová J., Glatz Z. (2011) Metabolomika – základní pojmy, strategie a metodologie. *Chemické listy* **105**, 745–751.

Nelson D. L., Cox M. M. (2008) Lehninger Principles of Biochemistry, 5<sup>th</sup> ed., pp. 893, W. H. Freeman and Company, NY, USA.

Nguyen D.-T., Lee G., Paik M.-J. (2013) Keto acid profiling analysis as ethoxime/tert-butyldimethylsilyl derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **913–914**, 48–54.

Nie C., He T., Zhang W., Zhang G., Ma X. (2018) Branched Chain Amino Acids: Beyond Nutrition Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 1–16.

Niessen W. M. A, Tinke A. P. (1995) Liquid chromatography–mass spectrometry General principles and instrumentation. *Journal of Chromatography A* **703**, 37–57.

Nováková L., Douša M. (2013a) Moderní HPLC separace v teorii a praxi I., pp. 11–221, Lucie Nováková, Praha, ČR.

Nováková L., Douša M. (2013b) Moderní HPLC separace v teorii a praxi II., pp. 11, 142–143, Lucie Nováková, Praha, ČR.

- Nussbaum R. L., McInnes R. R., Willard H. F. (2015) Thompson & Thompson Genetics in Medicine, 8<sup>th</sup> ed., pp. 494, Elsevier, PA, USA.
- Nyhan W. L., Friedmann T. (2017) Disorders of Nucleotide Metabolism: Purines and Pyrimidines. In *Metabolic Diseases*, 2<sup>nd</sup> ed. (Enid Gilbert-Barness, Lewis A. Barness, Philip M. Farrell, eds.), pp. 441–464, IOS Press, Amsterdam, Netherlands.
- Ofman R., Ruiter J. P., Feenstra M., Duran M., Poll-The B. T., Zschocke J., Ensenauer R., Lehnert W., Sass J. O., Sperl W., Wanders R. J. (2003) 2-Methyl-3-Hydroxybutyryl-CoA Dehydrogenase Deficiency Is Caused by Mutations in the *HADH2* Gene. *American Journal of Human Genetics* **72**, 1300–1307.
- Pampols T. (2010) Inherited Metabolic Rare Disease. In *Rare Diseases Epidemiology, Advances in Experimental Medicine and Biology*, Vol. 686 (Manuel Posada de la Paz, Stephen C. Groft, eds.), pp. 397–431, Springer, Berlin/Heidelberg, Germany.
- Pelley J. W. (2012) Elsevier's Integrated Review Biochemistry, 2<sup>nd</sup> ed., pp. 119–124, Elsevier, PA, USA.
- Pitt J. J. (2009) Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *The Clinical Biochemist Reviews* **30**, 19–34.
- Porta F., Chiesa N., Martinelli D., Spada M. (2019) Clinical, biochemical, and molecular spectrum of short/branched-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency: two new cases and review of literature. *Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism* **32**, 101–108.
- Racek J. (2006) Klinická biochemie, 2. přepracované vydání, pp. 259, Galén, Praha, ČR.
- Rinaldo P. (2008) Organic Acids. In *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics* (Nenad Blau, Marinus Duran, K. Michael Gibson, eds.), pp. 137–169, Springer, Berlin/Heidelberg, Germany.
- Runolfsson H. L., Palsson R., Agustsdottir I. M., Indridason O. S., Edvardsson V. O. (2018) Long-term renal outcomes of APRT deficiency presenting in childhood. *Pediatric Nephrology* **34**, 435–442.
- Santer R., Klepper J., Smit G. P. A. (2014) Disorders of Carbohydrate Metabolism and Glucose Transport. In *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases* (Nenad Blau, Marinus Duran, K. Michael Gibson, Carlo Dionisi-Vici, eds.), pp. 265–301, Springer, Berlin/Heidelberg, Germany.



- Santra S., Macdonald A., Preece M. A., Olsen R. K., Andresen B. S. (2017) Long-term outcome of isobutyryl-CoA dehydrogenase deficiency diagnosed following an episode of ketotic hypoglycaemia. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* **10**, 28–30.
- Sass J. O., Mohr V., Olbrich H., Engelke U., Horvath J., Fliegau M., Loges N. T., Schweitzer-Krantz S., Moebus R., Weiler P., Kispert A., Superti-Furga A., Wevers R. A., Omran H. (2006) Mutations in *ACY1*, the Gene Encoding Aminoacylase 1, Cause a Novel Inborn Error of Metabolism. *American Journal of Human Genetics* **78**, 401–409.
- Scaglia F., Lee B. (2006) Clinical, Biochemical, and Molecular Spectrum of Hyperargininemia Due to Arginase I Deficiency. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* **142**, 113–120.
- Schwarz G., Veldman A. (2014) Molybdenum Cofactor Disorders. In *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases* (Nenad Blau, Marinus Duran, K. Michael Gibson, Carlo Dionisi-Vici, eds.), pp. 191–203, Springer, Berlin/Heidelberg, Germany.
- Sebesta I., Stiburkova B., Krijt J. (2018) Hereditary xanthinuria is not so rare disorder of purine metabolism. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic acids* **37**, 324–328.
- Skoog D. A., Holler F. J., Nieman T. A. (1998) Principles of instrumental analysis, 5<sup>th</sup> ed., pp. 531, 726, Harcourt College Publishers, Orlando, FL, USA.
- Sommer A., Christensen E., Schwenger S., Seul R., Haas D., Olbrich H., Omran H., Sass J. O. (2011) The molecular basis of aminoacylase 1 deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta* **1812**, 685–690.
- Spiekerkoetter U., Wood P. A. (2010) Mitochondrial fatty acid oxidation disorders: pathophysiological studies in mouse models. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **33**, 539–546.
- Stadler S. C., Polanetz R., Maier E. M., Heidenreich S. C., Niederer B., Mayerhofer P. U., Lagler F., Koch H. G., Santer R., Fletcher J. M., Ranieri E., Das A. M., Spiekerkötter U., Schwab K. O., Pötzsch S., Marquardt I., Hennermann J. B., Knerr I., Mercimek-Mahmutoglu S., Kohlschmidt N., Liebl B., Fingerhut R., Olgemöller B., Muntau A. C., Roscher A. A., Röschinger W. (2006) Newborn Screening for 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase Deficiency: Population Heterogeneity of *MCCA* and *MCCB* Mutations and Impact on Risk Assessment. *Human Mutation* **27**, 748–759.

Šťastná S. (2008) Laboratorní diagnostika dědičných metabolických poruch. *Medicína pro praxi* **5**, 274–276.

Staufner C., Lindner M., Dionisi-Vici C., Freisinger P., Dobbelaere D., Douillard C., Makhseed N., Straub B. K., Kahrizi K., Ballhausen D., la Marca G., Kölker S., Haas D., Hoffmann G. F., Grünert S. C., Blom H. J. (2016) Adenosine kinase deficiency: expanding the clinical spectrum and evaluating therapeutic options. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **39**, 273–283.

Stepien K. M., McCarthy P., Treacy E. P., O’Byrne J. J., Pastores G. M. (2018) Neurocognitive assessments and long-term outcome in an adult with 2-methyl-3-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase deficiency. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* **16**, 31–35.

Struys E. A., Verhoeven N. M., Jakobs C. (2008) Creatine and its Metabolites. In *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics* (Nenad Blau, Marinus Duran, K. Michael Gibson, eds.), pp. 739–749, Springer, Berlin/Heidelberg, Germany.

Stöckler-Ipsiroglu S., Apatean D., Battini R., DeBrosse S., Dessoffy K., Edvardson S., Eichler F., Johnston K., Koeller D. M., Nouioua S., Tazir M., Verma A., Dowling M. D., Wierenga A. M., Zhang V., Wong L.-J. C. (2015) Arginine:glycine amidinotransferase (AGAT) deficiency: Clinical features and long term outcomes in 16 patients diagnosed worldwide. *Molecular Genetics and Metabolism* **116**, 252–259.

Stöckler-Ipsiroglu S., Salomons G. S. (2008) Syndromy s deficitem kreatinu. In *Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch: 4. vyd.* (John Fernandes *et al.*, eds.), pp. 247–254, Triton, Praha, ČR.

Summar M. S., Mew N. A. (2018) Inborn Errors of Metabolism with Hyperammonemia: Urea Cycle Defects and Related Disorders. *Pediatric Clinics of North America* **65**, 231–246.

Suttle D. P., Bugg B. Y., Winkler J. K., Kanalas J. J. (1988) Molecular cloning and nucleotide sequence for the complete coding region of human UMP synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**, 1754–1758.

Torres R. J., Puig J. G. (2007) Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) deficiency: Lesch-Nyhan syndrome. *Orphanet Journal of Rare Diseases* **2**, 1–10.

Tylki-Szymanska A., Gradowska W., Sommer A., Heer A., Walter M., Reinhard C., Omran H., Sass J. O., Jurecka A. (2010) Aminoacylase 1 deficiency associated with autistic behavior. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **33**, 211–214.

Van Coster R. N., Gerlo E. A., Giardina T. G., Engelke U. F., Smet J. E., De Praeter C. M., Meersschaut V. A., De Meirleir L. J., Seneca S. H., Devreese B., Leroy J. G., Herga S., Perrier J. P., Wevers R. A., Lissens W. (2005) Aminoacylase I deficiency: A novel inborn error of metabolism. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **338**, 1322–1326.

Van den Berghe G., Vincent M.-F., Marie S. (2008) Poruchy metabolismu purinů a pyrimidinů. In *Diagnostika a léčba dědičných metabolických poruch: 4. vyd.* (John Fernandes *et al.*, eds.), pp. 479–493, Triton, Praha, ČR.

Van Kuilenburg A. B. P., Dobritzsch D., Meijer J., Meinsma R., Benoist J.-F., Assmann B., Schubert S., Hoffmann G. F., Duran M., De Vries M. C., Kurlmann G., Eyskens F. J. M., Greed L., Sass J. O., Schwab K. O., Sewell A. C., Walter J., Hahn A., Zoetekouw L., Ribes A., Lind S., Hennekam R. C. M. (2010) Dihydropyrimidinase deficiency: Phenotype, genotype and structural consequences in 17 patients. *Biochimica et Biophysica Acta* **1802**, 639–648.

Van Kuilenburg A. B. P., Meinsma R., Beke E., Assmann B., Ribes A., Lorente I., Busch R., Mayatepek E., Abeling N. G. G. M., Van Cruchten A., Stroomer A. E. M., Van Lenthe H., Zoetekouw L., Kulik W., Hoffmann G. F., Voit T., Wevers R. A., Rutsch F., Van Gennip A. H. (2004)  $\beta$ -Ureidopropionase deficiency: an inborn error of pyrimidine degradation associated with neurological abnormalities. *Human Molecular Genetics* **13**, 2793–2801.

Van Kuilenburg A. B. P., Vreken P., Abeling N. G. G. M., Bakker H. D., Meinsma R., Van Lenthe H., De Abreu R. A., Smeitink J. A. M., Kayserili H., Apak M. Y., Christensen E., Holopainen I., Pulkki K., Riva D., Botteon G., Holme E., Tulinius M., Kleijer W. J., Beemer F. A., Duran M., Niezen-Koning K. E., Smit G. P. A., Jakobs C., Smit L. M. E., Moog U., Spaapen L. J. M., Van Gennip A. H. (1999) Genotype and phenotype in patients with dihydropyrimidine dehydrogenase deficiency. *Human Genetics* **104**, 1–9.

Verheijen F. W. (2008) Sialic Acid. In *Laboratory Guide to the Methods in Biochemical Genetics* (Nenad Blau, Marinus Duran, K. Michael Gibson, eds.), pp. 335–349, Springer, Berlin/Heidelberg, Germany.

- Villani G. R., Gallo G., Scolamiero E., Salvatore F., Ruoppolo M. (2017) “Classical organic acidurias”: diagnosis and pathogenesis. *Clinical and Experimental Medicine* **17**, 305–323.
- Vockley J., Ensenauer R. (2006) Isovaleric acidemia: new aspects of genetic and phenotypic heterogeneity. *American Journal of Medical Genetics. Part C, Seminars in Medical Genetics* **142**, 95–103.
- Vodrážka Z. (1996) Biochemie, Živý system jako chemický stroj, pp. 97–99, Academia, Praha, ČR.
- Wang Q., Yang J., Liu Y., Li X., Luo F., Xie J. (2018) A novel *SLC6A8* mutation associated with intellectual disabilities in a Chinese family exhibiting creatine transporter deficiency: case report. *BMC Medical Genetics* **19**, 1 – 5.
- Waters P. J., Thuriot F., Clarke J. T., Gravel S., Watkins D., Rosenblatt D. S., Lévasque S. (2016) Methylmalonyl-coA epimerase deficiency: A new case, with and acute metabolic presentation and an intronic splicing mutation in the *MCEE* gene. *Molecular Genetics and Metabolism Reports* **9**, 19–24.
- Wertheim-Tysarowska K., Gos M., Sykut-Cegielska J., Bal J. (2015) Genetic analysis in inherited metabolic disorders – from diagnosis to treatment. Own experience, current state of knowledge and perspectives. *Developmental period medicine* **19**, 413–431.
- Wevers R. A., Christensen M., Engelke U. F. H., Geuer S., Coene K. L. M., Kwast J. T., Lund A. M., Vissers L. E. L. M. (2019) Functional disruption of pyrimidine nucleoside transporter CNT1 results in a novel inborn error of metabolism with high excretion of uridine and cytidine. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **42**, 494–500.
- Wilcken B., Hammond J. W., Howard N., Bohane T., Hocart C., Halpern B. (1981) Hawkinsinuria: A Dominantly Inherited Defect of Tyrosine Metabolism with Severe Effects in Infancy. *The New England Journal of Medicine* **305**, 865–868.
- Wild K. T., Ganetzky R. D., Yudkoff M., Ierardi-Curto L. (2019) Hyperornithinemia, Hyperammonemia, and Homocitrullinuria Syndrome Causing Severe Neonatal Hyperammonemia. *JIMD Reports* **44**, 103–107.
- Wortmann R. L., Andres C., Kaminska J., Mejias E., Gelfand E., Arnold W., Rich K., Fox I. H. (1979) Purine Nucleoside Phosphorylase Deficiency: Biochemical Properties and Heterogeneity in Two Families. *Arthritis and Rheumatism* **22**, 524–531.

Wortmann S. B., Chen M. A., Colombo R., Pontoglio A., Alhaddad B., Botto L. D., Yuzyuk T., Coughlin C. R., Descartes M., Grünewald S., Maranda B., Mills P. B., Pitt J., Potente C., Rodenburg R., Kluijtmans L. A. J., Sampath S., Pai E. F., Wevers R. A., Tiller G. E. *et al.* (2017) Mild orotic aciduria in *UMPS* heterozygotes: a metabolic finding without clinical consequences. *Journal of Inherited Metabolic Disease* **40**, 423–431.

Zannolli R., Micheli V., Mazzei M. A., Sacco P., Piomboni P., Bruni E., Miracco C., de Santi M. M., Terrosi Vagnoli P., Volterrani L., Pellegrini L., Livi W., Lucani B., Gonnelli S., Burlina A. B., Jacomelli G., Macucci F., Pucci L., Fimiani M., Swift J. A., Zappella M., Morgese G. (2003) Hereditary xanthinuria type II associated with mental delay, autism, cortical renal cysts, nephrocalcinosis, osteopenia, and hair and teeth defects. *Journal of Medical Genetics* **40**, e121.

**Internetové databáze:**

HMDB (*The Human Metabolome Database*): [www.hmdb.ca](http://www.hmdb.ca)

KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*): [www.kegg.jp](http://www.kegg.jp)

## 8 Přílohy

Příloha 1: Stanovení opakovatelnosti, mezilehlé přesnosti a výtěžnosti LC/MS metody na vzorcích LQC.

<i>Analyt (LQC)</i>	<i>Opakovatelnost (%)</i>	<i>Mezilehlá přesnost (%)</i>	<i>Výtěžnost (%)</i>
(Iso)Butyrylglycin	13,2	11,9	124,2
(Iso)Valerylglycin, 2-Methylbutyrylglycin	12,1	10,7	92,9
2,8-Dihydroxyadenin	n.s.	n.s.	n.s.
2-Deoxyuridin	3,6	3,7	64,0
3-Methylkrotonylglycin, Tiglylglycin	9,5	5,7	111,8
Adenin	11,8	10,1	68,7
Adenosin	8,9	8,9	95,6
AICAr	17,4	10,8	98,4
Argininosukcinát	17,9	6,5	79,3
Deoxyadenosin	9,6	9,4	91,6
Deoxyguanosin	9,3	6,7	94,0
Deoxyinosin	6,3	5,1	93,8
Dihydrothymidin	21,5	6,1	87,6
Dihydrouracil	46,5	13,7	81,9
Erythritol, Threitol (C4ol)	24,0	15,5	89,1
Fenylpropionylglycin	8,9	8,4	137,2
Galaktitol, Mannitol, Sorbitol (C6ol)	29,5	5,8	74,8
Glukosa, Manosa, Galaktosa (C6)	56,0	27,2	111,7
Glutarylglucosamin	17,9	14,6	117,0
Guanidinoacetát	26,9	6,4	59,2
Guanosin	18,3	8,2	105,0
Hexanoylglycin	10,0	7,4	130,7
Homocitrulin	22,3	8,0	97,5
Hypoxanthin	29,9	10,0	128,1
Inosin	18,3	8,4	106,6
Kreatin	37,5	14,0	81,1
Kreatinin	8,9	7,7	98,2
Kyselina močová	27,3	23,2	112,2
Kyselina orotová	10,5	8,3	95,7
Kyselina oxalová	12,9	10,9	98,2
Kyselina sialová	12,8	12,0	107,1
Maltosa, Laktosa, Sacharosa (C12)	95,5	28,8	131,4
Maltotriosa, Melezitosa, Rafinosa (C18)	14,8	8,1	58,0
Myo-Inositol (C6-ol)	50,9	30,0	112,8
N-Acetylaspartát	12,3	6,6	68,9
N-Acetylglutamin	28,5	6,9	107,7
N-Acetylglucosamin	15,0	10,1	98,7
N-Acetylleucin	12,2	7,2	113,7
N-Acetylserin	9,8	6,7	92,8
N-Acetylvalin	7,0	6,6	101,4
Orotidin	18,8	8,2	95,0
Perseitol, Volemitol (C7ol)	8,6	6,6	78,4
Propionylglycin	9,1	7,1	97,0
Rhamnosa (C6)	37,6	19,0	91,2
Ribosa, Xylosa, Arabinosa (C5)	46,4	20,4	92,3

SAICAr	48,2	19,7	109,2
Sedoheptulosa, Manoheptulosa (C7)	11,0	9,3	92,7
Stachyosa (C24)	22,9	12,0	79,9
Suberylglycin	9,2	6,7	68,1
Sukcinylacetone	59,8	16,6	146,8
Sukcinyladenosi	8,1	5,7	48,6
Thymidin	7,3	7,3	124,1
Thymin	5,3	5,1	83,5
Tiglylglycin	11,2	8,8	111,7
Uracil	19,3	5,8	100,5
Uridin	17,6	16,4	131,5
Xanthin	25,6	7,7	114,6
Xylitol, Ribitol, Arabitol (C5ol)	26,9	15,0	94,5

n.s.: nebylo stanoveno

Příloha 2: Stanovení opakovatelnosti, mezilehlé přesnosti a výtěžnosti LC/MS metody na vzorcích MQC.

<i>Analyt (MQC)</i>	<i>Opakovatelnost (%)</i>	<i>Mezilehlá přesnost (%)</i>	<i>Výtěžnost (%)</i>
(Iso)Butyrylglycin	9,4	7,6	111,4
(Iso)Valerylglycin, 2-Methylbutyrylglycin	10,1	7,5	76,5
2,8-Dihydroxyadenin	n.s.	n.s.	n.s.
2-Deoxyuridin	4,9	3,4	77,1
3-Methylkrotonylglycin, Tiglylglycin	5,0	4,6	89,7
Adenin	10,9	4,4	71,0
Adenosin	9,7	8,1	103,6
AICAr	15,5	5,6	98,2
Argininosukcinát	13,5	10,5	101,5
Deoxyadenosin	6,2	5,1	95,2
Deoxyguanosin	9,1	6,6	104,0
Deoxyinosin	10,2	6,0	98,2
Dihydrothymidin	11,2	7,6	118,3
Dihydrouracil	22,9	10,6	91,6
Erythritol, Threitol (C4ol)	15,1	10,9	93,6
Fenylpropionylglycin	5,8	4,4	109,6
Galaktitol, Mannitol, Sorbitol (C6ol)	16,1	6,3	88,2
Glukosa, Manosa, Galaktosa (C6)	18,9	16,3	94,4
Glutarylglýcin	15,0	12,5	117,5
Guanidinoacetát	13,6	7,9	88,7
Guanosin	10,8	5,8	106,5
Hexanoylglycin	7,8	6,3	105,1
Homocitrulin	8,1	5,0	75,2
Hypoxanthin	15,4	7,2	106,1
Inosin	13,1	6,3	97,2
Kreatin	16,7	12,7	94,8
Kreatinin	7,1	6,8	102,4
Kyselina močová	23,3	15,2	125,0
Kyselina orotová	14,8	8,5	119,8
Kyselina oxalová	20,6	8,5	108,3
Kyselina sialová	8,5	6,5	107,4
Maltosa, Laktosa, Sacharosa (C12)	17,3	13,1	100,8
Maltotriosa, Melezitosa, Rafinosa (C18)	9,5	7,4	62,8
Myo-Inositol (C6-ol)	10,9	8,9	105,0
N-Acetylaspartát	4,7	3,6	48,7
N-Acetylglutamin	21,1	9,3	132,4
N-Acetylglýcin	11,1	9,3	131,2
N-Acetylleucin	10,1	6,3	105,2
N-Acetylserin	12,6	6,5	99,4
N-Acetylvalin	5,0	4,3	92,2
Orotidin	9,6	6,4	79,9
Perseitol, Volemitol (C7ol)	7,6	4,7	85,2
Propionylglycin	9,6	9,4	81,2
Rhamnosa (C6)	10,8	7,6	92,3
Ribosa, Xylosa, Arabinosa (C5)	19,6	12,0	90,3
SAICAr	9,1	5,4	101,8
Sedoheptulosa, Manoheptulosa (C7)	9,0	8,5	91,9
Stachyosa (C24)	22,8	13,9	76,5
Suberylglýcin	9,7	5,1	63,9



Sukcinylaceton	10,9	8,2	108,1
Sukcinyladenosi	5,7	2,8	43,3
Thymidin	8,9	8,4	108,1
Thymin	5,9	4,0	83,9
Tiglylglycin	8,1	6,1	96,4
Uracil	8,2	4,5	100,0
Uridin	12,7	8,3	121,5
Xanthin	11,0	5,7	116,3
Xylitol, Ribitol, Arabitol (C5ol)	12,1	9,1	96,7

n.s.: nebylo stanoveno

Příloha 3: Stanovení opakovatelnosti, mezilehlé přesnosti a výtěžnosti LC/MS metody na vzorcích HQC.

<i>Analyt (HQC)</i>	<i>Opakovatelnost (%)</i>	<i>Mezilehlá přesnost (%)</i>	<i>Výtěžnost (%)</i>
(Iso)Butyrylglycin	12,6	10,8	115,7
(Iso)Valerylglycin, 2-Methylbutyrylglycin	12,9	10,7	91,5
2,8-Dihydroxyadenin	n.s.	n.s.	n.s.
2-Deoxyuridin	6,5	4,9	84,5
3-Methylkrotonylglycin, Tiglylglycin	7,0	5,9	90,0
Adenin	7,8	5,9	60,7
Adenosin	8,9	8,6	95,9
AICAr	12,6	6,6	81,6
Argininosukcinát	13,1	12,0	119,1
Deoxyadenosin	7,2	6,3	90,5
Deoxyguanosin	9,5	9,9	96,8
Deoxyinosin	8,9	9,1	94,5
Dihydrothymidin	8,3	6,1	110,6
Dihydrouracil	16,4	5,5	92,8
Erythritol, Threitol (C4ol)	12,1	2,9	88,4
Fenylpropionylglycin	9,4	8,8	111,7
Galaktitol, Mannitol, Sorbitol (C6ol)	7,4	3,0	90,6
Glukosa, Manosa, Galaktosa (C6)	9,0	6,0	82,6
Glutarylglýcin	14,2	13,2	117,0
Guanidinoacetát	10,1	4,1	89,6
Guanosin	9,7	10,2	97,9
Hexanoýlglycin	9,3	8,8	105,8
Homocitrulin	10,0	5,1	79,9
Hypoxanthin	8,7	8,9	90,6
Inosin	8,9	9,1	92,1
Kreatin	10,1	3,5	85,8
Kreatinin	6,2	2,9	96,0
Kyselina močová	9,4	6,1	83,5
Kyselina orotová	12,4	10,1	101,3
Kyselina oxalová	12,6	6,6	88,7
Kyselina sialová	8,3	6,4	101,0
Maltosa, Laktosa, Sacharosa (C12)	10,3	8,6	92,0
Maltotriosa, Melezitosa, Rafinosa (C18)	7,4	7,2	68,5
Myo-Inositol (C6-ol)	9,6	4,8	99,7
N-Acetylaspartát	8,7	3,1	59,1
N-Acetylglutamin	12,1	10,5	121,2
N-Acetylglýcin	11,1	10,3	125,0
N-Acetylleucin	9,6	9,9	108,4
N-Acetylserin	18,6	6,3	112,6
N-Acetylvalin	10,2	7,0	94,3
Orotidin	6,2	5,5	79,6
Perseitól, Volemitól (C7ol)	6,5	3,1	87,0
Propionylglýcin	10,2	9,5	91,4
Rhamnosa (C6)	9,0	4,2	92,9
Ribosa, Xylosa, Arabinosa (C5)	9,7	5,3	88,0
SAICAr	9,8	6,8	95,0
Sedoheptulosa, Manoheptulosa (C7)	7,6	4,0	88,6
Stachyosa (C24)	11,3	6,7	74,1
Suberylglýcin	11,5	6,6	72,3

Sukcinylaceton	10,4	9,9	110,1
Sukcinyladenosin	8,5	3,4	56,2
Thymidin	11,1	9,6	90,5
Thymin	7,8	4,2	84,7
Tiglylglycin	8,8	6,3	93,6
Uracil	2,5	1,7	92,6
Uridin	8,1	6,7	97,7
Xanthin	13,0	3,6	93,6
Xylitol, Ribitol, Arabitol (C5ol)	7,2	2,8	92,6

n.s.: nebylo stanoveno