

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Validácia LC-MS metódy pre analýzu
sacharidov a cukorných alkoholov v moči

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:	Ivana Hanáková
Studijní program:	B0512A130008 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Eliška Ivanovová
Rok:	2024

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením bakalárskej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som oboznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa 1. 5. 2024

Pod'akovanie

Chcela by som sa poďakovať vedúcej mojej bakalárskej práce, Mgr. Eliške Ivanovovej, za jej trpezlivosť, rady a ochotu vždy pomôcť pri spracovávaní tejto práce. Taktiež by som sa chcela poďakovať Laboratóriu dedičných metabolických porúch, Oddeleniu Klinickej biochémie, FN Olomouc, pod vedením prof. RNDr. Davida Friedeckého, Ph.D, za umožnenie realizácie bakalárskej práce.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Ivana Hanáková
Názov práce	Validácia LC-MS metódy pre analýzu sacharidov a cukorných alkoholov v moči
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Katedra biochemie
Vedúci práce	Mgr. Eliška Ivanovová
Rok obhajoby práce	2024
Abstrakt	<p>Dedičné metabolické poruchy sacharidov sú ochorenia, ktoré majú širokú škálu klinických príznakov. Mnohé z nich sú život ohrozujúce a preto je rýchla a správna diagnostika kľúčová pre život pacienta. Spoločným znakom týchto ochorení je akumulácia špecifických cukrov a cukorných alkoholov v moči. Analýza týchto látok je výsadou techniky GC-MS, ktorá je však časovo náročná, nielen čo sa týka pre-analytickej fázy, ale taktiež vyhodnotenia. Preto do popredia prichádza LC-MS/MS technika, pre ktorú je charakteristická jednoduchá a rýchla príprava vzoriek a jednoduché vyhodnotenie. V rámci experimentálnej časti predkladanej práce boli stanovené validačné parametre novo vyvinutej LC-MS/MS metódy – správnosť, presnosť a carry-over. Čiastočne validovaná metóda bola aplikovaná na vzorky zdravých jedincov a pacientov suspektných na DMP.</p>
Kľúčové slová	Dedičné metabolické poruchy, sacharidy, cukorné alkoholy, kvapalinová chromatografia, hmotnostná spektrometria, validácia, diagnostika
Počet strán	55
Počet príloh	2
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Ivana Hanáková
Title	Validation of LC-MS/MS method for the analysis of sugars and sugar alcohols in urine
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Eliška Ivanovová
The year of presentation	2024
Abstract	<p>Inherited metabolic disorders of carbohydrate metabolism are diseases characterized by a wide range of clinical symptoms. Many of them pose life-threatening risks, emphasizing the critical importance of rapid and accurate diagnosis that is crucial for patient survival. A common feature of these disorders is the accumulation of specific sugars and sugar alcohols in urine. Analysis of these substances is typically performed using GC-MS technique, which however, is time-consuming not only in terms of pre-analytical phase but also evaluation. Therefore, LC-MS/MS technique comes to the forefront, characterized by simple and fast sample preparation and straightforward evaluation. In the experimental part of the presented work, validation parameters of the newly developed LC-MS/MS method - accuracy, precision, and carry-over - were determined. The partially validated method was applied to samples from healthy individuals and patients suspected of IMD.</p>
Keywords	Inherited metabolic disorders, sugars, sugar alcohols, liquid chromatography, mass spectrometry, validation, diagnosis
Number of pages	55

Number of appendices	2
Language	Slovak

Obsah

1 Úvod	1
2 Teoretická časť	2
2.1 Dedičné metabolické poruchy	2
2.2 Dedičné poruchy metabolizmu sacharidov.....	3
2.2.1 Poruchy metabolizmu galaktózy.....	4
2.2.2 Poruchy metabolizmu fruktózy.....	6
2.2.3 Poruchy pentózafosfátovej dráhy.....	8
2.3 Diagnostika porúch metabolizmu sacharidov.....	12
2.4 Kvapalinová chromatografia v spojení s hmotnostnou spektrometriou.....	13
2.4.1 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia.....	13
2.4.2 Hmotnostná spektrometria	14
2.5 Validácia LC-MS/MS metódy	16
3 Experimentálna časť	18
3.1 Prístrojové vybavenie	18
3.2 Chemikálie.....	18
3.2.1 Štandardy	18
3.2.2 Interné štandardy.....	19
3.2.3 Biologický materiál.....	19
3.2.4 Ďalšie chemikálie.....	19
3.3 Metódy.....	20
3.3.1 Príprava zásobných roztokov štandardov	20
3.3.2 Príprava zmesi značených interných štandardov	20
3.3.3 Príprava mobilných fáz	20
3.3.4 Stanovenie validačných parametrov – správnosť, presnosť a carry-over	21
3.3.4.1 Príprava kalibračných kriviek	21
3.3.4.2 Príprava zmiešanej vzorky moču zdravých kontrol	21
3.3.4.3 Príprava vzoriek kontroly kvality (QC)	22
3.3.5 Príprava vzoriek zdravých kontrol a pacientov	23
3.3.6 Spracovanie získaných dát.....	24
3.3.7 LC-MS/MS analýza	24
4 Výsledky	25
4.1 Vyhodnotenie validačných parametrov.....	25
4.1.1 Správnosť	25
4.1.2 Presnosť	29

4.1.3 Carry-over	30
4.2 Analýza vzoriek zdravých kontrol a pacientov.....	32
5 Diskusia	36
6 Záver.....	39
7 Literatúra	40
8 Zoznam použitých symbolov a skratiek	48
9 Prílohy	52

Ciele práce

- Vypracovanie literárnej rešerše o doterajších poznatkoch diagnostiky dedičných metabolických porúch so zameraním na poruchy metabolizmu sacharidov.
- Vypracovanie literárnej rešerše o aktuálnom stave analýzy sacharidov a cukorných alkoholov v moči.
- Validácia LC-MS metódy.
- Aplikácia metódy: Príprava biologických vzoriek a ich LC-MS/MS analýza, vyhodnotenie a spracovanie výsledkov, interpretácia nameraných dát.

1 Úvod

Dedičné metabolické poruchy (DMP) sú genetické ochorenia, ktoré zasahujú do mnohých metabolických dráh organizmu. Prejavy ochorení sú veľmi variabilné od asymptomatických prípadov až po život ohrozujúce stavy (Blau et al., 2022). Jednou zo skupín DMP sú ochorenia metabolizmu sacharidov, medzi ktoré patrí aj ochorenie s názvom galaktosemia, ktoré vzniká narušením funkčnosti génu potrebného na syntézu enzýmov Leloirovej dráhy pre odbúravanie galaktózy (Coelho et al., 2015). Okrem ochorenia metabolizmu galaktózy do tejto skupiny radíme mnohé iné metabolické poruchy šesťuhlíkatých sacharidov, napríklad fruktózy, alebo taktiež narušenie fyziologického fungovania pentózafosfátovej dráhy.

Keďže mnohé ochorenia metabolizmu sacharidov sú život ohrozujúce, rýchla a správna diagnostika je kľúčová. Doposiaľ sú známe viaceré metódy delenia a identifikácie sacharidov v telových tekutinách, akou je napríklad moč, kde sa dané sacharidy vyskytujú v rôznych koncentráciách. Práve spojenie plynovej chromatografie s hmotnostnou spektrometriou (GC/MS) sa v mnohých laboratóriách používa na rutinné sledovanie cukrov a cukorných alkoholov v moči. Ide o techniku s vysokou citlivosťou, ktorá dokáže odseparovať aj jednotlivé izoméne formy sacharidov (Kuhara, 2005). Príkladom staršej metódy na stanovenie sacharidov je tenkovrstvová chromatografia (TLC), ktorá sa už v dnešnej dobe používa minimálne (Young & Jackson, 1970).

V snahe zefektívniť diagnostiku boli vyvinuté mnohé metódy kvapalinovej chromatografie s tandemovou hmotnostnou spektrometriou (LC-MS/MS), ktoré sú charakteristické jednoduchou prípravou vzorky, nakoľko nepotrebujú špeciálnu a komplikovanú derivatizáciu vzorky (F. Li et al., 2022; M. M. C. Wamelink, Smith, et al., 2005). V rámci zjednodušenia a zrýchlenia diagnostiky galaktosemie a ďalších porúch metabolizmu sacharidov bola v Laboratóriu dedičných metabolických porúch (LDMP) vo Fakultnej nemocnici v Olomouci vyvinutá LC-MS/MS metóda pre analýzu vybraných cukrov a cukorných alkoholov v moči. Cieľom tejto práce bolo previesť čiastočnú validáciu metódy, teda stanoviť správnosť, presnosť a carry-over vybraných analytov. Metóda bola následne aplikovaná na vzorky zdravých jedincov a pacientov suspektných na DMP.

2 Teoretická časť

2.1 Dedičné metabolické poruchy

Dedičné metabolické poruchy (DMP) sú ochorenia, ktorých spoločným znakom je mutácia génov kódujúcich vznik proteínov potrebných pre správne fungovanie metabolizmu (Guo et al., 2023). Na vznik nového funkčného proteínu je potrebný prepis nukleotidovej sekvencie z génu do mRNA a následná translácia do formy polypeptidu, ktorý neskôr podlieha posttranslačným modifikáciám. Mutácia génu môže ovplyvniť jednotlivé kroky syntézy proteínu a jeden z najčastejších dôsledkov zmeny syntézy je strata funkcie daného proteínu (Nussbaum et al., 2007).

Funkčné jednotky ľudského organizmu, ako sú enzýmy a membránové transportéry, majú proteínový charakter. Enzýmy majú funkciu biokatalyzátorov, ktoré sú neodlúčiteľnou časťou všetkých metabolických dráh organizmu. Pri strate ich funkcie dochádza buď k nedostatočnej tvorbe produktu enzymatickej reakcie, akumulácii toxického substrátu, alebo k premene substrátu alternatívnou dráhou (Ferreira & van Karnebeek, 2019).

Klinické príznaky ochorení sa prejavujú väčšinou krátko po narodení a po konzumácii stravy (kojenie a následné zaradenie rôznych potravín). Príznaky sú vo veľkej miere nešpecifické (bolesť brucha, nevoľnosť, zlyhávanie pečene, arytmia, neurologické problémy), čo lekárom sťažuje diagnostiku DMP. Pre zabránenie trvalých následkov je však správna a rýchla diagnostika ochorenia úplne nevyhnutná (Balakrishnan, 2021).

Na vyhľadanie DMP slúži novorodenecký skrining (NS), vďaka ktorému môže byť ochorenie odhalené vo veľmi skorom štádiu. Skorou a správnou liečbou môže byť zahájená terapia, ktorá odvráti nevratné poškodenie zdravia dieťaťa. V Českej republike sa v rámci NS vyšetruje 18 dedičných metabolických ochorení (<https://www.novorozeneckyscreening.cz/ov-co-je-novorozenecky-screening>).

V súčasnosti je známych >1890 DMP (<http://www.iembase.org/>), ktoré sú rozdelené do 24 kategórií podľa metabolickej dráhy, akej sú súčasťou. Kategórie zahŕňajú poruchy metabolizmu základných biomolekúl ako aminokyselín, lipidov, sacharidov a peptidov, ako aj poruchy intermediárneho metabolizmu a iných biologicky významných molekúl (Ferreira et al., 2021).

DMP sú individuálne zriedkavé ochorenia, avšak súhrnne sú zodpovedné za veľký počet detských postihnutí a úmrtí (Ezgu, 2016). Globálna incidencia DMP je nízka a to 1:10 000.

Vzhľadom na nedostatočnú diagnostiku sú DMP príčinou vysokej miery úmrtnosti najmä detí pod päť rokov (Waters et al., 2018).

Prenos DMP je zväčša autozomálne recesívny, avšak sú známe aj autozomálne dominantné ochorenia, ako aj viazané na X chromozóm (Tebani et al., 2016).

Liečba DMP závisí na konkrétnom ochorení, avšak vo všeobecnosti platí vylúčenie substrátu zo stravy, ktorý nie je možné metabolicky spracovať, ako napríklad pri ochorení galaktosemia, kde je jediná súčasná liečba vo forme bezgalaktózovej diéty (Delnoy et al., 2021).

2.2 Dedičné poruchy metabolizmu sacharidov

Dedičné metabolické ochorenia sacharidov predstavujú významnú skupinu genetických ochorení, ktoré ovplyvňujú schopnosť organizmu metabolizovať sacharidy. Tieto molekuly sú významná zložka stravy, ktorá je pre telo nevyhnutná ako zdroj energie. Medzi DMP sacharidov sa radia poruchy metabolizmu galaktózy (napr. galaktosemia), metabolizmu fruktózy (napr. fruktosuria), syntézy a degradácie glykogénu (glykogenózy), pentózafosfátovej dráhy (napr. pentosuria), transportu glukózy, glykosylácie a mukopolysacharidózy (Blau et al., 2022).

DMP sacharidov sú charakteristické variabilnými klinickými príznakmi. Patria medzi ne poruchy vývojového a neurologického charakteru, hypoglykémia a rôzne disfunkcie pečene (Witters et al., 2021). Zároveň je typickým znakom ochorení akumulácia sacharidov a cukorných alkoholov v telových tekutinách, konkrétne v krvi a moči, ktoré môžu slúžiť k diagnostike DMP pomocou kvapalinovej/plynovej chromatografie (LC/GC) v spojení s hmotnostnou spektrometriou (MS) (Yi-Yung Hsia, 1961; M. M. C. Wamelink; Smith, et al., 2005; Yager et al., 2006).

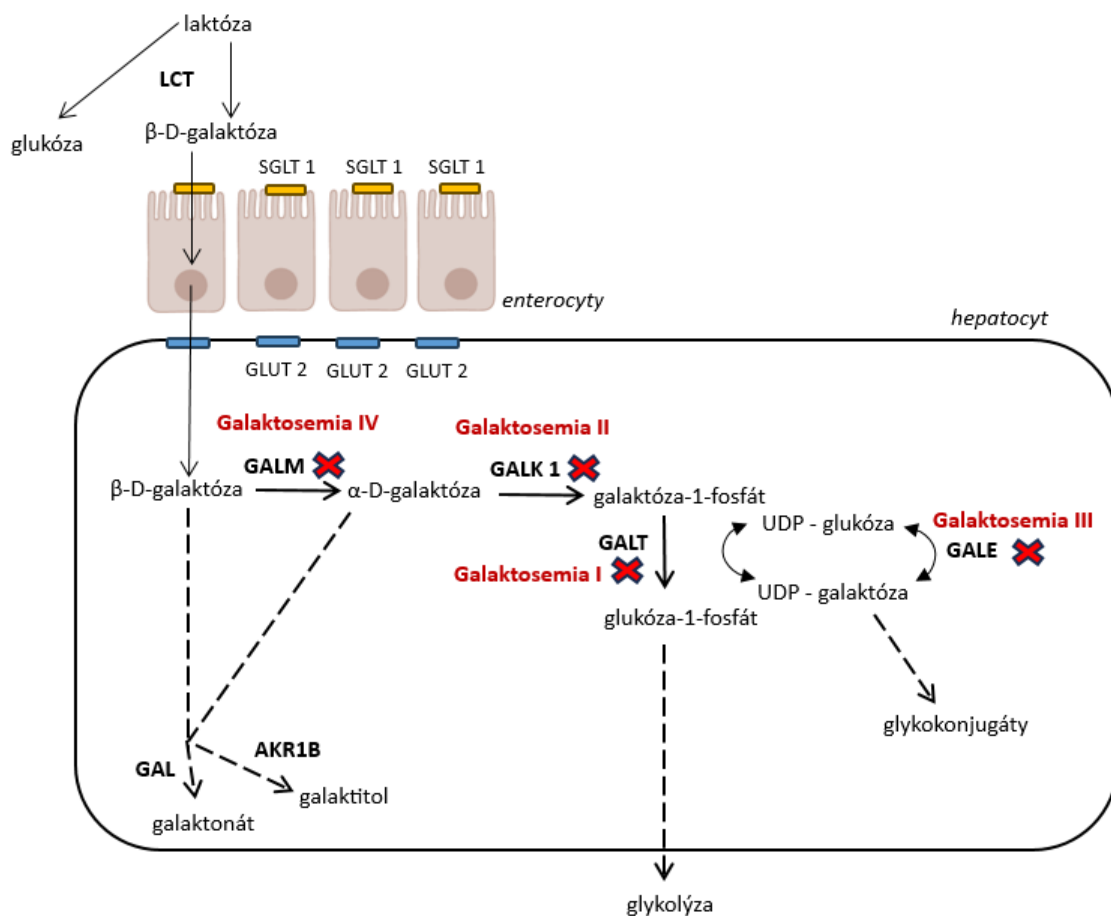
2.2.1 Poruchy metabolizmu galaktózy

Galaktóza je monosacharid, ktorý spoločne s glukózou tvorí disacharid laktózu – inak nazývaný mliečny cukor. Laktóza je najvýznamnejší sacharid v mlieku cicavcov, čím s ním prichádza ľudský organizmus do kontaktu od narodenia. Galaktóza sa v organizme bežne vyskytuje, pričom plní okrem energetickej funkcie aj funkciu stavebnú, nakoľko je súčasťou mnohých glykolipidov a glykoproteínov (Coelho et al., 2015).

Po vstupe galaktózy do gastrointestinálneho traktu, väčšinou vo forme laktózy, je jej vstrebávanie v tenkom čreve zabezpečené enterocytni, pomocou aktívnych sodno-glukózových transportérov SGLT1. Následne sa krvným obehom dostáva do hepatocytov, kde je prenesená pomocou transportérov GLUT2. V pečeni je galaktóza premieňaná na glukózu, ktorú organizmus dokáže energeticky využiť (Demirbas et al., 2018).

Galaktóza sa degraduje metabolickou dráhou s názvom Leloirova dráha. V tejto dráhe sa pomocou troch enzýmov degraduje molekula galaktózy až na aktivovanú molekulu glukózy, alebo sa tvoria glykoproteíny a glykolipidy (Nyhan & Hoffmann, 2020). Prvý krok Leloirovej dráhy nastáva až po nevyhnutnej premene β -galaktózy na α -galaktózu, ktorá je katalyzovaná aldóza-1-epimerázou (galaktomutarotáza, GALM, EC 5.1.3.3) (Succoio et al., 2022). Vzniknutá α -galaktóza vstupuje do prvej enzymatickej reakcie Leloirovej dráhy za účasti ATP:D-galaktóza-1-fosfotransferázy (galaktokináza, GALK1, EC 2.7.1.6), ktorá katalyzuje jej premenu na galaktózu-1-fosfát. Táto fosforylovaná galaktóza je UTP: α -D-hexóza-1-fosfáturidylyltransferázou (urydylyltransferáza, GALT, EC 2.7.7.10) premenená na glukózu-1-fosfát. Pri tejto reakcii vzniká ako vedľajší produkt reakcie aj UDP-galaktóza z UDP-glukózy (Timson, 2016). V poslednom kroku je UDP-galaktóza premenená pomocou UDP-galaktóza-4-epimerázy (GALE, EC 5.1.3.2) na UDP-glukózu (Nyhan & Hoffmann, 2020).

Správne odbúranie galaktózy je závislé na všetkých štyroch enzýmoch. Akonáhle dôjde k defektu jedného z nich a metabolická dráha je narušená, dochádza k vzniku ochorenia s názvom galaktosemia (Obr. 1). Na základe defektného enzýmu sa rozlišujú 4 typy galaktosemií (Badiu Tişa et al., 2023).



Obr. 1: Schéma metabolizmu galaktózy s vyznačením defektných enzýmov (čierné, tučne) príslušných DMP (červene) a alternatívne dráhy metabolizovania galaktózy (prevzaté a upravené z Blau et al., 2022, Succio et al., 2022). Skratky enzýmov: AKR1B, aldózareduktáza; GAL, galaktózadehydrogenáza; GALE, UDP-galaktóza-4-epimeráza; GALK 1, galaktokináza; GALT, uridylyltransferáza

Ak je normálne fungovanie Leloirovej dráhy narušené, galaktóza sa odbúrava tzv. alternatívnymi metabolickými dráhami. Jedna z možností je redukčná dráha galaktózy, v ktorej vzniká galaktitol pomocou enzýmu NAD(P)⁺ 1-oxidoreduktázy (aldózareduktáza, AKR1B, EC 1.1.1.21) (Coelho et al., 2017). Galaktitol sa ďalej nedokáže odbúrať a je vylučovaný močom, avšak hromadí sa aj v bunkách, kde pôsobí toxicky. V bunkách šošovky pôsobí hyperosmoticky, čím vtáhuje do bunky vodu a spôsobuje katarakt. V bunkách tkanív ako je mozog spôsobuje prítomnosť galaktitolu opuch, čo môže viesť ku smrti (Lai & Klapa, 2004).

Ďalšou alternatívnou cestou odbúravania galaktózy je jej premena na galaktonát v oxidačnej dráhe. Na oxidácii galaktózy sa podieľa enzým D-galaktóza:NAD⁺ 1-oxidoreduktáza (galaktózadehydrogenáza, GAL, EC 1.1.1.48). Vzniknutý galaktonát môže

byť následne vylúčený z tela močom alebo vstupuje do pentózafosfátovej dráhy, kde prebieha dekarboxylácia za vzniku xylulózy (Wehrli et al., 1997).

Klinické príznaky všetkých typov galaktosemií majú spoločné znaky ako je katarakt a zvýšená hladina galaktózy a galaktitolu v krvi a v moči. Špecifické príznaky sa líšia medzi jednotlivými mutáciami génov (Timson, 2006). Liečba na galaktosemiu pozostáva výhradne z bezgalaktózovej diéty. Zamedzenie prístupu galaktózy do organizmu znamená bezprostredné vylúčenie laktózy zo stravy (Delnoy et al., 2021).

2.2.2 Poruchy metabolizmu fruktózy

Fruktóza je monosacharid, ktorý je bežne prijímaný do organizmu v strave, či už vo voľnej forme v ovocí a mede, alebo vo forme disacharidu sacharózy spolu s molekulou glukózy. Podobne ako glukóza a galaktóza, fruktóza prispieva k zisku energie vo forme ATP alebo je účastná na tvorbe glykogénu a tukového tkaniva po jej metabolickom spracovaní na fosforylovanú glukózu. Odbúravanie tohto monosacharidu prebieha prevažne v bunkách pečene, obličiek a tenkého čreva, do ktorých sa dostáva cez membránu GLUT5 transportérmi (Tran, 2017, Hannou et al., 2018).

Metabolizmus fruktózy je podmienený kaskádou troch enzýmových reakcií, ktoré postupne premieňajú fruktózu na triózafosfát, ktorý je pridaný do triózafosfátového poolu v bunke. V prvom kroku dochádza k ireverzibilnej fosforylácii fruktózy, ktorú sprostredkúva ATP:D-fruktóza-1-fosfotransferáza (ketoheksokináza, KHK, EC 2.7.1.3) (Herman & Birnbaum, 2021). Fruktóza-1-fosfát (Fru-1-P) je ďalej premenená D-fruktóza-1,6-bisfosfát-D-glyceraldehyd-3-fosfátlyázou (aldolázou B, ALDOB, EC 4.1.2.13) na triózafosfáty, konkrétne glyceraldehyd a dihydroxyacetonfosfát (dihydroxyaceton-P), pričom glyceraldehyd je ďalej fosforylovaný pomocou ATP:D-glyceraldehyd-3-fosfotransferázy (triokináza, TKFC, EC 2.7.1.28). Fosforylovaný glyceraldehyd-3-fosfát (glyceraldehyd-3-P) môže vstupovať do glykolýzy a cez pyruvát vstupovať do Kresbovho cyklu, kde prispieva k zisku energie, alebo sa môže zúčastniť syntézy glykogénu (Tappy & Rosset, 2017).

Iná dráha odbúrania fruktózy vedie cez fosforyláciu ketoheksokinázou a následnú druhú fosforyláciu ATP:D-fruktóza-fosfát-6-fosfotransferázou (1-fosfruktokináza, FRUK, EC 2.7.1.56), pričom vzniká molekula fruktóza-1,6-bisfosfát (Fru-1,6-bisP), ktorá je známym medziproduktom metabolickej dráhy glykolýzy. Táto molekula sa premieňa D-fruktóza-1,6-bisfosfát-1-fosfohydrolázou (fruktóza-1,6-bisfosfatáza, FBP, EC 3.1.3.11) na fruktózu-6-fosfát

Druhým ochorením je dedičná intolerancia fruktózy (z angl. *hereditary fructose intolerance* HFI), ktorá vzniká v dôsledku deficitu aldolázy B (ALDOB, EC 4.1.2.13). Akumulácia Fru-1-P spôsobuje zastavenie glukoneogenézy, čo znamená inhibíciu produkcie glukózy. Vysoká koncentrácia Fru-1-P taktiež spôsobuje pozastavenie glykogenolýzy, čo má za následok zníženie koncentrácie glukózy v krvi (Yasawy et al., 2009). Klinické príznaky sa neprejavujú u novorodencov, nakoľko materské mlieko neobsahuje fruktózu. Zaradením fruktózy do stravy nastupujú aj klinické príznaky ako zvracanie, hypoglykémia a pri vyššej koncentrácii fruktózy v strave aj letargia až kóma. Pri tomto ochorení je prítomná zvýšená koncentrácia fruktózy v moči (Ali et al., 1998).

Poslednou známou poruchou je deficit fruktóza-1,6-bisfosfatázy (FBP-D), pričom daný enzým má za fyziologických podmienok významnú funkciu v defosforylácií Fru-1,6-bisP na Fru-6-P. Tento produkt enzýmovej reakcie je ďalej premieňaný v metabolickej dráhe glukoneogenézy na glukózu (Yi & Xie, 2022). Prvé symptómy sa rozvíjajú po zaradení jedál obsahujúcich fruktózu do stravy. Klinické symptómy môžu byť nešpecifické ako napríklad bolesť brucha, avšak môžu prerásť do závažných život ohrozujúcich stavov ako je hypoglykémia a následne kóma z fibrilných kŕčov (N. Li et al., 2017). Obzvlášť závažné klinické príznaky sú pozorované u novorodencov, nakoľko nemajú dostatočnú zásobu glykogénu a nediagnostikované ochorenie môže končiť smrťou (Lebigot et al., 2015).

2.2.3 Poruchy pentózafosfátovej dráhy

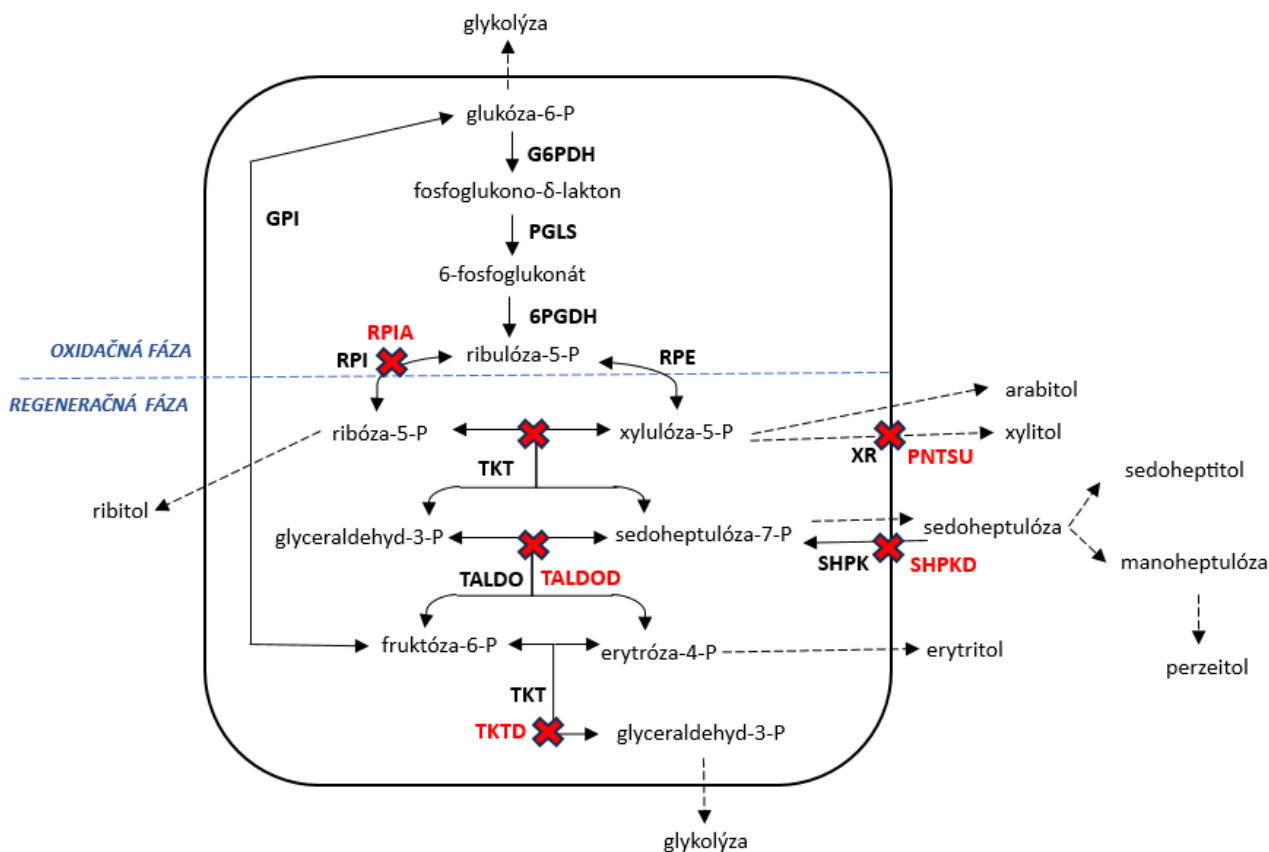
Pentózafosfátová dráha (PPD) je alternatívnou dráhou spracovania glukózy. Vo väčšine buniek je glukóza metabolizovaná glykolýzou. Odhaduje sa, že len 10-20% glukózy je metabolizovaných pomocou PPD. Táto dráha nie je závislá na prítomnosti kyslíka, no taktiež netvorí energiu vo forme ATP. Jej hlavnými funkciami je produkcia redukovaného kofaktora NADPH pre anabolické reakcie a syntéza ribóza-5-fosfátu (ribóza-5-P), ktorý je potrebný na tvorbu nukleotidov a nukleovej kyseliny (Wamelink et al., 2008). Lokalizácia PPD je v cytosole, kde je vysoká spotreba NADPH pre syntézu mastných kyselín.

PPD má dve časti a to oxidačnú (dehydrogenačnú) a regeneračnú. V oxidačnej fázy dochádza k vzniku ribulózy-5-fosfátu (ribulóza-5-P) sledom troch enzymatických reakcií. V prvej z nich dochádza k dehydrogenácii glukóza-6-fosfátu (glukóza-6-P) za vzniku 6-fosfoglukono- δ -laktonu pomocou D-glukóza-6-fosfát:NADP⁺-1-oxidoreduktázy (glukóza-6-fosfátdehydrogenáza, G6PDH, EC 1.1.1.49). Nasleduje spontánna premena

reaktívneho glukonolaktonu na 6-fosfoglukonát za účasti 6-fosfo-D-glukono-1,5-laktonhydrolázy (glukonolaktonáza, PGLS, EC 3.1.1.31). Posledným krokom oxidačnej fázy je vznik produktu ribulóza-5-P za pomoci 6-fosfo-D-glukonát:NADP⁺ 2-oxidoreduktázy (6-fosfoglukonátdehydrogenáza, 6PGDH, EC 1.1.1.44). Cieľom oxidačnej fázy je tvorba redukovaných kofaktorov NADPH a ribulózy-5-P (Kodíček et al., 2022).

Prvé kroky regeneračnej fázy zahŕňajú dva enzýmy: D-ribulózu-5-fosfát-3-epimerázu (ribulóza-5-fosfát-3-epimeráza, RPE, EC 5.1.3.1) a D-ribóza-5-fosfát-aldóza-ketóza-izomerázu (ribóza-5-fosfát-izomeráza, RPI, EC 5.3.1.6), ktoré izomerizujú ribulózu-5-P za vzniku pentóz ribóza-5-P a xylulóza-5-fosfátu (xylulóza-5-P). Následne sú tieto päťuhlíkaté cukry metabolizované enzýmami sedoheptulóza-7-fosfát:D-glyceraldehyd-3-fosfátglykolaldehydtransferázou (transketolázou, TKT, EC 2.2.1.1) a sedoheptulóza-7-fosfát:D-glyceraldehyd-3-fosfát-glycerontransferáza (transaldolázou, TALDO, EC 2.2.1.2) za vzniku erytróza-4-fosfátu (erytróza-4-P) a fruktóza-6-fosfátu (fruktóza-6-P) (Wamelink et al., 2005). Hlavnou metabolickou úlohou PPD je produkcia ribózy-5-P ako základnej štruktúry RNA molekuly a erytrózy-4-P ako prekursora syntézy aromatických aminokyselín. Neoxidačná časť PPD je prepojená s metabolickou dráhou glykolýzy cez viaceré produkty ako fruktózu-6-P a glyceraldehyd-3-P (Grochowski et al., 2005) (Obr. 3).

Bolo zistené, že bunky nepotrebujú na prežitie väčšinu enzýmov PPD okrem ribóza-5-fosfát izomerázy (RPI, EC 5.3.1.6). Ak však organizmu chýba funkcia enzýmov G6PDH (EC 1.1.1.49), 6PGDH (EC 1.1.1.44), TALDO (EC 2.2.1.2), TKT (EC 2.2.1.1) a RPI (EC 5.3.1.6), XR (EC 1.1.1.9) vedie to k závažným metabolickým ochoreniam (Obr. 3) (Stincione et al., 2015).



Obr. 3: Schéma pentózafosfátovej dráhy s vyznačením defektných enzýmov (čierne, tučne) príslušných DMP (červene) a vznikajúce diagnosticky špecifické metabolity indukujúce DMP (prevzaté a upravené z Blau et al., 2022, Shayota et al., 2020). Skratky enzýmov a DMP: G6PDH, glukóza-6-fosfátdehydrogenáza; GPI, glukóza-6-fosfát-izomeráza; 6PGDH, 6-fosfogluconátdehydrogenáza; PGLS, glukonolaktonáza; PNTSU, pentosuria; RPE, ribulóza-5-fosfát-3-epimeráza; RPI, ribóza-5-fosfát-izomeráza; RPIA, deficit ribóza-5-fosfát-izomerázy; SHPKD, deficit sedoheptulóza-kinázy; TALDO, transaldoláza; TALDOD, deficit transaldolázy; TKT, transketoláza; TKTD, deficit transketolázy; XR, 1- xylulózareduktáza

Jedným zo vzácnych ochorení PPD je deficit ribóza-5-fosfát-isomerázy (RPIA, EC 5.3.1.6). Pri tomto ochorení sa v telesných tekutinách akumulujú pentitoly ribitol a arabitol. Úplná nefunkčnosť enzýmu je smrteľná, pričom pri novorodencoch nie je vždy *post mortem* odhalená ako príčina úmrtia. Čiastočný deficit enzýmu sa môže prejavovať neurologickými problémami ako je napr. leukoencefalopatia (Huck et al., 2004; M. M. C. Wamelink et al., 2010; M. M. C. Wamelink et al., 2008).

Deficit transaldolázy (TALDOD, EC 2.2.1.2) sa prejavuje veľkou variabilitou symptómov. Pre novorodencov je charakteristická hepatosplenomegália, krvácavé stavy a abnormálne funkcie pečene (LeDuc et al., 2014). Toto ochorenie je charakteristické

akumuláciou sacharidov sedoheptulózy, manoheptulózy a cukorných alkoholov erytritolu, arabitolu, ribitolu, sedoheptitolu a perseitolu v telových tekutinách (Engelke et al., 2010; Wamelink, Struys, et al., 2005).

Ďalším metabolickým ochorením je deficit transketolázy (TKTD, EC 2.2.1.1), ktoré sa prejavuje akumuláciou cukorných alkoholov erytritolu, arabitolu, ribitolu v krvi a moči. Medzi klinické príznaky patria srdečné poruchy a vývojové oneskorenia (Boyle et al., 2016).

Deficit ATP:sedoheptulóza-7-fosfotransferázy (seduheptulokináza, SHPKD, EC 2.7.1.14) je ochorenie, pri ktorom sa zvyšuje hladina erytritolu v telových tekutinách. Ten môže vznikáť z fosforylácie sedoheptulózy fruktokinázou (EC 2.7.1.4), ktorá je následne aldolázou B (EC 4.1.2.13) premenená na erytrózu, ktorej redukciou vzniká erytritol. Manifestácia ochorenia sa prejavuje veľmi odlišnými príznakmi, medzi ktoré patria napr. anémia a cholestáza u novorodencov (Kardon et al., 2008).

Pentosuria je ochorenie, ktoré je spôsobené deficitom v enzýme xylitol:NAD⁺-oxidoreduktáza (1-xylulózareduktáza, XR, EC 1.1.1.9). Prejavuje sa vylučovaním xylulózy v moči. Hromadenie xylulózy je spôsobené nefunkčnosťou enzýmu redukovať xylulózu na xylitol. Toto ochorenie je benígne bez závažných príznakov (Pierce et al., 2011). Pozornosť tomuto ochoreniu sa bola venovaná na začiatku 20. storočia, kedy diagnostické testy nerozlišovali medzi pentózami a hexózami, ako napríklad glukózou. Ochorenie bolo mnohokrát zamenené za diagnózu *Diabetes Mellitus*. Zámenou sa ľudia s pentosuriou liečili inzulínom, ktorý však spôsoboval hypoglykemický šok (Blau et al., 2022).

Arabinosuria je ďalšou poruchou metabolizmu cukrov a cukorných alkoholov. Močom vylučovaná arabinóza a arabitol sú charakteristickým znakom tohto ochorenia. Predpokladá sa, že zvýšené hladiny arabinózy môžu na mozog pôsobiť toxicky (Onkenhout et al., 2002). Táto DMP je pravdepodobne spôsobená deficitom L-arabinitol:NAD⁺-oxidoreduktázy (L-Arabitoldehydrogenázy, LADA, EC 1.1.1.12), avšak táto hypotéza stále nie je potvrdená.

Posledným metabolickým ochorením je deficit D-sorbitol:NADP⁺-oxidoreduktázy (sorbitoldehydrogenázy, SORD, EC 1.1.1.B60). Pri tomto enzymatickom defekte je znemožnená premena sorbitolu na fruktózu Polyolovou dráhou. Táto dráha pozostáva z dvoch krokov. Prvým krokom je redukcia glukózy na sorbitol pomocou alditol:NAD(P)⁺-1-oxidoreduktázy (aldolázareduktáza, AKR1B, EC 1.1.1.21), na ktorú nasleduje oxidácia sorbitolu na fruktózu sorbitoldehydrogenázou (EC 1.1.1.B60) (JEFFERY et al., 1984; Zhu et

al., 2023). Klinickým príznakom narušenia tejto dráhy je akumulácia sorbitolu v šošovkách, čo spôsobuje katarakt (Vetter & Shin, 1995).

2.3 Diagnostika porúch metabolizmu sacharidov

Sacharidy sú po chemickej stránke polyhydroxyaldehydy, polyhydroxyketony a polyhydroxyalkoholy. Ako z názvu vyplýva, sú to molekuly, ktoré obsahujú aldehydickú alebo keto skupinu a rôzny počet hydroxyskupín. Charakteristické vlastnosti vyplývajúce zo štruktúry molekúl, akými sú chiralita – prítomnosť viacerých asymetrických centier, vznik enantiomerov a diastereoizomérov, prispievajú k ich obtiažnej analýze. Rôzne izoformy sacharidov majú rovnaké vlastnosti ako polaritu a molekulovú hmotnosť, na základe ktorých ich nedokážeme jednoducho separovať (Niaz et al., 2020).

Jednou z prvých techník, ktoré dokázali separovať sacharidy bola v roku 1946 papierová chromatografia PC (z angl. *paper chromatography*). Prvé použitie papierovej chromatografie naštartovalo štúdium zamerané na štruktúru a metabolizmus sacharidov (Kowkabany, 1953).

V roku 1961 začalo skúmanie tenkovrstvovej chromatografie TLC (z angl. *thin-layer chromatography*) ako ďalšej novej separačnej techniky sacharidov. Časom sa táto chromatografická technika zlepšovala, až sa z nej stala metóda na rutinné stanovenie sacharidov v moči. TLC dokáže rutinne otestovať prítomnosť glukózy, galaktózy, fruktózy a laktózy (de Hoffmann & Stroobant, 2007; Ovodov et al., 1966).

Vzhľadom k tomu, že stanovenie jednoduchých monosacharidov a disacharidov nestačilo k diagnostike DMP sacharidov, bolo cieľom vyvinúť metódy, ktoré by dokázali stanoviť širšie spektrum sacharidov a cukorných alkoholov v moči (de Hoffmann & Stroobant, 2007). K tomu bola v roku 1991 využitá technika plynovej chromatografie, ktorá sa vyznačuje vysokou citlivosťou, rozlíšením a jednoduchým spojením s detekčnými technikami ako napríklad MS (z angl. *mass spectrometry*) (Shoemaker et al., 1991). Nevýhodou tejto techniky je nutnosť derivatizácie vzorky, aby sa dosiahla prchavosť a nižšia polarita vzorky. Derivatizácia sacharidov nie je jednoduchý proces, nakoľko ich molekuly obsahujú veľké množstvo funkčných skupín a vysoký podiel tautomérnych foriem, ktoré tvoria zložité chromatogramy. Derivatizácia má viaceré nevýhody a preto je postupne GC nahradzovaná LC. Medzi nevýhody GC patrí vyššia časová náročnosť predúpravy vzorky, väčší objem vzorky,

výber vhodných derivatizačných činidiel, cena činidiel a rôzna extrakčná účinnosť (Ruiz-Matute et al., 2011, Bayona et al., 2012).

V posledných rokoch sa výrazne uprednostňuje technika kvapalinovej chromatografie v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou LC-MS/MS (z angl. *liquid chromatography/mass spectrometry*). Jedným z dôvodov jej častej aplikácie pre diagnostiku DMP je vysoká selektivita a citlivosť metódy. Práve v roku 2005 Wamelink et al. vyvinuli 2 nové LC-MS/MS metódy pre stanovenie vybraných sacharidov a cukorných alkoholov v moči. Jedna z vyvinutých metód dokázala separovať aj rôzne izoméry sacharidov a sacharidových alkoholov (M. M. C. Wamelink, Smith, et al., 2005). Pomocou nových LC-MS/MS metód boli identifikované nové biomarkery heptóz a heptitolov ako je seduheptulóza, manoheptulóza, sedoheptitol, perzeitol v moči a okrem toho bolo identifikované nové metabolické ochorenie - TALDO deficit (M. M. Wamelink et al., 2007).

2.4 Kvapalinová chromatografia v spojení s hmotnostnou spektrometriou

2.4.1 Vysokoúčinná kvapalinová chromatografia

Jednou z najrozšírenejších separačných techník v laboratóriách je vysokoúčinná kvapalinová chromatografia HPLC (z angl. *high pressure liquid chromatography*). Jedná sa o techniku, ktorá sa používa na separáciu malých molekúl, no taktiež aj biomakromolekúl (Manz et al., 2015; Oliver, 1998). Táto technika umožňuje rozdeliť zložky v zmesi medzi stacionárnu (chromatografická kolóna) a mobilnú fázu. Vysoký tlak zaisťuje optimálnu účinnosť a rýchlosť separácie látok (Pingoud et al., 2002).

Systém HPLC pozostáva z dávkovača mobilných fáz (pohyblivá fáza) vo forme púmp, ktoré vodnú a organickú fázu nanášajú na kolónu podľa požadovaného pomeru. Vzorka je pomocou autosamplera nastrieknutá do mobilnej fázy, ktorá ju unáša cez stacionárnu fázu (nepohyblivú). Stacionárna fáza je buď tuhá látka alebo kvapalina ukotvená na nosiči, ktorá je umiestnená v chromatografickej kolóne. Mobilná fáza, pri chromatografickom delení, preteká cez stacionárnu fázu a dochádza k opakovanému ustáľovaniu fázovej rovnováhy delených látok medzi pohyblivú a nepohyblivú fázu, na základe rôznej sily interakcií zložiek zmesi s časticami stacionárnej fázy. Týmto princípom dochádza k rôznej sile zadržovania látok v chromatografickej kolóne a tým majú separované látky rozdielny elučný čas (Nováková et al., 2013). Postupnú elúciu látok z kolóny zaznamenáva detektor. V súčasnosti existuje rada detektorov ako napríklad UV detektor, ktorý je vhodný na analýzu peptidov a proteínov, no

výrazne vstupuje do popredia hmotnostný spektrometer (MS). Výsledkom analýzy je chromatogram, kde pozorujeme výšku intenzity signálu závislú na retenčnom čase (Manz et al., 2015; Pingoud et al., 2002).

Na základe fyzikálnych princípov separácie existuje niekoľko druhov LC. Základnou formou LC je chromatografia s normálnou fázou NP-LC (z angl. *normal phase liquid chromatography*). Pri NP-LC je mobilná fáza menej polárna ako stacionárna fáza, čo má za následok silné zadržanie polárnych molekúl v stacionárnej fáze a elúciu nepolárnych látok prvých z kolóny. Príkladom nepolárnej mobilnej fázy je hexán alebo chloroform. Jednou z výhod NP-LC je možnosť separácie izomérov, čo využíva farmaceutický priemysel (Abbott, 1980). Druhou možnosťou je chromatografia s reverznou fázou RP-LC (z angl. *reversed phase liquid chromatography*), ktorá sa využíva pre analýzu malých biomolekúl rozpustných v polárnych rozpúšťadlách akými sú voda a acetonitril. Stacionárna fáza v RP-LC pozostáva z nepolárnych alkylových reťazcov ($C_2 - C_{18}$) a mobilnú fázu tvoria polárne rozpúšťadlá ako methanol a acetonitril (Blum, 2014; Manz et al., 2015). Inou formou chromatografickej separácie je hydrofilná interakčná kvapalinová chromatografia HILIC (z angl. *hydrophilic interaction liquid chromatography*), ktorá slúži k separácii polárnych, nenabitých hydrofilných látok. V tejto separácii je stacionárna fáza hydrofilná a mobilná fáza je čiastočne hydrofóbná, pričom elučné činidlo je tvorené vodnými roztokmi. Mechanizmus tejto techniky je založený na vzniku difúznej vrstvy medzi polárnou časťou stacionárnej fázy. Túto vrstvu tvoria molekuly vody, ktoré tvoria gradient smerom do mobilnej fázy. Táto metóda separácie má mnoho výhod medzi ktoré patrí veľmi dobrá retencia pre polárne látky a taktiež vyššie prietokové rýchlosti mobilnej fázy, nakoľko obsahuje vysoký pomer organickej zložky, väčšinou acetonitrilu (Buszewski & Noga, 2012; Oliver, 1998; Nováková et al., 2013).

2.4.2 Hmotnostná spektrometria

Za najviac rozvíjajúcu sa techniku analytickej chémie sa považuje hmotnostná spektrometria (z angl. *mass spectrometry*), ktorej hlavnou funkciou je rozdelenie nabitých častíc na základe pomeru ich hmotnosti a náboja (m/z) pomocou elektrického a magnetického pola vo vákuu. Jedná sa o veľmi citlivú a presnú techniku, ktorá má využitie v kvalitatívnej a kvantitatívnej analýze širokého spektra molekúl. Okrem informácii o prítomnosti a množstve analytu, táto metóda dokáže určiť štruktúru a čistotu látok (Pingoud et al., 2002).

MS má tri základné časti, pričom prvou z nich tvorí iónový zdroj, ktorého funkcia je produkcia nabitých častíc v plynnej fázy. V iónovom zdroji dochádza k vzniku molekulárnych iónov z neutrálnych molekúl a môže taktiež dochádzať k fragmentácii nabitých častíc. Existuje veľké množstvo ionizačných techník, ktoré sú pre metódu vyberané na základe chemických vlastností analyzovaných látok ako je prchavosť látky, tepelná stabilita a iné. Vo všeobecnosti rozdeľujeme ionizačné techniky podľa množstva energie potrebnej pre ionizáciu na mäkké a tvrdé ionizačné techniky. Medzi tvrdé ionizačné techniky patrí elektrónová ionizácia (EI), pri ktorej ióny podliehajú fragmentácii. Mäkké ionizačné techniky ako chemická ionizácia (CI), ionizácia za atmosférického tlaku (APCI), ionizácia elektrosprejom (ESI) a laserová desorpčná ionizácia s pomocou matrice (MALDI), naopak väčšinu iónov nefragmentujú (de Hoffmann & Stroobant, 2007; Friedecký D & Lemr K, 2012).

Druhá časť MS je hmotnostný analyzátor, v ktorom dochádza k separácii vzniknutých iónov na základe pomeru hmotnosti a náboja. Rozlišujeme niekoľko typov hmotnostných analyzátorov ako je elektrický sektorový analyzátor, magnetický sektorový analyzátor, analyzátor doby letu, lineárny kvadrupol, lineárna kvadrupolová pasca, iónová pasca a orbitrap. Jednotlivé typy využívajú rôzne fyzikálne-chemické princípy na separáciu iónov ako je napr. kinetická energia, momentum, rýchlosť, frekvencia rezonancie či stabilita trajektórie. (Manz et al., 2015).

Jedným z najčastejšie používaných hmotnostných skenujúcich analyzátorov je kvadrupolový analyzátor. Skladá sa zo štyroch paralelných kovových elektród, ktorými prechádza jednosmerný a striedavý prúd. Na základe zvoleného prúdu je umožnený oscilačný prechod vybraných iónov. Kvadrupol je považovaný za jednoducho ovládateľný, robustný a cenovo dostupný hmotnostný analyzátor (Manz et al., 2015).

V súčasnej dobe je pre svoju vysokú citlivosť a selektivitu uplatňovaná tandemová hmotnostná spektrometria (MS/MS), ktorá využíva spojenie dvoch alebo viacerých hmotnostných analyzátorov. Prvý hmotnostný analyzátor vyberá produktové ióny (Q1), druhý dané ióny fragmentuje (kolízna cela, Q2) a tretí analyzuje dcérske ióny (Q3).. Výhoda tejto techniky je identifikácia látok nie len na základe ich hmotnosti, ale aj na základe fragmentačných častí, ktoré určujú štruktúru molekuly. Práve táto vlastnosť metódy sa využíva pri identifikácii zlúčenín, ktoré majú rovnakú hmotnosť a podobné chemické chovanie. MS/MS má široké uplatnenie vo farmaceutickom priemysle pri vývoji liečiv a v klinických laboratóriách na diagnostiku DMP (Pingoud et al., 2002; Sadílek, 2020).

Tretou časťou MS je detektor, ktorý je schopný z iónov, prechádzajúcich z hmotnostného analyzátora generovať elektrický prúd, a ten je úmerný ich množstvu. Detekcia je založená na ich náboji, hmotnosti a rýchlosti. V dnešnej dobe je známe viacero typov detektorov, ktoré si užívateľ vyberá na základe analytickej aplikácie. Výsledkom analýzy na hmotnostnom spektrometri je hmotnostné spektrum, na ktorom je viditeľná závislosť intenzity signálu na pomere hmotnosti a náboja (m/z) (Koppelaar et al., 2005).

2.5 Validácia LC-MS/MS metódy

Každé klinické laboratórium musí používať také postupy merania, ktoré napĺňajú všetky požiadavky, ktoré sú na dané meranie stanovené. Validácia metódy je proces, ktorý preukazuje, že daný postup je vhodný pre zamýšľaný účel. Podľa normy ISO/IEC 17025 musí laboratórium validovať neštandardné metódy, metódy vyvinuté v laboratóriu a štandardné metódy používané mimo určený rozsah alebo inak upravené (Wille et al., 2022).

Pri validácii sa určujú validačné charakteristiky/parametre, ktoré určuje organizácia zaoberajúca sa validáciou analytických metód akými sú napríklad EMA (European Medicines Agency) alebo FDA (Food and Drug Administration) (Khamis et al., 2021). Pre chromatografickú metódu sú to parametre - selektivita, špecifita, matricové efekty, kalibračná priamka, linearita, kalibračný rozsah, pracovný rozsah, správnosť, prenosť, carry-over (prenos vzorky), integrita riedenia, stabilita a reprodukovateľnosť nástrekov (EMA, 2022).

Linearita je jedným z najdôležitejších validačných charakteristík, ktoré sú prvotne popisované. Ide o schopnosť danej metódy poskytovať výsledky meraní, ktoré sú priamo úmerné množstvu analytu vo vzorke v kalibračnom rozsahu. Túto úmernú závislosť môže popisovať kalibračná priamka. Táto grafická reprezentácia linearity vo forme priamky by mala obsahovať minimálne 6 kalibračných bodov, a mala by mať dostatočný rozsah na pokrytie meraných koncentrácií. Najnižšiu možnú koncentráciu vzorky, ktorú je metóda merania schopná zachytiť, nazývame detekčný limit LOD (z angl. *limit of detection*). Štatisticky významná je aj hodnota kvantitatívny limit LOQ (z angl. *limit of quantification*), ktorá označuje najnižšiu koncentráciu analytu, ktorú je možné kvantitatívne vyhodnotiť (EMA, 2022; Nováková & Douša, 2013).

Správnosť predstavuje mieru zhody medzi nameranými hodnotami a teoretickými/skutočnými hodnotami. Stanovenie tohto validačného parametru prebieha presne popísaným postupom určeným organizáciou. Pripravujú sa vzorky, ktoré obsahujú známe

množstvo analyzovanej látky - tzv. vzorky kontroly kvality QC (z angl. *quality control*). Tieto vzorky sú následne analyzované danou metódou a výsledky sú porovnávané s nominálnou hodnotou. QC vzorky by mali pokrývať celý kalibračný rozsah, preto sú merané na 4 koncentračných úrovniach: dolný limit kvantifikácie LLOQ (z angl. *lower limit of quantification*), nízke LQC (z angl. *low quality control*), stredné MQC (z angl. *middle quality control*) a vysoké HQC (z angl. *high quality control*). Validačný protokol podľa EMA definuje akceptačné kritériá, ktoré by mali jednotlivé QC vzorky spĺňať (EMA, 2022; Hanková, 2015).

Presnosť metódy udáva mieru zhody medzi vzájomne nezávislými výsledkami meraní. Tento parameter indikuje náhodné chyby a udáva sa vo forme smerodatnej odchýlky alebo variačného koeficientu (% CV). Presnosť sa môže analyzovať v rovnakom meraní ako správnosť a oba parametre sa podľa EMA stanovujú analýzou v jednom dni (*within-run*) a medzi dňami (*between-run*) (EMA, 2022; González et al., 2014).

Prenos vzorky (*carry-over*) je spôsobený prítomnosťou zvyškového množstva vzorky v stroji, ktorý môže následne kontaminovať nadchádzajúcu vzorku. Tento efekt významne negatívne ovplyvňuje iné validačné parametre ako presnosť a správnosť a mal by byť minimalizovaný. Zistenie prítomnosti tejto kontaminácie sa uskutočňuje pridaním slepej vzorky za vzorku s najvyššou koncentráciou kalibračného štandardu. *Carry-over* by nemal presiahnuť 20 % odozvy analytu (EMA, 2022; FDA, 2022).

3 Experimentálna časť

3.1 Prístrojové vybavenie

- Analytické váhy (Ohaus, Čína)
- Automatické pipety (Eppendorf, Nemecko)
- Hmotnostný spektrometer QTRAP 6500+ (Sciex, Framingham, MA, USA)
- Kvapalinový chromatograf Exion LC (Sciex, Framingham, MA, USA)
- Kolona Luna Omega 3 μm SUGAR 150 x 2,1 mm (Phenomenex, Torrance, USA)
- Vortex mixer (ARGO LAB MIX, Česká republika)
- Sklenené a plastové chemické nádoby
- Plastové špičky a viečka (Eppendorf, Nemecko)

3.2 Chemikálie

3.2.1 Štandardy

- Adonitol (Sigma-Aldrich, USA)
- D-(-)-Arabinóza (Sigma-Aldrich, USA)
- D-(-)-Fruktóza (Sigma-Aldrich, USA)
- D-(+)-Galaktóza (Sigma-Aldrich, Taliansko)
- D-(+)-Glukóza (Sigma-Aldrich, USA)
- D-Manoheptulóza (Sigma-Aldrich, Veľká Británia)
- D-Sorbitol (Sigma-Aldrich, Francúzsko)
- Erytritol (Sigma-Aldrich, USA)
- Galaktitol (Sigma-Aldrich, USA)
- Kreatinín (Sigma-Aldrich, USA)
- L-(-)-Arabitol (Sigma-Aldrich, USA)
- Sedoheptulóza (Sigma-Aldrich, USA)
- Xylulóza (Sigma-Aldrich, USA)

3.2.2 Interné štandardy

- D-Fruktóza- $^{13}\text{C}_6$ (Cambridge Isotope Laboratories, USA)
- D-Galaktitol- $^{13}\text{C}_6$ (Sigma-Aldrich, USA)
- D-Galaktóza- $^{13}\text{C}_6$ (Sigma-Aldrich, USA)
- D-Glukóza- D_7 (Sigma-Aldrich, USA)
- D-Ribóza- $^{13}\text{C}_5$ (TRC, Kanada)
- D-Sacharóza-glukóza- $^{13}\text{C}_6$ (TRC, Kanada)
- Kreatinín- D_3 (TRC, Kanada)

3.2.3 Biologický materiál

- 43 vzoriek moču zdravých kontrol a 1 vzorka moču pacienta (FN Olomouc)
- 15 vzoriek moču zdravých kontrol a 2 vzorky moču pacienta (Centrum dedičných metabolických porúch Národného ústavu detských chorôb v Bratislave)

3.2.4 Ďalšie chemikálie

- Sigmatrix močový diluent (Sigma-Aldrich, USA)
- Octan amónny (Sigma-Aldrich, Veľká Británia)
- Mravenčan amónny (Sigma-Aldrich, India)
- LC-MS voda (Fisher Chemicals, USA)
- LC-MS acetonitril (Biosolve, Francúzsko)
- LC-MS izopropanol (Biosolve, Francúzsko)

3.3 Metódy

3.3.1 Príprava zásobných roztokov štandardov

Pre prípravu zmesí kalibračných štandardov a QC vzoriek boli použité zásobné roztoky štandardov, ktoré mali koncentráciu 30 mM pre všetky analyty, okrem sedoheptulózy a xylulózy (20 mM). Zásobné roztoky v LC-MS vode boli skladované pri teplote -80°C.

3.3.2 Príprava zmesi značených interných štandardov

Pre prípravu zmesi značených interných štandardov (IS) boli použité zásobné roztoky, ktorých koncentrácia je uvedená v Tab. 1. Následne bola pripravená zmes 7 interných štandardov v LC-MS vode s výslednou koncentráciou štandardov 100 µM. Alikvóty tejto zmesi boli skladované pri teplote – 80 °C.

Tab. 1: Koncentrácia zásobných roztokov interných štandardov

Interný štandard	Zásobný roztok (mM)
Ribóza- ¹³ C ₅	30
Galaktóza- ¹³ C ₆	25
Glukóza-D ₇	20
Fruktóza- ¹³ C ₆	20
Sacharóza-glukóza- ¹³ C ₆	10
Galaktitol- ¹³ C ₆	13,3
Kreatinin-D ₃	52

3.3.3 Príprava mobilných fáz

Mobilná fáza A (MF A), 1 mM octan/mravenčan amónny, bola pripravená rozpustením 77,1 mg octanu amónneho a 63,1 mg mravenčanu amónneho v 1 l LC/MS vody. Mobilná fáza B (MF B) pozostávala z nasledujúcich zložiek: acetonitril, izopropanol, voda v pomere 90:5:5.

3.3.4 Stanovenie validačných parametrov – správnosť, presnosť a carry-over

3.3.4.1 Príprava kalibračných kriviek

Kalibračné krivky boli pripravené pre následnú kvantifikáciu analytov vo vzorkách kontroly kvality (QC), ktoré boli súčasťou stanovenia validačných parametrov ako je správnosť a presnosť. Ďalej bol pomocou ULOQ (horný limit kvantifikácie) vyhodnotený carry-over. Kalibračný rozsah kriviek, ich príprava a ďalšie informácie k linearite metódy boli prevzaté z práce Freitagovej (2023). 10 bodové kalibračné rady boli pripravené binárnym riedením zásobných kalibračných štandardov, ktoré boli rozdelené do zmesi A a B. Zmes A obsahovala xylulózu, fruktózu, galaktózu, manoheptulózu, erytritol, ribitol, galaktitol, zatiaľ čo zmes B obsahovala arabinózu, glukózu, sedoheptulózu, arabitól a sorbitól. Taktiež bola pripravená kalibračná krivka pre kreatinín v rámci aplikácie metódy na vzorky zdravých jedincov a pacientov s DMP. Kalibračné krivky zmesi A a B boli riedené komerčne dostupným močovým diluentom (Sigmatrix močový diluent SMD). Vzhľadom na prítomnosť kreatinínu v SMD, kalibračná krivka kreatinínu bola pripravená v 1 mM mravenčane/octane amónnom (MF A).

Do vialky boli pipetované nasledujúce objemy roztokov: 50 μ l zásobného alebo binárne zriedeného kalibračného štandardu zmesi A/B/kreatinín, 50 μ l Sigmatrix močového diluentu/MF A a vo finálnom kroku 10 μ l zmesi značených interných štandardov. Po LC-MS/MS analýze boli získané dáta spracované postupom uvedeným v kapitole 3.3.6.

3.3.4.2 Príprava zmiešanej vzorky moču zdravých kontrol

Pre stanovenie validačných parametrov ako je správnosť a presnosť bola pripravená zmiešaná vzorka moču zdravých kontrol ($n=38$) z FN Olomouc. Moče zdravých jedincov boli nariadené na koncentráciu kreatinínu 2 mmol/l a od každej vzorky bolo do zmesi odobrané 500 μ l. Zmiešaná vzorka bola rozpipetovaná na alikvóty (1 ml), ktoré boli zamrazené na - 80°C.

3.3.4.3 Príprava vzoriek kontroly kvality (QC)

Cieľom QC vzoriek je simulovať správanie študovaných analytov (sacharidov a cukorných alkoholov) v prirodzenej matrici (moč). Pre tento účel bola pripravená zmiešaná vzorka moču zdravých kontrol viz. kapitola 3.3.4.2. Dohromady boli pripravené 4 koncentračné úrovne QC vzoriek pre jednotlivé zmesi analytov (Tab. 2-4). Najnižšia QC hladina bola LLOQ, čo je dolný limit kvantifikácie, ktorý bol určený kalibračným rozsahom priamky v práci Freitagovej (2023). Nízka hladina QC vzorky (LQC) bola stanovená ako trojnásobok LLOQ. Koncentrácia vysokej hladiny QC vzorky (HQC) bola stanovená ako 75% ULOQ, stredná hladina (MQC) bola stanovená ako 40% ULOQ.

QC vzorky boli pripravené zmiešaním 50 μ l zmesi vzorky LLOQ/LQC/MQC/HQC a 50 μ l zmiešanej vzorky moču zdravých kontrol. V poslednom kroku bola k vzorke pridaná zmes značených interných štandardov v objeme 10 μ l. Následne bola prevedená LC-MS/MS analýza QC vzoriek spolu s kalibračnými krivkami. Získané dáta boli spracovávané podľa postupu viz. kapitola 3.3.6.

Každá koncentračná hladina QC vzoriek bola pripravená v pentaplikátoch. Analýza QC vzoriek prebehla v troch opakovaníach v rozličných dňoch, aby bolo možné stanoviť intra-day (vnútrodenňú) a inter-day (medzidenňú) správnosť a presnosť, ako definuje príručka od EMA. Intra-day správnosť/presnosť bola vyhodnotená pre každý konkrétny deň merania analýzy ($n=5$), zatiaľ čo inter-day správnosť/presnosť bola vypočítaná z celého súboru nameraných dát ($n=15$).

Tab. 2: Nominálna koncentrácia analytov v QC vzorkách (zmes A)

Analyt	LLOQ (μ M)	LQC (μ M)	MQC (μ M)	HQC (μ M)
Xylulóza	0,39	1,17	40	75
Fruktóza	1,53	4,59	160	300
Galaktóza	3,13	9,39	320	600
Manoheptulóza	1,56	4,68	40	75
Erytritol	2,34	7,02	240	450
Ribitol	0,98	2,94	100	187,5
Galaktitol	3,13	9,39	320	600

Tab. 3: Nominálna koncentrácia analytov v QC vzorkách (zmes B)

Analyt	LLOQ (μM)	LQC (μM)	MQC (μM)	HQC (μM)
Arabinóza	0,39	1,17	40	75
Glukóza	3,13	9,39	320	600
Sedoheptulóza	0,39	1,17	40	75
Arabitol	2,34	7,02	240	450
Sorbitol	0,39	1,17	80	150

Tab. 4: Nominálna koncentrácia kreatinínu v QC vzorkách

Analyt	LLOQ (μM)	LQC (μM)	MQC (μM)	HQC (μM)
Kreatinín	5,86	17,58	1200	2250

3.3.5 Príprava vzoriek zdravých kontrol a pacientov

LC-MS/MS metóda bola aplikovaná na vzorky zdravých kontrol ($n=58$) a vzorky pacientov ($n=3$), u ktorých sa jednalo o dva odbery (pred liečbou, po liečbe) pacienta s geneticky potvrdenou galaktosemiou typu I a pacienta pôvodne suspektného pre galaktosemiu, na základe predchádzajúcich skriningových vyšetrení (zvýšené hexitoly a hexózy).

Vzorky boli pripravené nariadením LC/MS vodou na koncentráciu kreatinínu 1 mmol/l (ak moč obsahoval menej ako 1 mmol/l kreatinínu, riedenie nebolo prevedené). Takto nariadený moč bol pipetovaný v pomere 10:1 so zmesou značených interných štandardov do vialky. Pripravené vzorky zdravých kontrol a pacientov boli spolu s kalibračnými krivkami podrobené LC-MS/MS analýze. Získané dáta boli následne spracovávané podľa postupu viz. kapitola 3.3.6.

Koncentrácie zdravých kontrol boli podľa veku (<1 a >1 rok) porovnané s fyziologickými koncentraciami zdravých jedincov uvedených v literatúre. Získané koncentrácie analytov u pacientov boli vizualizované pomocou grafov v GraphPad Prism software (verzia: 9.4.1).

3.3.6 Spracovanie získaných dát

Po LC-MS/MS analýze boli získané dáta spracované v Sciex OS software (verzia: 2.0.0.45330). Po automatickej integrácii pík analytov a interných štandardov bola prevedená kontrola, prípadne manuálna integrácia. Všetky analyty boli následne vzťahnuté na príslušný interný štandard podľa Freitagová (2023). Jednotlivé vzorky boli v Sciex OS označené podľa typu ako blank, štandard alebo vzorka kontroly kvality. Ku kalibračným štandardom a QC vzorkám boli vložené nominálne koncentrácie, pričom Sciex OS pri QC vzorkách automaticky napočítal obdržané koncentrácie (vzťahnutím na kalibračnú krivku) a správnosť. Tieto informácie boli ďalej spracované v Microsoft Excel.

Koncentrácie zdravých kontrol a pacientov boli obdobne ako QC vzorky získané vzťahnutím zintegrovaných plôch pík na kalibračnú krivku príslušného analytu.

3.3.7 LC-MS/MS analýza

Analýza kalibračných kriviek, vzoriek kontroly kvality, zdravých kontrol a pacientov bola prevedená podľa LC-MS/MS nastavení (MRM scheduled), ktoré boli publikované v práci Freitagovej (2023). Separácia analytov bola zaistená kvapalinovým chromatografom Exion LC (Sciex, USA) s kolónou Luna Omega 3 μm SUGAR 150 x 2,1 mm (Phenomenex, USA). Pre účinnú separáciu bola nastavená gradientová elúcia $t=0,0-0,5$ min, 90% B; $t=13,5$ min, 70% B; $t=13,5-14,5$ min, 70% B; $t=15,5$ min, 90% B; $t=15,5-17,0$ min, 90% B.

Na detekciu bol využitý hmotnostný spektrometer QTRAP 6500+ (Sciex, USA) s ionizáciou elektrosprejom s nasledujúcimi nastaveniami: -4500 V, 300°C, tlak cloniaceho, zmlčujúceho a pomocného plynu: 40 arb, tlak kolízneho plynu: 8 arb.

Pred analýzou boli jednotlivé pumpy premývané príslušnými mobilnými fázami v 2 cykloch po 5 min a autosampler (temperovaný na 5°C) v 2 cykloch po 10 min. Kolóna bola vyhrievaná na 35°C, prietok bol nastavený na 0,3 $\mu\text{l}/\text{min}$, nástrek vzorky činil 0,3 μl a analýza vzorky trvala 17 minút.

4 Výsledky

4.1 Vyhodnotenie validačných parametrov

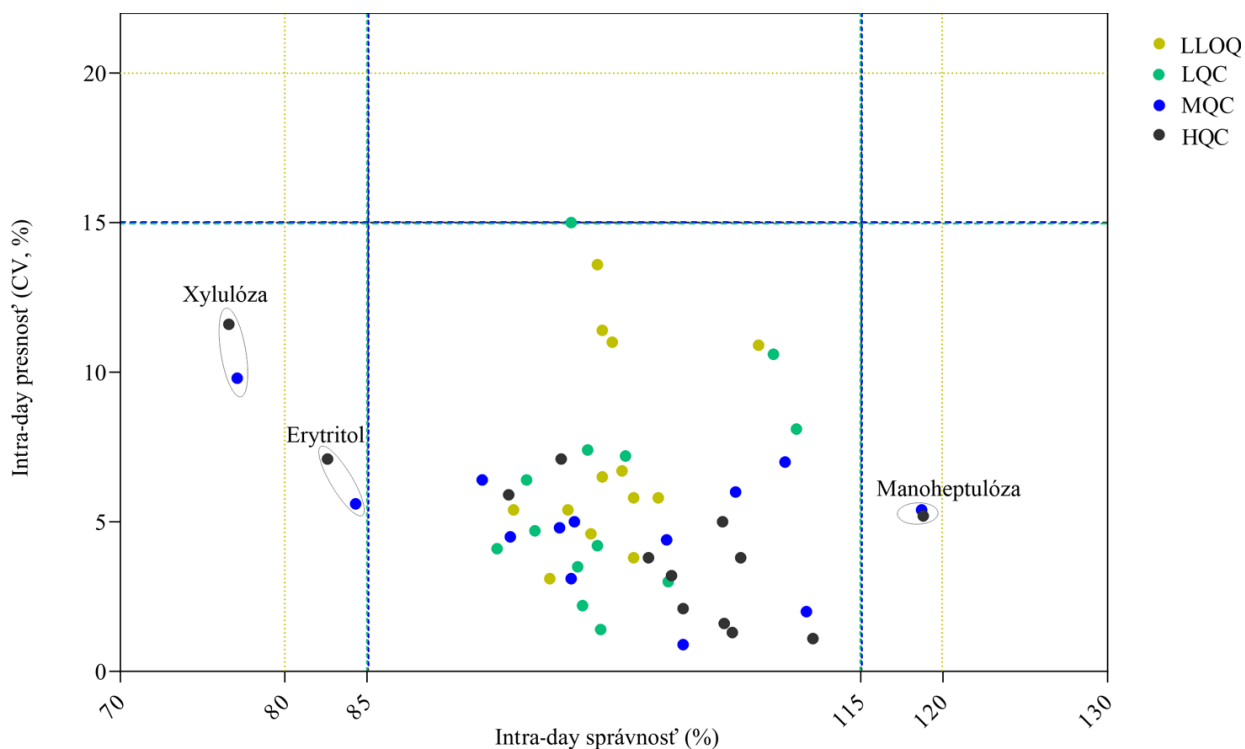
LC-MS/MS analýzou pentaplikátov QC vzoriek na 4 koncentračných úrovniach (LLOQ, LQC, MQC, HQC) v 3 nezávislých runoch bola obdržaná správnosť a presnosť v jednom dni (intra-day, $n=5$) a medzi dňami (inter-day, $n=15$). Ďalej bol vyhodnotený carry-over.

4.1.1 Správnosť

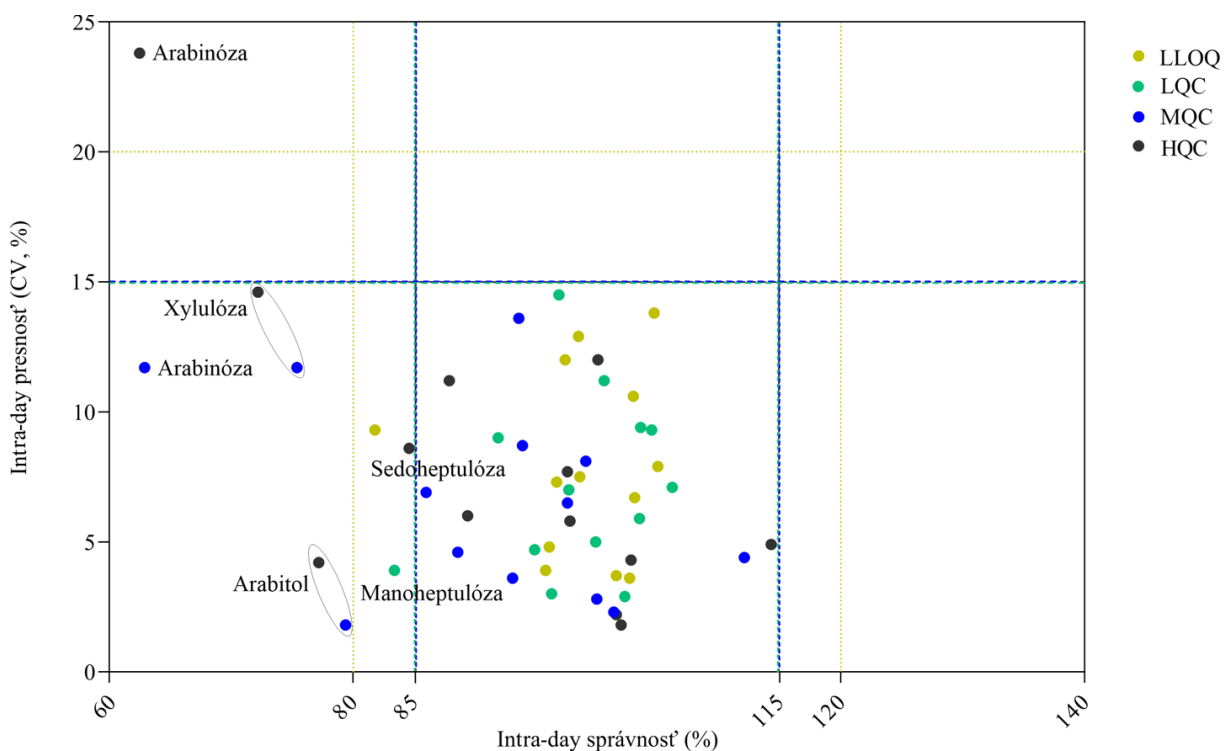
Správnosť je pomer získanej koncentrácie ku nominálnej koncentrácii látky vynásobený 100 pre získanie percentuálneho údaja. Podľa EMA príručky by správnosť pre LLOQ nemala dosahovať hodnôt nižších ako 80 % a vyšších ako 120 % a pre ostatné koncentračné hladiny by nemala dosahovať menej ako 85 % a viac ako 115 %. Výpočet správnosti znázorňuje nasledujúca rovnica:

$$\text{Správnosť (\%)} = \frac{\text{získaná koncentrácia}}{\text{nominálna koncentrácia}} \times 100$$

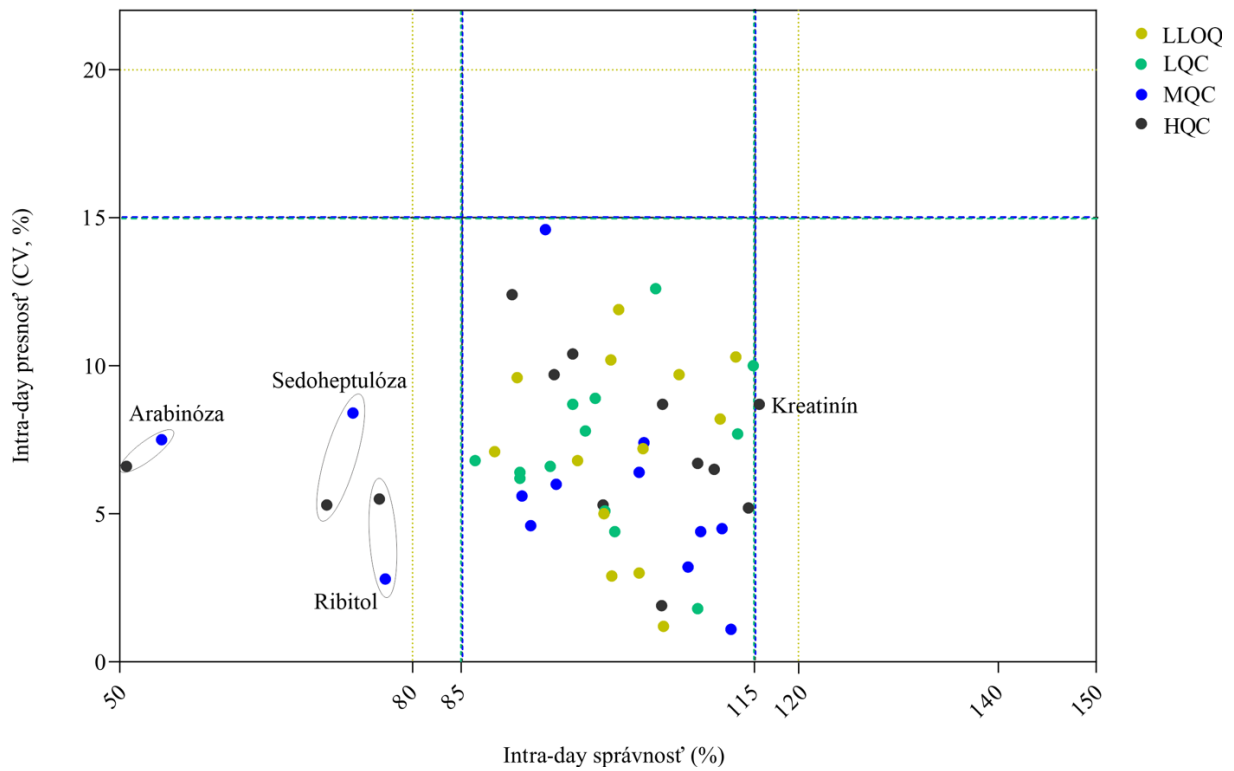
Intra-day správnosť (%) QC vzoriek je zobrazená na Obr. 4-6 a inter-day správnosť (%) je na Obr. 7. Hodnoty intra- a inter-day správnosti sú pre všetky koncentračné hladiny QC vzoriek uvedené v Prílohe 1. V rámci intra-day správnosti boli mierne odchýlky od akceptačných kritérií pozorované pre nasledujúce analyty: arabinóza, xylulóza, manoheptulóza, sedoheptulóza, arabitól, ribitol, erytritol a kreatinín. Väčšina analytov okrem arabinózy a xylulózy splnila akceptačné kritériá v rámci inter-day správnosti.



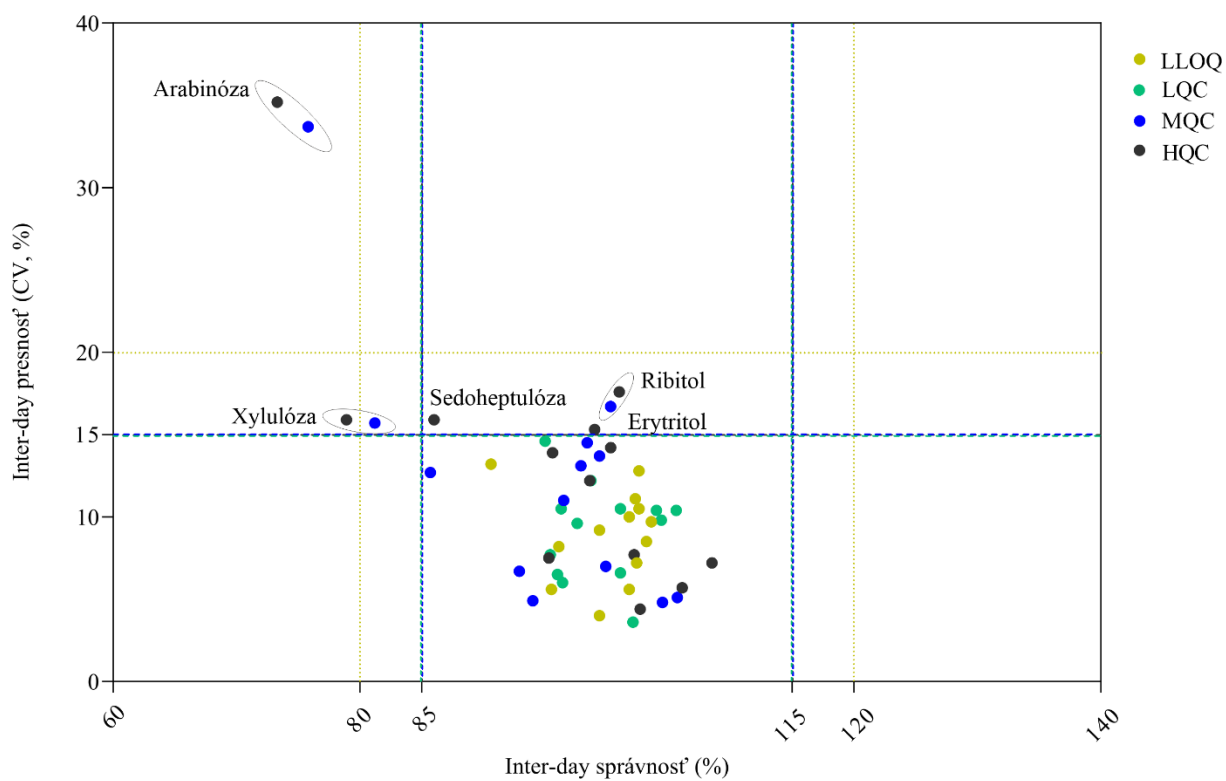
Obr. 4: Intra-day správnosť a presnosť (deň 1) ($n=5$), pričom jednotlivé koncentračné úrovne sú odlišené farebne. Línie príslušnej farby QC znázorňujú akceptačné kritérium danej koncentračnej úrovne. Analyty mimo akceptačné kritérium sú popísané.



Obr. 5: Intra-day správnosť a presnosť (deň 2) ($n=5$), pričom jednotlivé koncentračné úrovne sú odlišené farebne. Línie príslušnej farby QC znázorňujú akceptačné kritérium danej koncentračnej úrovne. Analyty mimo akceptačné kritérium sú popísané.



Obr. 6: Intra-day správnosť a presnosť (deň 3) ($n=5$), pričom jednotlivé koncentračné úrovne sú odlišené farebne. Línie príslušnej farby QC znázorňujú akceptačné kritérium danej koncentračnej úrovne. Analyty mimo akceptačné kritérium sú popísané.



Obr. 7: Inter-day správnosť a presnosť ($n=15$), pričom jednotlivé koncentračné úrovne sú odlišené farebne. Línie príslušnej farby QC znázorňujú akceptačné kritérium danej koncentračnej úrovne. Analyty mimo akceptačné kritérium sú popísané.

4.1.2 Presnosť

Presnosť udáva mieru zhody medzi výsledkami meraní a je vyjadrená vo forme variačného koeficientu (CV, %), ktorý sa vypočíta ako podiel smerodajnej odchýlky a priemeru súboru dát udávaný v percentách. Akceptačné kritériá pre presnosť sú podľa EMA príručky nedosiahnutie vyššej hodnoty ako 20 % CV (pre LLOQ) a 15 % CV pre ostatné koncentračné hladiny. Výpočet presnosti znázorňuje rovnica uvedená nižšie:

$$\text{Presnosť (CV, \%)} = \frac{s}{\bar{x}} \times 100$$

s = smerodajná odchýlka

\bar{x} = priemer

Intra- a inter-day presnosť (CV, %) sú zobrazené, spolu so správnosťou, na Obr. 4-7. Hodnoty intra a inter-day presnosti sú pre všetky analyty uvedené v Prílohe 2. Akceptačné kritériá pre intra-day presnosť nedosahoval analyt arabinóza. Inter-day presnosť podľa EMA príručky nespĺnili nasledujúce analyty: xylulóza, arabinóza, sedoheptulóza, erytritol a ribitol.

4.1.3 Carry-over

Prenos vzorky – carry-over je nežiadúci efekt, ktorý napovedá možnej kontaminácií vzorky predchádzajúcou vzorkou. Carry-over je možné považovať za nevýznamný, pokiaľ je v blanku pozorovaný prenos menší ako 5 % ULOQ. Výpočet carry-over efektu spočíva v podiele plochy píku analytu v blanku (nasledujúci v batchi po ULOQ vzorke) a plochy píku analytu v ULOQ vzorky. Následne je táto hodnota vynásobená 100 pre získanie percentuálneho údajá. Tento výpočet vyjadruje nasledujúca rovnica:

$$\text{Carry-over (\%)} = \frac{\text{Plocha analytu (blank)}}{\text{Plocha analytu (ULOQ)}} \times 100$$

Carry-over efekt pre všetky analyty je uvedený v Tab. 7. Carry-over nedosahoval hodnôt >5 % ULOQ, z čoho vyplýva, že počas merania nedochádza k zmene koncentrácií analytov v dôsledku reziduálnej vzorky, ktorá zostáva v prístroji z predchádzajúceho merania.

Tabuľka 7: Carry-over získaný pre analyty v LC-MS/MS metóde

Analyt	Deň	Carry-over (%)	Carry-over (\bar{x}) (%)
Arabinóza	1	0,032	0,034
	2	0,033	
	3	0,039	
Xylulóza	1	0,012	0,016
	2	0,008	
	3	0,028	
Fruktóza	1	0,003	0,007
	2	0,009	
	3	0,008	
Galaktóza	1	0,008	0,021
	2	0,033	
	3	0,021	
Glukóza	1	0,007	0,010
	2	0,012	
	3	0,013	
Manoheptulóza	1	0,111	0,059
	2	0,014	
	3	0,051	
Sedoheptulóza	1	0,035	0,034
	2	0,050	
	3	0,017	
Erytritol	1	0,002	0,026
	2	0,014	
	3	0,063	
Arabitol	1	0,002	0,005
	2	0,013	
	3	0,002	
Ribitol	1	0,001	0,004
	2	0,001	
	3	0,010	
Galaktitol	1	0,008	0,009
	2	0,002	
	3	0,017	
Sorbitol	1	0,006	0,009
	2	0,013	
	3	0,009	
Kreatinín	1	0,003	0,003
	2	0,003	
	3	0,004	

\bar{x} = priemerná hodnota

4.2 Analýza vzoriek zdravých kontrol a pacientov

Čiastočne validovaná LC-MS/MS metóda bola otestovaná na analýze zdravých kontrol ($n=58$). Z vybraného súboru zdravých jedincov boli po spracovaní dát napočítané referenčné medze (<1 a >1 rok), ktoré boli porovnané s literatúrou (Tab. 8-9). Tabuľky sú rozdelené podľa vekovej kategórie.

Tab. 8: Referenčné medze zdravých kontrol <1 rok ($n=22$) obdržané vyvinutou LC-MS/MS metódou a fyziologické koncentrácie analytov podľa literatúry. Koncentrácia je uvedená v $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatinínu.

Analyt	Medián (P _{2,5} – P _{97,5})	Literatúra	Zdroj
Arabinóza	59,9 (31,1 – 146,7)	7,6 – 70,2	Jansen ' et al., 1986
Xylulóza	21,0 (12,9 – 60,5)	n.	-
Fruktóza	9,1 (4,4 – 146,7)	70,4 – 107,5	Shoemaker et al., 1991
Glukóza	81,9 (20,9 – 20384,6)	3,5 – 91,9	Jansen ' et al., 1986
Galaktóza	261,8 (20,9 – 679,7)	0 – 357,6	Jansen ' et al., 1986
Manoheptulóza	1,2 (1,0 – 4,0)	n.	-
Sedoheptulóza	11,9 (6,7 – 57,8)	<40	Engelke et al., 2010
Erytritol	114,0 (35,6 – 168,0)	58 – 162	Engelke et al., 2010
Arabitol	103,1 (67,0 – 154,0)	27 – 97	Engelke et al., 2010
Ribitol	29,0 (17,6 – 73,4)	7 – 16	Engelke et al., 2010
Galaktitol	45,6 (6,0 – 73,0)	2 – 78	Palmieri et al., 1999
Sorbitol	6,7 (3,6 – 33,6)	2,2 – 16,7	Jansen ' et al., 1986

n. = neuvádzané

P = percentil

Tab. 9: Referenčné medze zdravých kontrol >1 rok ($n=36$) obdržané vyvinutou LC-MS/MS metódou a fyziologické koncentrácie analytov podľa literatúry. Koncentrácia je uvedená v $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatinínu.

Analyt	Medián (P _{2,5} – P _{97,5})	Literatúra	Zdroj
Arabinóza	26,0 (6,2 – 103,8)	20 – 65	Onkenhout et al., 2002
Xylulóza	10,4 (5,0 – 57,4)	6,4 – 32,6	Bouatra et al., 2013
Fruktóza	5,6 (1,5 – 162,7)	9,3 – 347,5	Jansen ' et al., 1986
Glukóza	28,3 (10,7 – 2631,4)	10,3 – 56,7	Bouatra et al., 2013
Galaktóza	0,3 (0,06 – 198,9)	<5 – 18	Huck et al., 2004
Manoheptulóza	1,2 (0,4 – 2,6)	<3	M. M. Wamelink et al., 2007
Sedoheptulóza	4,8 (1,6 – 10,0)	<10	Engelke et al., 2010
Erytritol	36,2 (5,4 – 119,7)	58 – 192	Verhoeven et al., 2005
Arabitol	56,1 (29,2 – 110,6)	46 – 114	Onkenhout et al., 2002
Ribitol	18,7 (6,7 – 39,8)	<5 – 11	Huck et al., 2004
Galaktitol	4,3 (1,4 – 50,6)	3 – 22	Jakobs & Schweitzer, 1995
Sorbitol	5,7 (0,9 – 25,5)	2,5 – 18,7	Bouatra et al., 2013

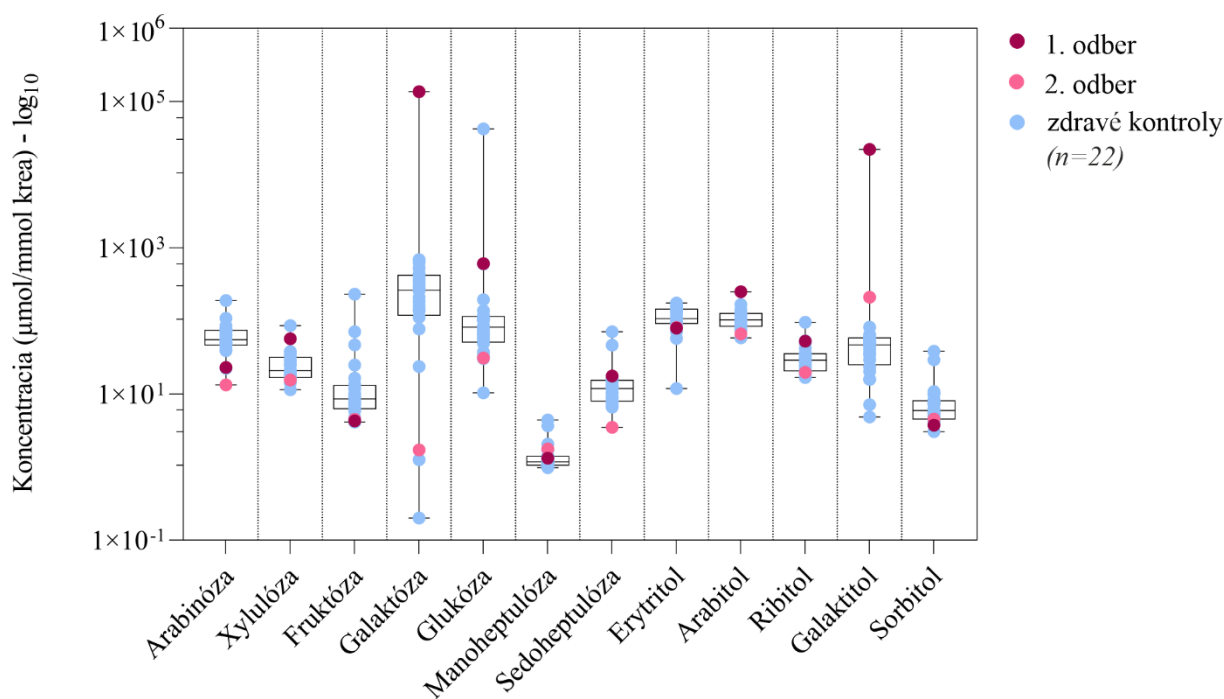
P = percentil

Okrem analýzy vzoriek zdravých kontrol bol taktiež analyzovaný pacient s galaktosemiou typu I (Pacient 1, <1 rok) v rámci 2 odberov. Pri prvotnom odbere sa jednalo o záchyt tohto ochorenia (1A), pričom druhá vzorka bola odobraná už pri prebiehajúcej liečbe pacienta (1B). Dynamika koncentrácií jednotlivých analytov u pacienta 1 pre oba odbery (Tab. 10) je v logaritmickom merítke znázornená pomocou multikomponentného rozptylového grafu (Obr. 8), ktorý bol vytvorený v GraphPad Prism software.

Tab. 10: Koncentrácie diagnosticky významných analytov pacientov 1 a 2 obdržané vyvinutou LC-MS/MS metódou. Koncentrácia je uvedená v $\mu\text{mol}/\text{mmol}$ kreatinínu.

Pacient	Galaktóza	Galaktitol	Sorbitol
1A	135371,9	22104,8	3,7
1B	1,7	210,0	4,5
2	1075,3	331,0	1493,5

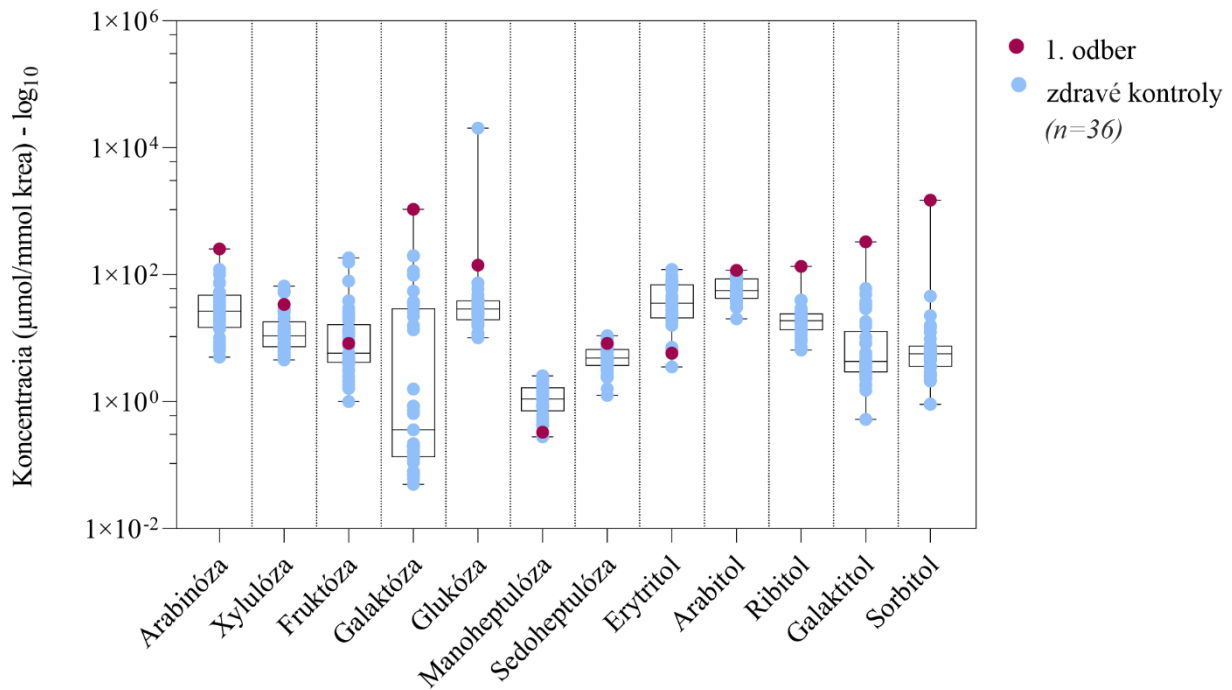
Z Obr. 8 je badateľné, že u pacienta s galaktosemiou typu I bola pri záchypte pozorovaná výrazná elevácia galaktitolu a galaktózy, ako dvoch diagnosticky významných markerov galaktosemie. Naopak pri prebiehajúcej liečbe, už boli hladiny týchto analytov v norme.



Obr. 8: Koncentrácie (\log_{10}) analytov pacienta 1 (červenou) v porovnaní so zdravými kontrolami >1 rok ($n=36$, modrou).

Ďalej bola analyzovaná vzorka pacienta suspektného pre galaktosemiu (Pacient 2, >1 rok), u ktorého boli v rámci rutinného vyšetrenia nájdené zvýšené hexitoly a hexózy, ktoré však boli v LDMP FN Olomouc pomocou GC-MS metódy rozlíšené. Vo vzorke bol odhalený zvýšený sorbitol, čím bola vylúčená suspektná galaktosemia. Výrazná elevácia sorbitolu sa potvrdila taktiež LC-MS/MS analýzou tejto vzorky (Obr. 9, Tab.10). Naopak

koncentrácie galaktitolu a galaktózy sú u tohto pacienta len mierne zvýšené oproti referenčným koncentráciám a nedosahujú hodnôt typických pre dané ochorenie ($10^4 - 10^5$).



Obr. 9: Koncentrácie (\log_{10}) analytov pacienta 2 (červenou) v porovnaní so zdravými kontrolami >1 rok ($n=36$, modrou).

5 Diskusia

Dedičné metabolické poruchy sacharidov sú skupina ochorení, pre ktoré je typická akumulácia cukrov a cukorných alkoholov v telesných tekutinách (Yi-Yung Hsia, 1961). Tento fakt slúži k diagnostike jednotlivých ochorení pomocou špecifických analytických metód. Ide o metódy, ktoré musia brať do úvahy vysoké koncentračné rozmedzie analytov a ich prítomnosť v zložitej matrici, akou je napríklad moč.

V dnešnej dobe sa stále rutinne používa na stanovenie sacharidov a cukorných alkoholov v moči technika GC/MS (Kuhara, 2005; Lee & Chung, 2006; Yager et al., 2006). Táto technika má mnohé výhody, medzi ktoré patrí najmä vysoká citlivosť a selektivita, ktorá umožňuje rozlíšiť látky so zhodnou molekulovou hmotnosťou, ako sú napr. izoméry cukrov a cukorných alkoholov. Vzorka pre GC/MS avšak musí prejsť derivatizáciou (za účelom zvýšenia jej prchavosti) a extrakciou, ktoré sú časovo náročné (Ruiz-Matute et al., 2011). Navyše extrakčná účinnosť sa môže vzorka od vzorky líšiť. Samotné vyhodnotenie analýzy nie je jednoduché a vyžaduje personál s dlhoročnými skúsenosťami. Z týchto dôvodov je cieľom v klinických laboratóriách vyvíjať metódy, ktoré sú užívateľsky prívetivé a zároveň poskytujú rýchlu diagnostiku ochorení. Taká metóda by sa mala vyznačovať vysokou citlivosťou a dostatočnou selektivitou, jednoduchou a rýchlou prípravou vzorky (bez derivatizácie), krátkou dobou analýzy, jednoduchým vyhodnotením a nízkou finančnou nákladovosťou.

Táto práca nadväzuje na vývin a čiastočnú validáciu (stanovenie linearity) LC-MS/MS metódy pre analýzu vybraných cukrov a cukorných alkoholov v moči. Vyvinutá metóda umožňuje stanoviť 18 sacharidov a 10 cukorných alkoholov v moči za 17 minút (Freitagová, 2023), čo je oproti GC/MS analýze, ktorá trvá 27 minút, výrazne kratší čas. Okrem toho, príprava vzorky obnáša jednoduché nariadenie moču na 1 mmol kreatinínu a prídanie zmesi značených interných štandardov.

V rámci experimentálnej časti tejto práce bola podľa EMA príručky prevedená nadväzujúca časť validácie, teda stanovenie vnútrodennej a medzidennej správnosti, presnosti a carry-over efektu pre vybrané analyty.

Správnosť a presnosť pre jednotlivé analyty podľa EMA (2022), by nemali presiahnuť akceptačné kritériá, ktoré sú uvedené v kapitolách 4.1.1 a 4.1.2. Najvýraznejšie odchýlky boli pozorované pre arabinózu, ktoré v strednej a vysokej koncentračnej hladine (MQC, HQC) nespĺňali akceptačné kritériá EMA. Správnosť dosahovala odchýlky až 50,7 % a presnosť až

35,2 % CV. Ďalej boli vyššie odchýlky pozorované pre sedoheptulózu a to až 71,2 % pre správnosť. Na základe týchto výsledkov je možné metódu považovať skôr za semikvantitatívnu. Tento fakt by však nemal výrazne ovplyvniť diagnostiku ochorení, pre ktoré je akumulácia týchto markerov v moči typická. Jedná sa napr. o pentosuriu, arabinosuriu a TALDOD (Onkenhout et al., 2002; M. M. C. Wamelink et al., 2008). V prípade vyššie uvedených ochorení je elevácia spomínaných markerov markantne zvýšená oproti zdravým jedincom, a preto by nemal byť problém toto ochorenie LC-MS/MS metódou zachytiť (Onkenhout et al., 2002; M. M. Wamelink et al., 2007). Navyše pri arabinosurii a TALDOD dochádza aj k elevácií ďalších špecifických markerov, ako napr. ribitolu, erytritolu, arabitolu a manoheptulózy. V týchto prípadoch je diagnostika ochorení založená na viac než jednom biomarkeri, ktoré je možné touto metódou detekovať (Onkenhout et al., 2002; M. M. C. Wamelink et al., 2008).

Niektoré analyty vykazovali len mierne odchýlky v rámci intra a inter-day správnosti a presnosti. Medzi tieto analyty patria xylulóza, manoheptulóza, erytritol, ribitol a arabitol s odchýlkou správnosti max. 72,2 % u xylulózy a presnosti max. 17,6 % CV u ribitolu. Pri požiadavke na rýchlu skrínigovú metódu sú vyššie uvedené odchýlky správnosti a presnosti, pre spomínané analyty, zanedbateľné.

V rámci carry-over efektu nebolo pozorované prekročenie akceptačného kritéria pre žiadny z analytov. Maximálna nameraná hodnota carry-over dosahovala 0,11 %. Pri týchto nameraných hodnotách môžeme tvrdiť, že carry-over nemal negatívny vplyv na analýzu vzoriek. Pre úplnú validáciu bude potrebné v budúcnosti stanoviť ďalšie validačné parametre, ako sú napr. matricové efekty a stabilita.

V ďalšej časti práce boli stanovené referenčné medze sacharidov a cukorných alkoholov pre zdravú populáciu podľa veku (>1 a <1 rok), ktoré boli porovnané s referenčnými hodnotami uvedenými v literatúre (Tab. 8-9). U niektorých zdravých kontrol bola pozorovaná zvýšená koncentrácia glukózy a galaktózy, aj napriek faktu, že títo jedinci boli vybraní ako zdravé kontroly, ktoré v rámci komplexného vyšetrenia v laboratóriu DMP boli negatívny. Nie je však vylúčené, že spomínané kontroly mohli podstúpiť liečbu, ako napríklad podanie infúzie s glukózou.

Po získaní fyziologických rozmedzí analytov sa pristúpilo k diagnostike vybraných pacientov. Pacient 1 bol v minulosti diagnostikovaný s ochorením galaktosemia I, čo táto čiastočne validovaná LC-MS/MS metóda potvrdila, nakoľko pri analýze prvotného odberu boli

hodnoty galaktitolu a galaktózy, ako významných biomarkerov, výrazne zvýšené (o 2 rády), v porovnaní so zdravými kontrolami (Tab. 10). Druhý odber tohto pacienta, ktorý bol odobraný s časovým rozstupom 1 rok a 8 mesiacov, bol dôkazom úspešnej liečby pacienta, pri ktorej koncentrácie problematických metabolitov klesli na fyziologické hodnoty (Tab. 10).

Vzorka pacienta 2 bola v minulosti podrobená rutine používanej GC/MS metóde, na základe podozrenia na ochorenie galaktosemia, vyplývajúceho zo skriningovej LC/MS analýzy vo FN Olomouc. Táto rýchla skriningová metóda vtedy preukázala zvýšenie hexitolov (manitol, galaktitol, sorbitol) a hexóz. V rámci následného aplikovania druhostupňovej GC/MS metódy boli vyššie uvedené hexitoly odseparované, čo následne preukázalo zvýšenie sorbitolu, čo vylúčilo suspektné ochorenie, pri ktorom by musela byť pozorovaná výrazná elevácia galaktitolu. Aplikáciou tejto metódy na vzorku pacienta boli izoméne formy hexitolov spoľahlivo rozlíšené a tým bolo vylúčené ochorenie galaktosemia, nakoľko z hexitolov mal pacient 2 najviac zvýšenú hladinu sorbitolu (Obr. 9). Sorbitol sa v moči vyskytuje vo vyšších koncentračných hladinách z dôvodu nadmernej konzumácie potravín obsahujúcich sorbitol (prípadne fruktózu) akými sú ovocie a zelenina, či liečiv, do ktorých je pridávaný ako aditívum (Dash et al., 2019; Fang et al., 2020; Muir et al., 2009).

Aplikáciou čiastočne validovanej metódy na vzorky zdravých kontrol a pacientov bolo overené, že táto metóda je vhodná pre zavedenie do rutínnej praxe v Laboratóriu dedičných metabolických porúch, Fakultnej nemocnice Olomouc na diagnostiku DMP sacharidov.

6 Záver

Teoretická časť poskytuje informácie o ochoreniach metabolizmu galaktózy, fruktózy a pentózafosfátovej dráhy so zameraním na fyziologický priebeh dráh a alternatívne metabolické dráhy aktivované pri ich narušení. Ďalej bola popísaná súčasná diagnostika týchto ochorení, kvapalinová chromatografia a hmotnostná spektrometria a validácia analytickej metódy.

V praktickej časti bola v rámci čiastočnej validácie LC-MS/MS metódy stanovená správnosť, presnosť a carry-over pre 13 analytov. Metóda bola ďalej použitá pre analýzu cukrov a cukorných alkoholov v moči zdravých jedincov a pacientov suspektných na DMP. Vzorky zdravých kontrol slúžili na stanovenie referenčných medzí podľa veku. Metóda bola otestovaná na vzorkách pacientov, u ktorých boli predpokladané výsledky confirmované.

Čiastočne validovaná semikvantitatívna LC-MS/MS metóda poskytuje jednoduchú a rýchlu analýzu vybraných sacharidov a cukorných alkoholov v moči a po úplnej validácii môže byť zaradená do rutinej prevádzky Laboratória dedičných metabolických porúch, oddelenie Klinickej biochémie, Fakultnej nemocnice Olomouc, čím by sa proces diagnostiky DMP sacharidov zefektívnil.

7 Literatúra

- Abbott, S. R. (1980). Practical Aspects of Normal-Phase Chromatography. In *Journal of Chromatographic Science* (Vol. 18).
- Ali, M., Rellos, P., & Cox, T. M. (1998). Hereditary fructose intolerance. In *Journal of Medical Genetics* (Vol. 35, Issue 5, pp. 353–365). BMJ Publishing Group. <https://doi.org/10.1136/jmg.35.5.353>
- Badiu Tișa, I., Achim, A. C., & Cozma-Petruț, A. (2023). The Importance of Neonatal Screening for Galactosemia. In *Nutrients* (Vol. 15, Issue 1). MDPI. <https://doi.org/10.3390/nu15010010>
- Balakrishnan, U. (2021). Inborn Errors of Metabolism—Approach to Diagnosis and Management in Neonates. In *Indian Journal of Pediatrics* (Vol. 88, Issue 7, pp. 679–689). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12098-021-03759-9>
- Bayona, J. M., Pawlinszyn, J., Dugo, P., Le, C. X., Lee, H. K., Li, X.-F., & Lord, H. (2012). *Comprehensive Sampling and Sample Preparation, Analytical Techniques for Scientist* (J. Pawlinszyn, Ed.; First Edition). Academic Press.
- Blau, N., Dionisi Vici, C., Ferreira, C. R., Vianey-Saban, C., & van Karnebeek, C. D. M. (2022). *Physician's Guide to the Diagnosis, Treatment, and Follow-Up of Inherited Metabolic Diseases* (N. Blau, C. Dionisi Vici, C. R. Ferreira, C. Vianey-Saban, & C. D. M. van Karnebeek, Eds.). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-67727-5>
- Blum, F. (2014). High performance liquid chromatography. *British Journal of Hospital Medicine*, 75(2), 18–21.
- Bonthron, D. T., Brady, N., Donaldson, A., & Steinmannz, B. (1994). Molecular basis of essential fructosuria: molecular cloning and mutational analysis of human ketohexokinase (fructokinase). In *Human Molecular Genetics* (Vol. 3, Issue 9). <http://hmg.oxfordjournals.org/>
- Bouatra, S., Aziat, F., Mandal, R., Guo, A. C., Wilson, M. R., Knox, C., Bjorndahl, T. C., Krishnamurthy, R., Saleem, F., Liu, P., Dame, Z. T., Poelzer, J., Huynh, J., Yallou, F. S., Psychogios, N., Dong, E., Bogumil, R., Roehring, C., & Wishart, D. S. (2013). The Human Urine Metabolome. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073076>
- Boyle, L., Wamelink, M. M. C., Salomons, G. S., Roos, B., Pop, A., Dauber, A., Hwa, V., Andrew, M., Douglas, J., Feingold, M., Kramer, N., Saitta, S., Retterer, K., Cho, M. T., Begtrup, A., Monaghan, K. G., Wynn, J., & Chung, W. K. (2016). Mutations in TKT Are the Cause of a Syndrome Including Short Stature, Developmental Delay, and Congenital Heart Defects. *American Journal of Human Genetics*, 98(6), 1235–1242. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.03.030>
- Buszewski, B., & Noga, S. (2012). Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Vol. 402, Issue 1, pp. 231–247). <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5308-5>

- Coelho, A. I., Berry, G. T., & Rubio-Gozalbo, M. E. (2015). Galactose metabolism and health. In *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* (Vol. 18, Issue 4, pp. 422–427). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/MCO.0000000000000189>
- Coelho, A. I., Rubio-Gozalbo, M. E., Vicente, J. B., & Rivera, I. (2017). Sweet and sour: an update on classic galactosemia. In *Journal of Inherited Metabolic Disease* (Vol. 40, Issue 3, pp. 325–342). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/s10545-017-0029-3>
- Dash, R. P., Srinivas, N. R., & Babu, R. J. (2019). Use of sorbitol as pharmaceutical excipient in the present day formulations—issues and challenges for drug absorption and bioavailability. In *Drug Development and Industrial Pharmacy* (Vol. 45, Issue 9, pp. 1421–1429). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/03639045.2019.1640722>
- de Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2007). *Mass Spectrometry Principles and Applications* (Third). John Wiley and Sons, Ltd.
- Delnoy, B., Coelho, A. I., & Rubio-Gozalbo, M. E. (2021). Current and future treatments for classic galactosemia. In *Journal of Personalized Medicine* (Vol. 11, Issue 2, pp. 1–14). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/jpm11020075>
- Demirbas, D., Coelho, A. I., Rubio-Gozalbo, M. E., & Berry, G. T. (2018). Hereditary galactosemia. In *Metabolism: Clinical and Experimental* (Vol. 83, pp. 188–196). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2018.01.025>
- EMA. (2022). *ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis*. www.ema.europa.eu/contact
- Engelke, U. F. H., Zijlstra, F. S. M., Mochel, F., Valayannopoulos, V., Rabier, D., Kluijtmans, L. A. J., Perl, A., Verhoeven-Duif, N. M., de Lonlay, P., Wamelink, M. M. C., Jakobs, C., Morava, É., & Wevers, R. A. (2010). Mitochondrial involvement and erythronic acid as a novel biomarker in transaldolase deficiency. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1802(11), 1028–1035. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2010.06.007>
- Ezgu, F. (2016). Inborn Errors of Metabolism. In *Advances in Clinical Chemistry* (Vol. 73, pp. 195–250). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.acc.2015.12.001>
- Fang, T., Cai, Y., yang, Q., Ogutu, C. O., Liao, L., & Han, Y. (2020). Analysis of sorbitol content variation in wild and cultivated apples. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(1), 139–144. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10005>
- FDA. (2022). *M10 BIOANALYTICAL METHOD VALIDATION AND STUDY SAMPLE ANALYSIS Guidance for Industry*. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/guidance-compliance-regulatory-information-biologics/biologics-guidances>
- Ferreira, C. R., Rahman, S., Keller, M., Zschocke, J., Abdenur, J., Ali, H., Artuch, R., Ballabio, A., Barshop, B., Baumgartner, M., Bertini, E. S., Blau, N., Carelli, V., Carroll, C., Chinnery, P. F., Christodoulou, J., Cornejo, V., Darin, N., Derks, T., ... Zeviani, M. (2021). An international classification of inherited metabolic disorders (ICIMD). *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 44(1), 164–177. <https://doi.org/10.1002/jimd.12348>

- Ferreira, C. R., & van Karnebeek, C. D. M. (2019). Inborn errors of metabolism. In *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 162, pp. 449–481). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64029-1.00022-9>
- Freitagová, R. (2023). *LC-MS/MS analýza cukrů a polyolů v moči pro diagnostiku vybraných dědičných metabolických poruch.*
- Friedecký D, & Lemr K. (2012). Úvod do hmotnostní spektrometrie. In *Biochem. Metab* (Vol. 20, Issue 41).
- Funari, V. A., Crandall, J. E., & Tolan, D. R. (2007). Fructose metabolism in the cerebellum. In *Cerebellum* (Vol. 6, Issue 2, pp. 130–140). <https://doi.org/10.1080/14734220601064759>
- González, O., Blanco, M. E., Iriarte, G., Bartolomé, L., Maguregui, M. I., & Alonso, R. M. (2014). Bioanalytical chromatographic method validation according to current regulations, with a special focus on the non-well defined parameters limit of quantification, robustness and matrix effect. In *Journal of Chromatography A* (Vol. 1353, pp. 10–27). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.03.077>
- Grochowski, L. L., Xu, H., & White, R. H. (2005). Ribose-5-phosphate biosynthesis in *Methanocaldococcus jannaschii* occurs in the absence of a pentose-phosphate pathway. *Journal of Bacteriology*, 187(21), 7382–7389. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7382-7389.2005>
- Guo, Y., Jiang, J., & Xu, Z. (2023). Chinese genetic variation database of inborn errors of metabolism: a systematic review of published variants in 13 genes. In *Orphanet Journal of Rare Diseases* (Vol. 18, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13023-023-02726-1>
- Hanková, Lucie Mgr. (2015). *Vývoj HPLC metody na stanovenie obsahu substance Riluzolu v oplachovém rozpouštědle, validace metody.*
- Hannou, S. A., Haslam, D. E., McKeown, N. M., & Herman, M. A. (2018). Fructose metabolism and metabolic disease. In *Journal of Clinical Investigation* (Vol. 128, Issue 2, pp. 545–555). American Society for Clinical Investigation. <https://doi.org/10.1172/JCI96702>
- Herman, M. A., & Birnbaum, M. J. (2021). Molecular aspects of fructose metabolism and metabolic disease. In *Cell Metabolism* (Vol. 33, Issue 12, pp. 2329–2354). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.09.010>
- Huck, J. H. J., Verhoeven, N. M., Struys, E. A., Salomons, G. S., Jakobs, C., & Van Der Knaap, M. S. (2004). Ribose-5-Phosphate Isomerase Deficiency: New Inborn Error in the Pentose Phosphate Pathway Associated with a Slowly Progressive Leukoencephalopathy. In *Am. J. Hum. Genet* (Vol. 74).
- Jakobs, C., & Schweitzer, S. (1995). *Galactitol in galactosemia.*
- Jansen , G., Muskiet, F. A. J., Schierbeek, H., Berger, R., & Van Der Slik, W. (1986). Capillary gas chromatographic profiling of urinary, plasma and erythrocyte sugars and polyols as their trimethylsilyl derivatives, preceded by a simple and rapid prepurification method. In *Clinica Chimica Acta* (Vol. 157).

- JEFFERY, J., CEDERLUND, E., & JÖRNVALL, H. (1984). Sorbitol dehydrogenase: The primary structure of the sheep-liver enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 140(1), 7–16. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1984.tb08059.x>
- Johnston, J. A., Nelson, D. R., Bhatnagar, P., Curtis, S. E., Chen, Y., & MacKrell, J. G. (2021). Prevalence and cardiometabolic correlates of ketohexokinase gene variants among UK Biobank participants. *PLoS ONE*, 16(2 February). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0247683>
- Kardon, T., Stroobant, V., Veiga-da-Cunha, M., & Schaftingen, E. Van. (2008). Characterization of mammalian sedoheptulokinase and mechanism of formation of erythritol in sedoheptulokinase deficiency. *FEBS Letters*, 582(23–24), 3330–3334. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.08.024>
- Khamis, M. M., Adamko, D. J., & El-Aneed, A. (2021). STRATEGIES AND CHALLENGES IN METHOD DEVELOPMENT AND VALIDATION FOR THE ABSOLUTE QUANTIFICATION OF ENDOGENOUS BIOMARKER METABOLITES USING LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS SPECTROMETRY. In *Mass Spectrometry Reviews* (Vol. 40, Issue 1, pp. 31–52). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/mas.21607>
- Kodíček, M., Valentová, O., & Hynek, R. (2022). *BIOCHEMIE chemický pohled na biologický svět* (3rd ed.). VYSOKÁ ŠKOLA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ V PRAZE.
- Koppelaar, D. W., Denton, B. M., Hieftje, G. M., & Barnes, J. H. (2005). MS Detectors. *Analytical Chemistry*, 77(21), 419–427.
- Kowkabany, G. N. (1953). *PAPER CHROMATOGRAPHY OF CARBOHYDRATES AND RELATED COMPOUNDS**.
- Kuhara, T. (2005). Gas chromatographic-mass spectrometric urinary metabolome analysis to study mutations of inborn errors of metabolism. *Mass Spectrometry Reviews*, 24(6), 814–827. <https://doi.org/10.1002/mas.20038>
- Lai, K., & Klapa, M. I. (2004). Alternative pathways of galactose assimilation: Could inverse metabolic engineering provide an alternative to galactosemic patients? *Metabolic Engineering*, 6(3), 239–244. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2004.01.001>
- Lebigot, E., Brassier, A., Zater, M., Imanci, D., Feillet, F., Théron, P., de Lonlay, P., & Boutron, A. (2015). Fructose 1,6-bisphosphatase deficiency: clinical, biochemical and genetic features in French patients. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38(5), 881–887. <https://doi.org/10.1007/s10545-014-9804-6>
- LeDuc, C. A., Crouch, E. E., Wilson, A., Lefkowitz, J., Wamelink, M. M. C., Jakobs, C., Salomons, G. S., Sun, X., Shen, Y., & Chung, W. K. (2014). Novel association of early onset hepatocellular carcinoma with transaldolase deficiency. In *JIMD Reports* (Vol. 12, pp. 121–127). Springer. https://doi.org/10.1007/8904_2013_254
- Lee, J., & Chung, B. C. (2006). Simultaneous measurement of urinary polyols using gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical*

- Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 831(1–2), 126–131.
<https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.11.043>
- Li, F., Xing, G., Cousineau, C., Clemens, S., Mofikoya, M., Kim, M. Y., Zhang, J. (Yanhua), Zhang, Y., & Raha, N. (2022). Development and validation of a HILIC-MS/MS method for the quantitation of fructose in human urine in support of clinical programs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 208.
<https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114462>
- Li, N., Chang, G., Xu, Y., Ding, Y., Li, G., Yu, T., Qing, Y., Li, J., Shen, Y., Wang, J., & Wang, X. (2017). Clinical and molecular characterization of patients with fructose 1,6-bisphosphatase deficiency. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(4).
<https://doi.org/10.3390/ijms18040857>
- Manz, A., Dittrich, P. S., Pamme, N., & Iossifidis, D. (2015). *bioanalytical chemistry* (second). Imperial College Press.
- Muir, J. G., Rose, R., Rosella, O., Liels, K., Barrett, J. S., Shepherd, S. J., & Gibson, P. R. (2009). Measurement of short-chain carbohydrates in common Australian vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2), 554–565. <https://doi.org/10.1021/jf802700e>
- Niaz, K., Khan, F., & Shah, M. A. (2020). Analysis of carbohydrates (monosaccharides, polysaccharides). In *Recent Advances in Natural Products Analysis* (pp. 621–633). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816455-6.00018-4>
- Nováková, L., & Douša, M. (2013). *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. (2. vydanie). Europrint a.s.
- Nováková, L., Douša, M., Blatný, P., Jandera, P., Planeta, J., Maier, V., & Znalezišona, J. (2013). *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I*. (1. vydanie). Europrint a.s.
- Nussbaum, R. L., McInnes, R. R., Willard, H. F., & Hamosh, A. (2007). *GENETICS IN MEDICINE Seventh Edition* (7th ed.). SAUNDERS ELSEVIER.
- Nyhan, W. L., & Hoffmann, G. F. (2020). *ATLAS OF INHERITED METABOLIC DISEASES* (fourth edition). CRC Press, Taylor and Francia Group.
- Oliver, R. W. A. (1998). *HPLC of Macromolecules: A practical Approach*. (Second). Oxford University Press .
- Onkenhout, W., Groener, J. E. M., Verhoeven, N. M., Yin, C., & Laan, L. A. E. M. (2002). *L-Arabinosuria: a new defect in human pentose metabolism*. www.academicpress.com
- Ovodov, S., Evtusi-ieni, E. V, Vasi, V. E., Ovodova, R. G., SOlmV, T. F., & Fav Easlevn, E. (1966). *THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY OF CARBOI-IYDRATES*.
- Palmieri, M., Mazur, A., Berry, G. T., Ning, C., Wehrli, S., Yager, C., Reynolds, R., Singh, R., Muralidharan, K., Langley, S., Ii, L. E., & Segal, S. (1999). *Urine and Plasma Galactitol in Patients With Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase Deficiency Galactosemia*.

- Pierce, S. B., Spurrell, C. H., Mandell, J. B., Lee, M. K., Zeligson, S., Bereman, M. S., Stray, S. M., Fokstuen, S., MacCoss, M. J., Levy-Lahad, E., King, M. C., & Motulsky, A. G. (2011). Garrod's fourth inborn error of metabolism solved by the identification of mutations causing pentosuria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(45), 18313–18317. <https://doi.org/10.1073/pnas.1115888108>
- Pingoud, A., Urbanke, C., Hoggett, J., & Jeltsch, A. (2002). *Biochemical Methods* (1st ed.). Wiley-VCH Verlag GmnH.
- Ruiz-Matute, A. I., Hernández-Hernández, O., Rodríguez-Sánchez, S., Sanz, M. L., & Martínez-Castro, I. (2011). Derivatization of carbohydrates for GC and GC-MS analyses. In *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* (Vol. 879, Issues 17–18, pp. 1226–1240). <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2010.11.013>
- Sadílek, M. (2020). ÚVOD DO TANDEMOVÉ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE. *Chemické Listy*, *114*, 133–144.
- Shoemaker, J. D., Elliott, W. H., & Doisy, E. A. (1991). Automated screening of urine samples for carbohydrates, organic and amino acids after treatment with urease a. In *Journal of Chromatography* (Vol. 562).
- Stinccone, A., Prigione, A., Cramer, T., Wamelink, M. M. C., Campbell, K., Cheung, E., Olin-Sandoval, V., Grüning, N. M., Krüger, A., Tauqeer Alam, M., Keller, M. A., Breitenbach, M., Brindle, K. M., Rabinowitz, J. D., & Ralser, M. (2015). The return of metabolism: Biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway. *Biological Reviews*, *90*(3), 927–963. <https://doi.org/10.1111/brv.12140>
- Succoio, M., Sacchettini, R., Rossi, A., Parenti, G., & Ruoppolo, M. (2022). Galactosemia: Biochemistry, Molecular Genetics, Newborn Screening, and Treatment. In *Biomolecules* (Vol. 12, Issue 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom12070968>
- Tappy, L., & Rosset, R. (2017). Fructose Metabolism from a Functional Perspective: Implications for Athletes. In *Sports Medicine* (Vol. 47, pp. 23–32). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/s40279-017-0692-4>
- Tebani, A., Abily-Donval, L., Afonso, C., Marret, S., & Bekri, S. (2016). Clinical metabolomics: The new metabolic window for inborn errors of metabolism investigations in the post-genomic era. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 17, Issue 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms17071167>
- Timson, D. J. (2006). The structural and molecular biology of type III galactosemia. In *IUBMB Life* (Vol. 58, Issue 2, pp. 83–89). <https://doi.org/10.1080/15216540600644846>
- Timson, D. J. (2016). The molecular basis of galactosemia — Past, present and future. *Gene*, *589*(2), 133–141. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.06.077>
- Verhoeven, N. M., Wallot, M., Huck, J. H. J., Dirsch, O., Ballauf, A., Neudorf, U., Salomons, G. S., Van Der Knaap, M. S., Voit, T., & Jakobs, C. (2005). A newborn with severe liver failure, cardiomyopathy and transaldolase deficiency. In *J. Inherit. Metab. Dis* (Vol. 28).

- Vetter, V., & Shin, Y. S. (1995). Lens sorbitol dehydrogenase deficiency in a patient with congenital cataract. In *Eur J Pediatr* (Vol. 154). Springer-Verlag.
- Wamelink, M. M. C., Grüning, N. M., Jansen, E. E. W., Bluemlein, K., Lehrach, H., Jakobs, C., & Ralser, M. (2010). The difference between rare and exceptionally rare: Molecular characterization of ribose 5-phosphate isomerase deficiency. *Journal of Molecular Medicine*, *88*(9), 931–939. <https://doi.org/10.1007/s00109-010-0634-1>
- Wamelink, M. M. C., Smith, D. E. C., Jakobs, C., & Verhoeven, N. M. (2005). Analysis of polyols in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A useful tool for recognition of inborn errors affecting polyol metabolism. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *28*(6), 951–963. <https://doi.org/10.1007/s10545-005-0233-4>
- Wamelink, M. M. C., Struys, E. A., Huck, J. H. J., Roos, B., Van Der Knaap, M. S., Jakobs, C., & Verhoeven, N. M. (2005). Quantification of sugar phosphate intermediates of the pentose phosphate pathway by LC-MS/MS: Application to two new inherited defects of metabolism. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *823*(1), 18–25. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.01.001>
- Wamelink, M. M. C., Struys, E. A., & Jakobs, C. (2008). The biochemistry, metabolism and inherited defects of the pentose phosphate pathway: A review. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *31*(6), 703–717. <https://doi.org/10.1007/s10545-008-1015-6>
- Wamelink, M. M., Smith, D. E., Jansen, E. E., Verhoeven, N. M., Struys, E. A., & Jakobs, C. (2007). Detection of transaldolase deficiency by quantification of novel seven-carbon chain carbohydrate biomarkers in urine. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, *30*(5), 735–742. <https://doi.org/10.1007/s10545-007-0590-2>
- Waters, D., Adeloye, D., Woolham, D., Wastnedge, E., Patel, S., & Rudan, I. (2018). Global birth prevalence and mortality from inborn errors of metabolism: A systematic analysis of the evidence. *Journal of Global Health*, *8*(2). <https://doi.org/10.7189/jogh.08.021102>
- Wehrli, S. L., Berry, G. T., Palmieri, M., Mazur, A., Elsas, L., & Segal, S. (1997). Urinary Galactonate in Patients with Galactosemia: Quantitation by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy. *Pediatric Research*, *42*(6), 855–861. <https://doi.org/10.1203/00006450-199712000-00022>
- Wille, S. M. R., Desharnais, B., Pichini, S., Trana, A. Di, Busardò, F. P., Wissenbach, D. K., & Peters, F. T. (2022). Liquid Chromatography High-Resolution Mass Spectrometry in Forensic Toxicology: What are the Specifics of Method Development, Validation and Quality Assurance for Comprehensive Screening Approaches? *Current Pharmaceutical Design*, *28*(15), 1230–1244. <https://doi.org/10.2174/1381612828666220526152259>
- Witters, P., Morava-Kozics, E., & Ghishan, F. K. (2021). *Inborn errors of carbohydrate metabolism* (Issue 39, pp. 442–447). <https://doi.org/10.1017/9781108918978.027>
- Yager, C., Wehrli, S., & Segal, S. (2006). Urinary galactitol and galactonate quantified by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, *366*(1–2), 216–224. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2005.10.015>

- Yasawy, M. I., Folsch, U. R., Schmidt, W. E., & Schwend, M. (2009). Adult hereditary fructose intolerance. *World Journal of Gastroenterology*, 15(19), 2412–2413. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.2412>
- Yi, C., & Xie, J. (2022). Fructose-1,6-bisphosphatase deficiency. *Clinical Vignette*. <https://doi.org/10.1007/s10545-007>
- Yi-Yung Hsia, D. (1961). *Inborn Errors of Carbohydrate Metabolism*. <http://diabetesjournals.org/diabetes/article-pdf/10/4/260/337830/10-4-260.pdf>
- Young, D. S., & Jackson, A. J. (1970). Thin-Layer Chromatography of Urinary Carbohydrates A Comparative Evaluation of Procedures. In *CLINICAL CHEMISTRY* (Vol. 16, Issue 11). <https://academic.oup.com/clinchem/article/16/11/954/5679393>
- Zhu, Y., Lobato, A. G., Rebelo, A. P., Canic, T., Ortiz-Vega, N., Tao, X., Syed, S., Yanick, C., Saporta, M., Shy, M., Perfetti, R., Shendelman, S., Züchner, S., & Zhai, R. G. (2023). *Sorbitol reduction via govorestat ameliorates synaptic dysfunction and neurodegeneration in sorbitol dehydrogenase deficiency*. <https://doi.org/10.1172/jci>

8 Zoznam použitých symbolov a skratiek

μM	mikromol na liter
6PGDH	6-fosfoglukonátdehydrogenáza
AKR1B	aldózareduktáza
AKR1B	aldolázareduktáza
ALDOB	aldoláza B
APCI	ionizácia za atmosférického tlaku
CI	chemická ionizácia
CV	variačný koeficient
DMP	dedičné metabolické poruchy
EC	Enzyme Commission number
EI	elektrónová ionizácia
EMA	European Medicines Agency
Erytróza-4-P	erytróza-4-fosfát
ESI	ionizácia elektrosprejom
FBP	fruktóza-1,6-bisfosfatáza
FBP-D	deficit fruktóza-1,6-bisfosfatázy
FDA	Food and Drug Administration
FN	Fakultná nemocnica
Fru-1,6-bisP	fruktóza-1,6-bisfosfát
Fru-1-P	fruktóza-1-fosfát
Fru-1-P	fruktóza-1-fosfát
Fru-6-P	fruktóza-6-fosfát
G6PDH	glukóza-6-fosfátdehydrogenáza

GAL	galaktózadehydrogenáza
GALE	galaktóza-4-epimeráza
GALK1	galaktokináza
GALM	galaktomutarotáza
GALT	urydylyltransferáza
GC	plynová chromatografia
Glukóza-6-P	glukóza-6-fosfát
GLUT2	glukózový transportér 2
GLUT5	glukózový transportér 5
GS/MS	plynová chromatografia a hmotnostná spektrometria
HFI	dedičná intolerancia fruktózy
HILIC	hydrofilná interakčný kvapalinová chromatografia
HK	hexokináza
HPLC	vysokoúčinná kvapalinová chromatografia
HQC	vysoké vzorky kontroly kvality
IS	interný štandard
KHK	ketoheksokináza
KHK	ketoheksokináza
LADA	L - arabitoldehydrogenáza
LC	kvapalinová chromatografia
LC/MS	kvapalinová chromatografia a hmotnostná spektrometria
LC-MS/MS	kvapalinová chromatografia v spojení s tandemovou hmotnostnou spektrometriou
LDMP	Laboratórium dedičných metabolických porúch
LLOQ	dolný limit kvantifikácie

LOD	limit detekcie
LOQ	limit kvantifikácie
LQC	nízke vzorky kontroly kvality
m/z	pomer hmotnosti ku náboju
MALDI	laserová desorpčná ionizácia pomocou matrice
MF	mobilná fáza
mM	milimol na liter
MQC	stredné vzorky kontroly kvality
MRM	sledovanie mnoho reakcií
MS	hmotnostný spektrometer
MS/MS	tandemová hmotnostná spektrometria
NP-LC	kvapalinová chromatografia s normálnou fázou
NS	novorodenecký skrining
PC	papierová chromatografia
PFK	fosfofruktokináza
PGLS	glukonolaktonáza
PPD	pentózafosfátová dráha
QC	vzorky kontroly kvality
Ribóza-5-P	ribóza-5-fosfát
RPE	ribulóza-5-fosfát-3-epimeráza
RPI	ribulóza-5-fosfát-izomeráza
RP-LC	kvapalinová chromatografia s reverznou fázou
SGLT1	sodno-glukózový transportér 1
SHPK	sedoheptulokináza

SMD	Sigmatix močový diluent
SORD	sorbitoldehydrogenáza
TALDO	transaldoláza
TALDOD	deficit transaldolázy
TKFC	triokináza
TKT	transketoláza
TKTD	deficit transketolázy
TLC	tenkovrstvová chromatografia
ULOQ	horný limit kvantifikácie
\bar{x}	priemer
XR	xylulózareduktáza
Xylulóza-5-P	xylulóza-5-fosfát

9 Prílohy

Príloha 1: Intra-day ($n=5$) a inter-day ($n=15$) správnosť získaná pre analyty v LC-MS/MS metóde

Analyt	LLOQ			LQC			MQC			HQC		
	Konc. (μM)	Intra-day správnosť (%)	Inter-day správnosť (%)	Konc. (μM)	Intra-day správnosť (%)	Inter-day správnosť (%)	Konc. (μM)	Intra-day správnosť (%)	Inter-day správnosť (%)	Konc. (μM)	Intra-day správnosť (%)	Inter-day správnosť (%)
Arabinóza	0,37	108,8	102,3	1,17	111,1	104,0	40	110,4	75,8	75	106,6	73,3
		98,5			104,5			62,9			62,5	
		99,6			96,4			54,3			50,7	
Xylulóza	0,39	99,9	101,8	1,17	97,4	98,7	40	77,1	81,2	75	76,6	78,9
		105,0			106,2			75,4			72,2	
		100,3			91,0			93,6			90,2	
Fruktóza	1,53	93,9	95,5	4,59	92,9	96,0	160	96,7	94,0	300	106,7	102,7
		95,8			96,3			93,1			102,0	
		96,9			98,7			92,1			95,5	
Galaktóza	3,13	100,5	99,4	9,39	95,2	96,4	320	93,7	92,9	600	93,6	95,3
		96,7			99,9			93,9			97,8	
		101,1			94,1			91,2			94,5	
Glukóza	3,13	99,3	103,2	9,39	97,8	101,1	320	97,6	99,9	600	103,5	102,2
		103,1			100,6			99,1			97,6	
		107,3			104,9			103,2			105,6	
Manoheptulóza	1,56	99,3	90,6	4,68	109,7	95,0	40	118,7	99,4	75	118,8	100,3
		81,8			83,4			88,6			89,4	
		90,7			91,0			94,7			96,4	
Sedoheptulóza	0,39	101,2	102,4	1,17	94,7	95,4	40	97,4	85,7	75	102,1	86,0
		103,0			91,9			86,0			84,6	
		103,2			99,7			73,9			71,2	
Erytritol	2,34	99,0	102,6	7,02	100,7	104,4	240	84,3	97,9	450	82,6	99,0
		97,4			97,7			97,6			100,1	
		111,5			113,3			111,7			114,4	

Príloha 1: Intra-day ($n=5$) a inter-day ($n=15$) správnosť získaná pre analyty v LC-MS/MS metóde (pokračovanie)

Analyt	Konc. (μM)	LLOQ		Konc. (μM)	LQC		Konc. (μM)	MQC		Konc. (μM)	HQC	
		Intra-day správnosť (%)	Inter-day správnosť (%)		Intra-day správnosť (%)	Inter-day správnosť (%)		Intra-day správnosť (%)	Inter-day správnosť (%)		Intra-day správnosť (%)	Inter-day správnosť (%)
Arabitol	2,34	101,2	101,8	7,02	99,2	101,1	240	103,2	98,4	450	104,2	95,6
		98,6			94,9			79,4			77,2	
		105,7			109,2			112,6			105,5	
Ribitol	0,98	97,2	96,1	2,94	99,0	96,3	100	111,7	100,3	187,5	112,1	101,0
		102,7			103,6			112,1			114,3	
		88,4			86,4			77,2			76,6	
Galaktitol	3,13	98,6	102,6	0,39	98,4	105,6	320	107,4	105,7	600	107,7	106,1
		96,1			103,5			101,4			101,6	
		113,1			114,9			108,2			109,2	
Sorbitol	0,39	102,7	103,6	1,17	98,1	97,6	80	92,0	96,5	150	96,8	98,6
		104,7			96,9			93,6			87,9	
		103,6			97,7			103,7			110,9	
Kreatinín	5,86	96,1	99,4	17,58	103,3	102,1	1200	104,2	104,5	2250	107,2	108,5
		101,6			102,3			100,0			102,8	
		100,4			100,7			109,5			115,5	

Príloha 2: Intra-day ($n=5$) a inter-day ($n=15$) presnosť získaná pre analyty v LC-MS/MS metóde

Analyt	Konc. (μM)	LLOQ		Konc. (μM)	LQC		Konc. (μM)	MQC		Konc. (μM)	HQC	
		Intra-day presnosť (%CV)	Inter-day presnosť (%CV)		Intra-day presnosť (%CV)	Inter-day presnosť (%CV)		Intra-day presnosť (%CV)	Inter-day presnosť (%CV)		Intra-day presnosť (%CV)	Inter-day presnosť (%CV)
Arabinóza	0,39	10,9	11,1	1,17	8,1	10,4	40	7,0	33,7	75	5,0	35,2
		12,9			9,3			11,7			23,8	
		5,0			8,7			7,5			6,6	
Xylulóza	0,39	11,0	10,0	1,17	15,0	12,2	40	9,8	15,7	75	11,6	15,9
		7,9			7,1			11,7			14,6	
		10,2			6,4			14,6			12,4	
Fruktóza	1,53	5,4	5,6	4,59	4,1	6,5	160	4,8	4,9	300	1,6	4,4
		3,9			3,0			3,6			1,8	
		6,8			8,9			4,6			5,3	
Galaktóza	3,13	6,7	9,2	9,39	4,7	6,0	320	4,5	6,7	600	5,9	7,5
		7,3			5,0			8,7			5,8	
		11,9			6,6			5,6			9,7	
Glukóza	3,13	6,5	8,5	9,39	3,5	10,5	320	5,0	7,0	600	3,2	7,7
		6,7			11,2			8,1			7,7	
		9,7			12,6			6,4			8,7	
Manoheptulóza	1,56	11,4	13,2	4,68	10,6	14,6	40	5,4	13,7	75	5,2	14,2
		9,3			3,9			4,6			6,0	
		9,6			6,2			6,0			10,4	
Sedoheptulóza	0,39	5,8	7,2	1,17	6,4	7,7	40	3,1	12,7	75	3,8	15,9
		10,6			9,0			6,9			8,6	
		3,0			5,1			8,4			5,3	
Erytritol	2,34	13,6	12,8	7,02	7,2	9,8	240	5,6	13,1	450	7,1	15,3
		12,0			7,0			6,5			12,0	
		8,2			7,7			4,5			5,2	
Arabitól	2,34	3,8	5,6	7,02	1,4	6,6	240	4,4	14,5	450	2,1	13,9
		7,5			4,7			1,8			4,2	
		1,2			1,8			1,1			1,9	

Príloha 2: Intra-day ($n=5$) a inter-day ($n=15$) presnosť získaná pre analyty v LC-MS/MS metóde (pokračovanie)

Analyt	Konc. (μM)	LLOQ		Konc. (μM)	LQC		Konc. (μM)	MQC		Konc. (μM)	HQC	
		Intra-day presnosť (%CV)	Inter-day presnosť (%CV)		Intra-day presnosť (%CV)	Inter-day presnosť (%CV)		Intra-day presnosť (%CV)	Inter-day presnosť (%CV)		Intra-day presnosť (%CV)	Inter-day presnosť (%CV)
Ribitol	0,98	5,4	8,2	2,94	4,2	10,5	100	2,0	16,7	187,5	1,1	17,6
		3,6			9,4			4,4			4,9	
		7,1			6,8			2,8			5,5	
Galaktitol	3,13	4,6	10,5	0,39	7,4	10,4	320	6,0	5,1	600	3,8	5,7
		4,8			5,9			2,3			2,2	
		10,3			10,0			3,2			6,7	
Sorbitol	0,39	5,8	9,7	1,17	2,2	9,6	80	6,4	11,0	150	7,1	12,2
		13,8			14,5			13,6			11,2	
		7,2			7,8			7,4			6,5	
Kreatinín	5,86	3,1	4,0	17,58	3,0	3,6	1200	0,9	4,8	2250	1,3	7,2
		3,7			2,9			2,8			4,3	
		2,9			4,4			4,4			8,7	