Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Bc. Kristýna Grúlová

VYUŽITÍ LC-MS/MS V DIAGNOSTICE KONGENITÁLNÍ ADRENÁLNÍ HYPERPLASIE

Utilization of LC-MS/MS in diagnosis of congenital adrenal hyperplasia

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.

Konzultant diplomové práce: RNDr. Josef Bártl, Ph.D.

Praha 2020

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12.6.2020 Bc. Kristýna Grúlová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému konzultantovi Dr. Josefu Bártlovi za odbornost, trpělivost a laskavost se kterou mě, po celou dobu vypracování a sepisování této diplomové práce, vedl. Dále bych ráda poděkovala svému vedoucímu Dr. Petrovi Kozlíkovi za jeho rady i připomínky. Děkuji všem (zejména primářce Ing. Karolíně Peškové) z Biochemické laboratoře Kliniky dětského a dorostového lékařství VFN v Praze za vytvoření přátelského pracovního prostředí. V poslední řadě děkuji celé své rodině a mým nejbližším za neutuchající podporu po celou dobu mého studia.

Abstrakt

Kongenitální adrenální hyperplasie (CAH) je autozomálně recesivní onemocnění, které způsobuje poruchu steroidogeneze v kůře nadledvinek. Tato choroba je součástí panelu nemocí vyhledávaných v rámci preklinického celorepublikového novorozeneckého screeningu. Metodika je založená na měření koncentrace 17-hydroxyprogesteronu (17-OHP) v suché krevní kapce pomocí fluorescenční imunoanalýzy (FIA). Toto stanovení není však zcela specifické a generuje vysoké množství falešně pozitivních výsledků (až 4,3 %). V rámci této diplomové práce byla vyvinuta LC-MS/MS metoda, kterou byly změřeny vybrané steroidní hormony, které jsou aktivní v metabolismu kortisolu s ohledem na diagnostiku onemocnění CAH. Metoda byla validována a aplikována na klinické vzorky, kde rozpoznala pacienty od negativních kontrol a zásadně zredukovala falešnou pozitivitu výsledků novorozeneckého screeningu. Oproti výsledkům FIA snížila LC-MS/MS metoda falešnou pozitivitu až o 50 % v hodnocení koncentrace 17-OHP. Rozšířením diagnostického algoritmu o další naměřené markery pak došlo k redukci až o 98 %. Vyvinutá metoda je aplikovatelná též pro měření vzorků krevního séra, respektive plazmy a stala se součástí konfirmace suspektních nálezů screeningu CAH.

Klíčová slova: Steroidní hormony, kongenitální adrenální hyperplasie, suchá krevní kapka, tandemová hmotnostní spektrometrie, novorozenecký screening

Abstract

Congenital adrenal hyperplasia (CAH) is an autosomal recessive disease that causes a disorder of steroidogenesis in the adrenal cortex. This disease is a part of a panel of diseases searched in preclinical nationwide neonatal screening. The methodology is based on measuring the concentration of 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) in a dried blood spot using fluorescence immunoassay (FIA). However, this determination is not entirely specific and generates a high rate of false positive results (up to 4,3 %). In this diploma thesis the LC-MS / MS method was developed. This method measures selected steroid hormones involved in cortisol metabolism with respect to the diagnosis of CAH disease. The method was validated and applied to clinical samples, it identified CAH patients from negative controls and significantly reduced the false positivity of neonatal screening results. Compared to the FIA results, the LC-MS / MS method reduced false positivity up to 50 % by evaluating the concentration of 17-OHP. Moreover, by extending the diagnostic algorithm with other measured markers, the reduction was enhanced up to 98%. The developed method is also applicable for the measurement of serum and plasma samples, respectively, and has become a part of the confirmation tests for suspected CAH screening findings.

Key words: Steroid hormones, congenital adrenal hyperplasia, dried blood spot, tandem mass spectrometry, newborn screening

Seznam použitých zkratek

11-DC	11-deoxykortisol
21-DC	21-deoxykortisol
11-OHD	11-hydroxyláza
17-OHD	17-hydroxyláza
21-OHD	21-hydroxyláza
17-OHP	17-hydroxyprogesteron
ACN	Acetonitril
Act	Aceton
AND	Androstenedion
CAH	Kongenitální adrenální hyperplasie (z angl. „Congenital adrenal hyperplasia“)
CID	Kolizně indukovaná disociace
DBS	Suchá krevní kapka (z angl. „Dried blood spot“)
EB	Extrakční pufr
ESI	Elektrosprejová ionizace
FA	Kyselina mravenčí (z angl. „formic acid“)
FIA	Fluorescenční imunoanalýza
GC	Plynová chromatografie
GZ	Šedá zóna (z angl. „gray zone“)
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
KOR	Kortisol
LOD	Limit detekce
LOQ	Limit kvantifikace

MD	Mikrotitrační destička
MeOH	Methanol
M	Molární hmotnost
MRM	Monitorování více reakcí
m/z	Poměr hmotnost/náboj iontu
NK	Negativní kontrola
NS	Novorozenecký screening
PK	Pozitivní kontrola
RB	Rekonstituční pufr
S/N	Signál/šum (z angl. „signal/noise“)
THS	Tandemová hmotnostní spektrometrie
W	Voda
WIS	Interní značený standard (z angl. „Working internal standard“)

Obsah

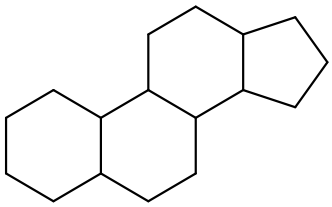
1 ÚVOD 10
1.1 Steroidní hormony 10
1.2 Kongenitální adrenální hyperplasie 11
1.3 Novorozenecký screening 14
1.3.1 Novorozenecký screening v historii a v ČR 14
1.3.2 Novorozenecký screening CAH 15
1.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie 16
1.5 Hmotnostní spektrometrie 18
1.5.1 Ionizace 18
1.5.2 Iontové zdroje – elektrosprej (ESI) 18
1.5.3 Hmotnostní analyzátory 20
1.5.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie 21
1.5.5 Sledování vybraných reakcí 22
1.5.6 Detektor částic 23
1.6 Metody pro diagnostiku CAH 24
1.6.1 Fluorescenční imunoanalýza (FIA) 24
1.6.2 Plynová chromatografie s hmotností detekcí (GC-MS) 25
1.6.3 Kapalinová hmotnostní chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí 25
1.7 Cíl práce 27
2 Experimentální část 28
2.1 Studované analyty 28
2.2 Použité chemikálie 29
2.3 Studované vzorky 30
2.3.1 Plazma/sérum 30
2.3.2 Suchá krevní kapka (DBS) 30
2.3.3 Použité biologické vzorky 31
2.4 Přístroje a vybavení 31
2.5 Vzorky a jejich příprava 31
2.5.1 Příprava kalibrace pro analýzu DBS 31
2.5.2 Příprava interního značeného standardu 32
2.5.3 Příprava kalibrace pro analýzu plazmy/séra 32
2.5.4 Příprava vzorků DBS 32
2.5.5 Příprava vzorků plazmy/séra 34

3 Výsledky a diskuze 35
3.1 Vývoj metody 35
3.1.1 Optimalizace MS parametrů 35
3.1.2 Optimalizace LC parametrů 36
3.1.3 Spojení LC-MS 38
3.1.4 Optimalizace extrakce DBS 40
3.2 Validace 42
3.2.1 LOD a LOQ 42
3.2.2 Opakovatelnost 42
3.2.3 Reprodukovatelnost 43
3.2.4 Linearita 44
3.2.5 Výtěžnost 44
3.2.6 Přenos vzorku 45
3.2.7 Matriční efekt 45
3.3 Klinická aplikace metody 46
3.3.1 Měření biologických vzorků suché krevní kapky 46
3.3.2 Měření biologických vzorků séra/plazmy 56
4 Závěr 57
5 Použitá literatura 58

1 ÚVOD

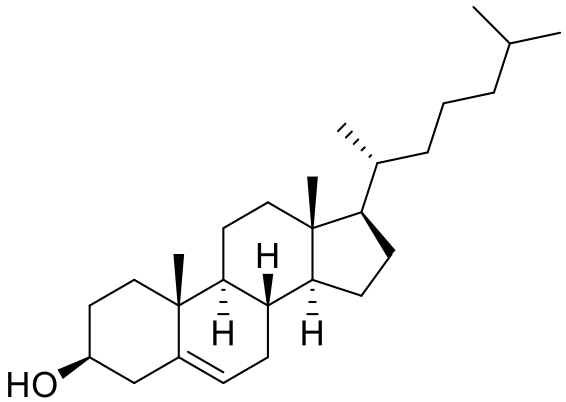
1.1 Steroidní hormony

Hormony jsou látky produkované žlázami s vnitřní sekrecí vylučované do krevního oběhu a krví transportovány k cílovým orgánům. Na cílové buňky, resp. na jejich receptory, působí buď přímo, nebo tím, že ovlivňují syntézu a sekreci sekundárního hormonu, který pak ovlivní příslušnou tkáň. Hormony můžeme klasifikovat podle původu, mechanismu, kterým vykonávají své účinky, či podle chemického složení[1]. Právě podle chemického složení jsou velkou skupinou steroidní hormony s typickým cyklopentaperhydrofenantrovým skeletem (Obr.1).



Obr.1: Struktura steranu, základu všech hormonů

Od steranu je odvozený i cholesterol (Obr.2), který stojí na začátku syntézy všech steroidních hormonů.



Obr.2: Struktura cholesterolu

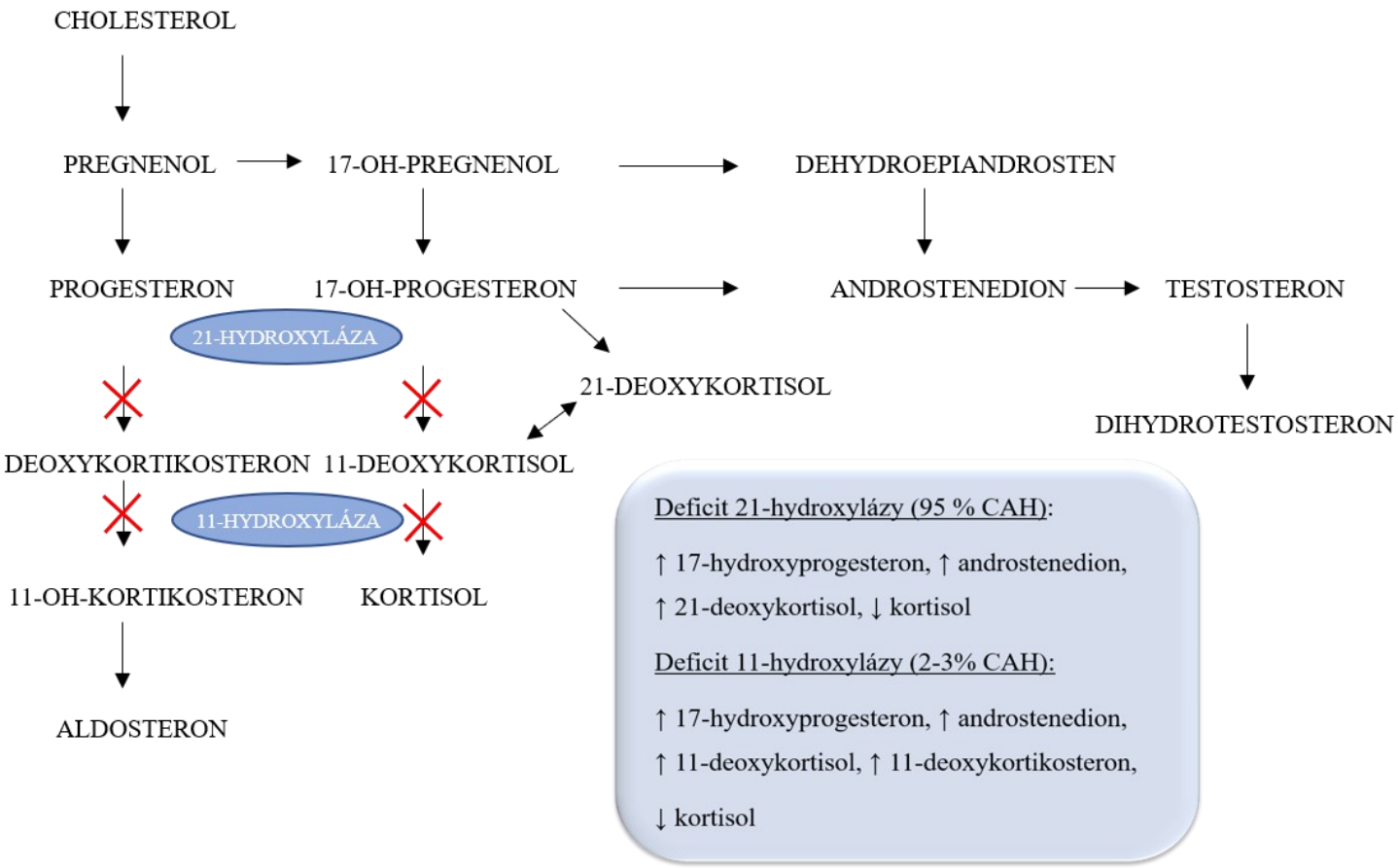
Podle počtu uhlíků se steroidní hormony dělí na kortikosteroidy, které se tvoří v kůře nadledvin a progestiny, které jsou prekurzory glukokortikoidů a sexuálních hormonů. Mezi glukokortikoidy řadíme kortisol, hormon, který tělo nutně potřebuje k přežití stresových situací a při dlouhodobém hladovění. Zvyšuje celkovou pohotovost při zátěžových situacích a obecně platí, že podporuje využívání energie ze zásob. Další významnou rolí je jeho protizánětlivý efekt. Snižuje imunitní odpověď a brání alergickým pochodům, což je důvod jeho častého užívání v medicíně[2].

1.2 Kongenitální adrenální hyperplasie

K syntéze kortisolu z cholesterolu je zapotřebí pěti enzymů: 21-hydroxylázy (21-OHD), 11-hydroxylázy (11-OHD), 3-hydroxysteroiddehydrogenázy, 17-hydroxylázy (17-OHD) a cholesteroldesmolázy[3]. Pokud je aktivita těchto enzymů snížená a nebo chybí úplně, pacienti nemohou účinně syntetizovat kortisol a v důsledku toho nadprodukují jeho prekurzory (Obr.3). Některé z těchto prekurzorů jsou ze své cesty odkloněny a jsou použity k biosyntéze pohlavních hormonů[4]. Nedostatek či úplný deficit 21-OHD (či jiného z výše vyjmenovaných enzymů), způsobený mutací genu CYP 21A2, má za následek onemocnění kongenitální adrenální hyperplasii (CAH)[5]. Deficit 21-OHD je příčinnou 95 % všech případů CAH,[6] a proto je klinická diagnostika orientována převážně na detekci tohoto defektu.

CAH je autozomálně recesivní dědičná porucha, která byla poprvé popsána již v roce 1865 patologem Luigi de Crecchiem[7]. V Evropě se toto onemocnění vyskytuje u jednoho novorozence z 10 až 15 tisíců, v ČR je pak četnost 1:12000[8]. V závislosti na závažnosti mutace a ztráty funkčnosti 21-OHD rozeznáváme u CAH dvě klinické formy - klasickou a neklasickou. Tzv. „salt-wasting“, je nejzávažnějším typem CAH a týká se 75 % všech případů klasické formy. Tato forma je život ohrožující, protože u ní dochází nejen k poškození syntézy kortisolu, ale také aldosteronu[9].

Aldosteron je hlavní mineralkortikoid, který je v našem těle zodpovědný za regulaci sodíku, vylučování draslíku, je zodpovědný za rovnováhu elektrolytů a za regulaci krevního tlaku[10]. Pokud nedojde k léčení, nízká hladina aldosteronu vede k hyponatrémii, hyperkalémii, k vývojovým poruchám, ke ztrátám hmotnosti, ke křečím, a nakonec i ke smrti novorozence[11].



Obr.3: Steroidogenní cesta představující patofyziologii deficitu 21-OHP a 11-OHP a naznačený zvýšený či snížený obsah hormonů v krvi při laboratorním vyšetření

Salt-wasting forma CAH také zahrnuje příznaky jako rychlý růst, růst pubického ochlupení, hluboký hlas, porucha menstruace (to vše před nástupem puberty), možné potíže s otěhotněním, nadměrné ochlupení obličeje u žen, těžké akné, nezhoubné nádory varlat a neplodnost u mužů. U novorozenců ženského pohlaví může být též dvojznačná genitálie.

Non-salt wasting neboli jednoduchá virilizující forma CAH je formou klasického deficitu 21-OHD. Tento typ představuje méně závažnou formu nedostatku aldosteronu a u novorozenců nedochází k ohrožení života. Stejně jako u salt-wasting formy mají novorozenci málo kortisolu a příliš mnoho androgenu, a proto se u novorozenců opět objevují nejednoznačné genitálie[12].

Neklasická verze CAH (NCAH) byla poprvé popsána v roce 1957[13]. Je jednou z nejčastějších autozomálně recesivních poruch, která je ovšem zřídka kdy diagnostikována, a to z důvodu velmi mírných symptomů nebo díky záměně diagnózy za např. syndrom polycystických vaječníků. Jestliže k odhalení nemoci přeci jen dojde, jedná se především o pacienty v adolescentní a dospělé fázi života. Na rozdíl od klasické verze CAH pacienti trpí pouze mírnou kortisolovou nedostatečností a hyperandrogenismem a jsou schopni přežít bez jakékoliv léčby[14]. Mezi příznaky neléčené NCAH patří především neplodnost, hirsutismus, akné, předčasná puberta, nádory nadledvinek a varlat[15].

Cílem léčby je stabilizovat hormonální rovnováhu a snížit nadměrnou produkci androgenů z nadledvin. Základem léčby je pak podávání hydrokortisonu a mineralkortikoidů. Dále se podává např. fludrokortison[16]. I při pečlivém zaléčení jsou pacienti s CAH při nemoci či stresu stále ohrožováni tzv. nadledvinovými krizemi a je nutné jim při těchto situacích podávat více léků, aby ke krizi nedošlo.[12]

1.3 Novorozenecký screening

1.3.1 Novorozenecký screening v historii a v ČR

Novorozenecký screening (NS) je aktivní a celoplošné vyhledávání chorob v jejich časném, novorozeneckém preklinickém stadiu tak, aby se tyto choroby diagnostikovaly a léčily dříve, než se stačí projevit a způsobit dítěti nevratné poškození zdraví. V užším slova smyslu se novorozeneckým screeningem rozumí tzv. novorozenecký laboratorní screening (NLS). Spočívá v diagnostice screeningových onemocnění na základě stanovení koncentrace specifické látky (event. i průkazu genové mutace, či enzymové insuficience) v suché kapce krve na filtračním papírku – tzv. novorozenecké screeningové kartičce, která je odebírána všem novorozencům na území státu České republiky[17].

První novorozenecký screeningový (NS) program byl zahájen v 60.letech 20.století v USA[18]. Za zakladatele novorozeneckého screeningu je považován profesor Robert Guthrie. Ten jako první vyvinul mikrobiologickou metodu, která umožnila, díky odběru krve z paty novorozence na filtrační papírek, detekovat zvýšenou hladinu fenylalaninu a odhalit tak případnou fenylketonurii[19]. V České republice, stejně jako v USA, byl taktéž jako první zaveden NS fenylketonurie.

Od 1.6.2016 se v ČR vyšetřuje 18 onemocnění a to:

a) vrozená snížená funkce štítné žlázy (kongenitální hypotyreóza – CH)
b) vrozená nedostatečnost tvorby hormonů v nadledvinách (kongenitální adrenální hyperplasie – CAH)
c) vrozená porucha tvorby hlenu (cystická fibróza – CF)
d) dědičné poruchy látkové výměny aminokyselin:
    - vrozená porucha látkové výměny aminokyseliny fenylalaninu (fenylketonurie – PKU a hyperfenylalaninemie – HPA)
    - argininémie (ARG)
    - citrulinémie I. typu (CIT)
    - vrozená porucha látkové výměny větvených aminokyselin (leucinóza, nemoc javorového sirupu – MSUD)
    - homocystinurie z deficitu cystathionin beta-syntázy (CBS),
    - homocystinurie z deficitu methylentetrahydrofolátreduktázy (MTHFR)
    - glutarová acidurie typ I (GA I)
    - izovalerová acidurie (IVA)

e) dědičné poruchy látkové výměny mastných kyselin:
   - deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin se středně dlouhým řetězcem (deficit MCAD)
   - deficit 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s dlouhým řetězcem (deficit LCHAD)
   - deficit acyl-CoA dehydrogenázy mastných kyselin s velmi dlouhým řetězcem (deficit VLCAD)
   - deficit karnitinpalmitoyltransferázy I (deficit CPT I)
   - deficit karnitinpalmitoyltransferázy II (deficit CPT II)
   - deficit karnitinacylkarnitintranslokázy (deficit CACT)
f) dědičná porucha přeměny vitamínů:
   - deficit biotinidázy (BTD)[17]

1.3.2 Novorozenecký screening CAH

První NS CAH byl zahájen v roce 1977 v USA[20]. Ke stanovení byla opět, stejně jako u NS fenylketonurie, použita kapilární krev z paty novorozence. Při CAH se díky nefunkčnosti enzymu 21-OHD hromadí v séru 17-hydroxyprogesteron (17-OHP)[21] a právě toho se při stanovení využívá. Koncentrace 17-OHP byla poprvé stanovena pomocí imunoanalýzy a následně se tato metoda začala používat ve více než 40 zemích po celém světě[22]. Screeningové testy však přinášely velké množství falešně pozitivních výsledků,[23] a to například z důvodu toho, že předčasně narozené děti často vykazují vysoké hladiny 17-OHP kvůli stresu nebo mají opožděné zrání enzymu 11-OHD[24]. K vysokému počtu falešně pozitivních výsledků navíc přispívají také reakce používaných specifických protilátek s jinými steroidy[25]. Pro zlepšení této situace byla vyvinuta nová metoda využívající spojení kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie. Ta byla založená na současném stanovení 17-OHP, kortisolu a androstenedionu v suché krevní kapce (DBS z angl. „Dried Blood Spot“)[26].

Tento instrumentální přístup však nelze z důvodu kvantity využít pro analýzu všech vzorků NS, ale pouze k ověření některých nálezů. I nadále jsou tedy všechny NS programy založeny na imunoanalytických metodách a zůstávají tak zatíženy značnou falešnou pozitivitou.

1.4 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Kapalinová chromatografie je separační metoda využívající různou distribuci analytů ve směsi mezi mobilní (MF) a stacionární fází (SF) s následnou detekcí. Mezi nejrozšířenější techniky patří vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC)[27]. HPLC vyniká vysokou účinností, dobrou opakovatelností a robustností. Čas, který stráví analyt v jedné nebo druhé fázi, závisí na afinitě analytu ke každé z nich. Kolikrát více času stráví analyt ve stacionární fázi, než ve fázi mobilní udává jedna z nejužívanějších retenčních veličin – Retenční poměr (Vzorec 1).

$$k = \frac{t_{R,i}^{'}}{t_M} = \frac{t_{R,i} - t_M}{t_M}$$

Vzorec 1: k – retenční poměr, $t'_{R,i}$ – redukovaný retenční čas, t_M – mrtvý čas.

MF tvoří čisté rozpouštědlo, nebo směs mísitelných rozpouštědel. Polarita MF ovlivňuje rovnováhu mezi analytem a stacionární fází (SF) a tím i retenční vlastnost analytu. Pro získání optimálního rozlišení je často nutné pracovat s gradientem složení mobilní fáze. Stacionární fáze a její vlastnosti se liší podle požadovaného mechanismu separace. Kolonová chromatografie používá především náplňové kolony[27].

V současné době se v téměř v 90 % případů chromatografických analýz používají takzvané systémy s obrácenými fázemi (RP). Využívají se v systémech s kapalnou SF vázanou na reaktivním nosiči nebo v systémech s kapalnou SF fyzikálně zakotvenou na inertním chromatografickém nosiči. Jako chromatografický reaktivní nosič se pro přípravu chemicky vázaných SF používá většinou silikagel. Modifikace povrchu silikagelu se pak nejčastěji provádí navázáním funkčních skupin -C_{18}, -CH_3, -NH_2, -CN, fenylu a diolu. Jako MF se používají vodné roztoky acetonitrilu, methanolu, tetrahydrofuranu, dioxanu a diethyletheru[28].

K detekci v HPLC separaci slouží detektor s následujícími požadavky. Detektor by měl mít vysokou citlivost a nízkou úroveň šumu, neměl by přispívat k rozšiřování chromatografických zón. Měl by být lineárně závislý na koncentraci v širokém koncentračním rozsahu a měl by být robustní vůči změnám tlaku, průtoku mobilní fáze a teploty[29]. Nejpoužívanějšími detektory v HPLC jsou ty, které jsou založené na spektroskopických měřeních (UV/VIS) a fluorescenci. Dalším typem, který se často ve spojení s HPLC používá je hmotnostní spektrometr. Jeho výhodou jsou jeho nízké detekční limity (100 pg – 1 ng). Hmotnostní spektrometr navíc poskytuje kvalitativní strukturní informace, které mohou pomoci analyty identifikovat[30].

1.5 Hmotnostní spektrometrie

Počátky hmotnostní spektrometrie (MS) sahají do konce 19.století, kdy byly prozkoumány principy pohybu nabitých částic v elektrickém a magnetickém poli[31]. Za zakladatele a vynálezce hmotnostního spektrometru je považován Sir Joseph J. Thomson. MS je analytická metoda založená na interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem ve vakuu a jejich následné dělení dle poměru jejich hmotnosti a náboje *(m/z)*. Hmotnostní spektrometr je považován za téměř ideální detektor pro mnoho separačních technik jako například plynová chromatografie (GC), HPLC nebo kapilární elektroforéza. Jeho velikou přednostní je především vysoká citlivost, vysoká selektivita a zároveň univerzálnost. Také umožňuje jak kvantitativní, tak kvalitativní analýzu a v neposlední řadě ani nijak výrazně nepřispívá k rozšiřování chromatografické zóny[32]. Všechny hmotnostní spektrometry se skládají ze tří základních částí – iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor částic[33].

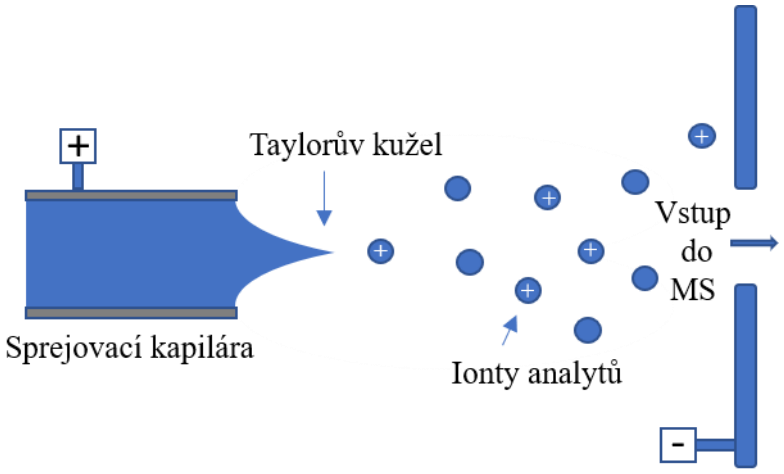
1.5.1 Ionizace

Prvním krokem MS analýzy je produkce iontů v plynné fázi. Ionizační techniky, které mohou být k ionizaci použity, zahrnují například elektronovou ionizaci (EI), chemickou ionizaci (CI), termosprej (TSP), elektrosprej (ESI) a MALDI.

1.5.2 Iontové zdroje – elektrosprej (ESI)

Elektrosprejová ionizace (ESI) je nejpoužívanější typ iontového zdroje při spojení s HPLC. Její velká oblíbenost je zapříčiněna především díky vysoké toleranci k různým typům rozpouštědel, akceptování široké škály průtoků a schopnosti vytvářet mnohonásobně nabité ionty. Řadí se mezi měkké ionizační techniky, kdy dochází k produkci nabitých iontů, např. $[M+H]^+$.

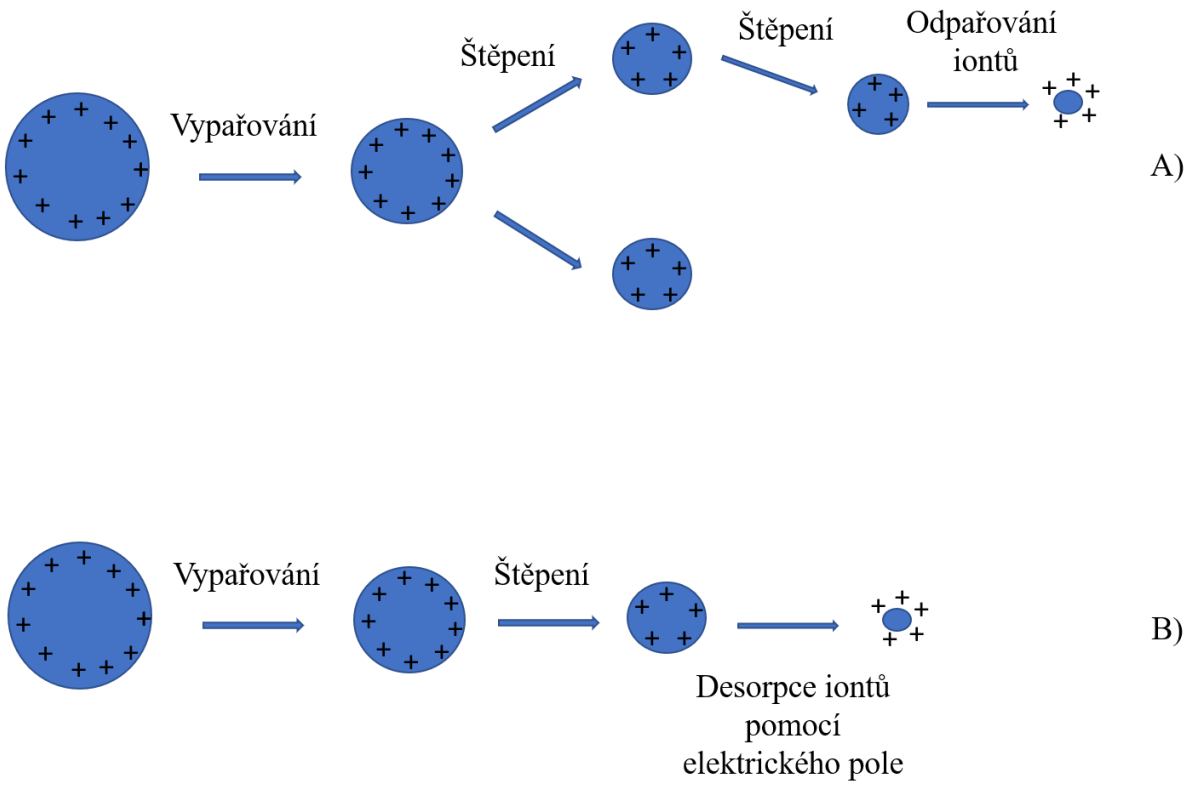
Základní princip ESI je naznačen pomocí schématu na Obr.4. Zahrnuje celkově tři základní procesy, a to tvorbu kapiček, smršťování kapiček rozpouštědla a tvorbu plynných iontů. Na počátku procesu se vlivem vysokého napětí vloženého na kovovou sprejovací kapiláru vytvoří sprej ve tvaru tzv. Taylorova kužele[34].



Obr.4: Schéma ESI, vlastní nákres podle http://www.muj-web.cz/vyuka/MS/files/02_MC230P83_2020.pdf

Přesný mechanismus vzniku plynných iontů z nabitých kapiček se nyní opírá o dvě teorie. Podle modelu zbytkového náboje (Obr.5-A) se kapky zmenšují v důsledku odpařování rozpouštědla, zvyšuje se hustota náboje na jejich povrchu, dokud nedosáhne hranice tzv. Reyleighovi nestability. V ten okamžik repulzní coulombické síly přesáhnou povrchové napětí kapiček a to způsobí, že se kapky rozpadnou na menší, vysoce nabité kapičky. Tento proces se několikrát opakuje, dokud není velikost kapiček tak malá, že obsahuje pouze jednu molekulu. Když dojde k úplnému odpaření rozpouštědla, je tato molekula dispergována do okolního plynu, přičemž má zachovanou část náboje kapiček.

Ve druhém, iontově desorpčním modelu (Obr.5-B) se také opakuje odpařování rozpouštědla a zmenšování kapiček. Avšak místo toho, aby se kapička stala tak malou, že by obsahovala pouze jednu molekulu, je při určité střední velikosti kapek elektrické pole v důsledku hustoty povrchového náboje tak vysoké, že překoná kohezní síly kapiček, což vede k přímé desorpci iontů. Iontově desorpční model je přijímán více než model zbytkového náboje[35].



Obr.5: Znázornění procesů, které se podílejí na přeměně iontů z kapiček na plynnou fázi. A) Model zbytkového náboje, B) Iontově desorpční model. (vlastní nákres podle cit.[35])

1.5.3 Hmotnostní analyzátory

Klíčovou částí hmotnostního spektrometru je analyzátor, ve kterém dochází k separování iontů v plynné fázi na základě poměru hmotnosti a náboje *(m/z)*. K separaci iontů dochází díky působení statického nebo dynamického elektrického a magnetického pole, případně jejich kombinací. Jako hmotnostní analyzátory se používají např. analyzátor doby letu, iontová past nebo kvadrupólový analyzátor či různé hybridní systémy.

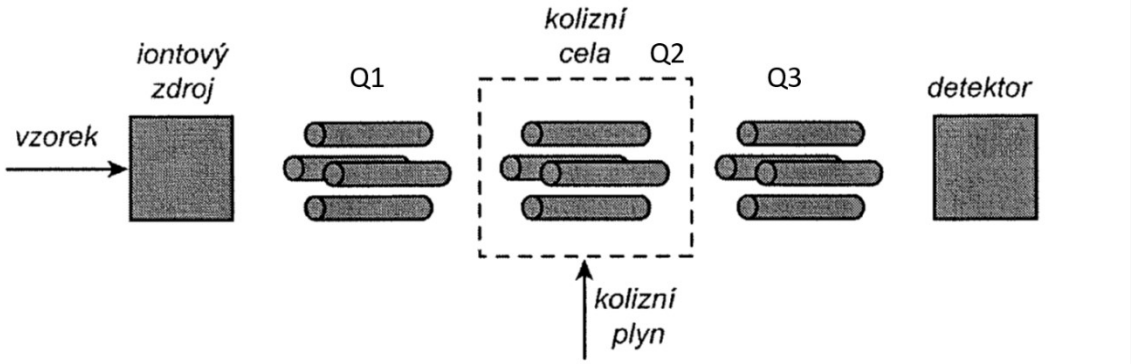
1.5.3.1 Kvadrupólový analyzátor

Kvadrupólový analyzátor je jedním z nejpoužívanějších typů analyzátorů. Jedná se o cenově dostupný analyzátor, který se rozšířil zejména u tzv. stolních ("bench-top") hmotnostních spektrometrů pro spojení se separačními technikami (GC/MS, HPLC/MS). Vyznačuje se také svojí jednoduchostí, dlouhou výdrží a spolehlivostí[36]. Skládá se ze čtyř stejných kovových tyčí kruhového průřezu délky 20-30 cm. Na dvě protilehlé tyče je pak vkládáno kladné, stejnosměrné napětí, na zbývající dvě záporné stejnosměrné napětí. Na všechny tyče je také vloženo vysokofrekvenční střídavé napětí. V okamžiku, kdy je ion

přiveden do středu osy kvadrupólu, začne oscilovat. Ion specifického poměru *m/z* bude stabilní a může procházet kvadrupólem pouze tehdy, když je použita specifická kombinace napětí stejnosměrného a vysokofrekvenčního. Kvadrupóly se proto také nazývají hmotnostními filtry[37].

1.5.3.2 Trojitý kvadrupólový analyzátor (QQQ)

Zatímco kvadrupólový analyzátor obsahuje jen jeden hmotnostní filtrační kvadrupól, ten trojitý, jak už název napovídá, se skládá ze tří kvadrupólů řazených za sebou (Q1-Q3) (Obr.6). Q1 pracuje jako hmotnostní filtr pro konkrétní *m/z* (tzv. prekurzorový iont), Q2 funguje jako kolizní cela a vzniklé fragmenty jsou pak analyzovány pomocí Q3[38]. Trojitý kvadrupól je významnou součástí tandemové hmotnostní spektrometrie.



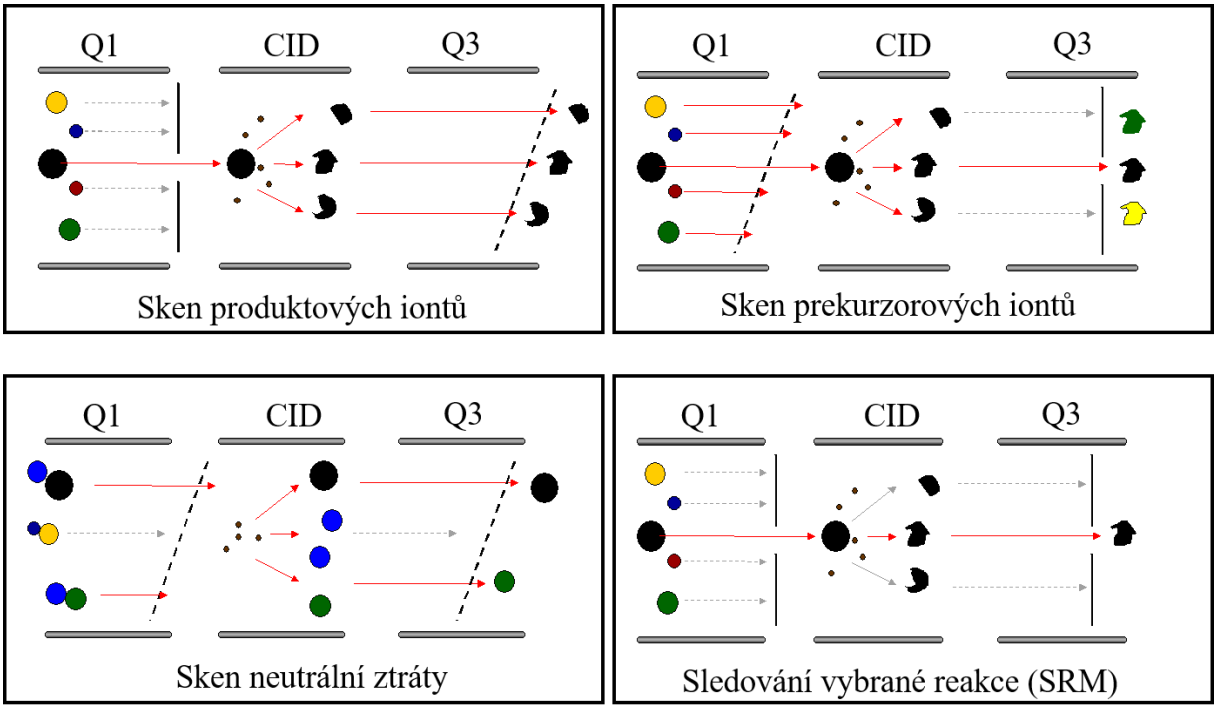
Obr.6: Schéma trojitého kvadrupólu, (vlastní úprava obrázku z cit.[27])

1.5.4 Tandemová hmotnostní spektrometrie

Se všeobecným rozšířením ionizace elektrosprejem a laserové desorpce – ionizace za účasti matrice (MALDI) silně vzrostla potřeba fragmentovat ionty za účelem strukturní analýzy, kvantitativní analýzy a studia fyzikálně-chemických vlastností iontů. Tandemová hmotnostní spektrometrie (THS nebo také MS/MS či MS^2) tak dnes zaujímá významné postavení a široké uplatnění v oblasti analytické hmotnostní spektrometrie. THS se používá pro experimenty a výsledky z dvojího typu hmotnostních spektrometrů. Za prvé, když se nachází dva hmotnostní analyzátory za sebou, tzv. THS v prostoru. Za druhé, pokud máme jeden analyzátor, který dovede zachytit specifický ion, následně ho excitovat a změřit hmotnostní spektrum vzniklých produktů, to je tzv. THS v čase. Typické měření v THS se sestává ze tří kroků. Prvním z nich je izolace iontu prekurzoru, následuje aktivace/vybuzení vnitřní energie iontu (např. srážkou s neutrálním plynem), následuje jeho rozpad. Posledním krokem procesu je pak analýza

vzniklých fragmentů. Nejběžnější a technicky jednoduše proveditelný způsob vyvolání fragmentace je aktivace srážkami. Aby se rozptylem nesnižovala intenzita částic, v praxi jsou srážky prováděny buďto ve srážkových komorách (ty soustřeďují ionty podél osy pomocí radiofrekvenčních polí, tzv. THS v prostoru), nebo v iontových pastech (tzv. THS v čase)[39]. Počet kroků je variabilní a je možné je navýšit až na MS^n [40].

Spojení dvou hmotnostních analyzátorů v prostoru umožňuje několik unikátních skenovacích funkcí, které nelze provést s jednotlivým analyzátorem[38]. Typy jednotlivých skenů v MS/MS se nachází na Obr.7.



Obr.7: Typy skenů používaných v MS/MS ve spojení s trojitým kvadrupólem, CID – kolizně indukovaná disociace (plná čára = Q ve statickém módu, přerušovaná čára = Q ve skenovacím módu)

1.5.5 Sledování vybraných reakcí

THS je často provozováno v režimu sledování vybrané reakce (SRM). V tomto případě nezískáme celé produktové iontové spektrum, ale místo toho jsou analyzátory upraveny tak, aby monitorovaly pouze jeden nebo dva vybrané páry prekurzorů/produktů analytu. Monitorování více než jedné reakce se příznačně nazývá monitorování více reakcí (MRM)[35].

MRM je nejčastější způsob použití MS/MS pro kvantitativní analýzu. Umožňuje zvýšenou citlivost a selektivitu. První kvadrupól filtruje specifický prekurzorový iont, který nás zajímá. Ionty generované ve zdroji mající jinou *m/z* tak nemohou projít Q1. V kolizní cele

dochází k fragmentaci prekurzorového iontu v důsledku srážek s neutrálním kolizním plynem, jako je např. dusík. Tento proces se nazývá kolizně indukovaná disociace (CID). Generované produktové ionty se přenesou do třetího kvadrupólu, kterým projde opět pouze iont s určitým *m/z*. Všechny ostatní ionty produktu jsou odfiltrovány ve Q3[37].

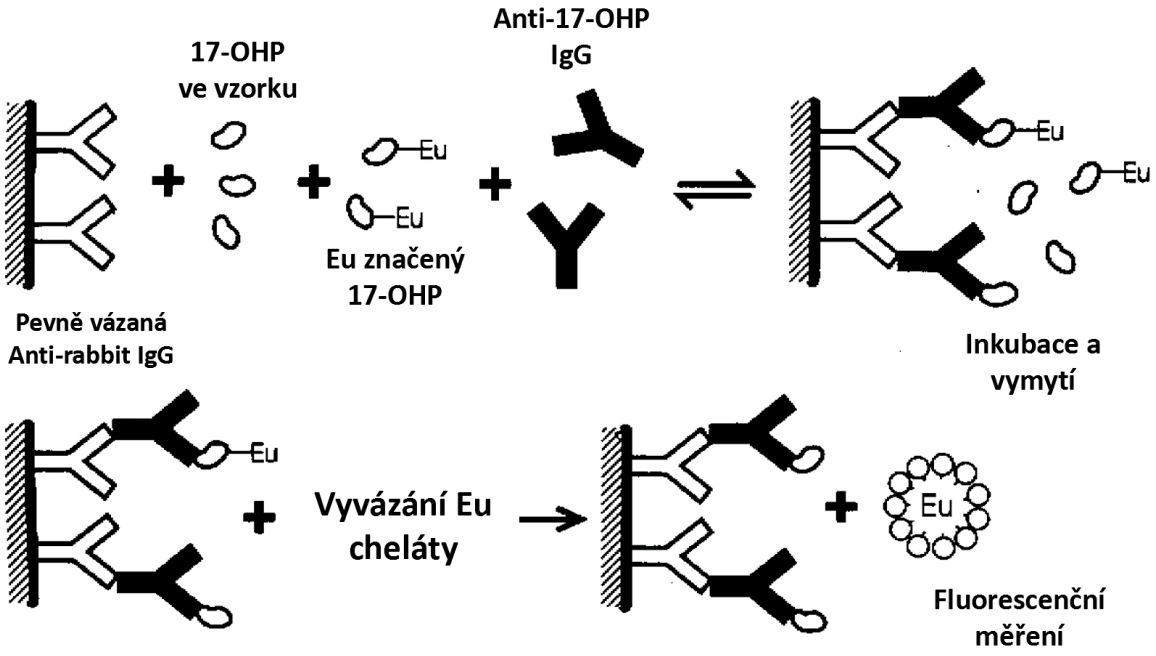
1.5.6 Detektor částic

Ionty, které byly odděleny hmotnostním analyzátorem doputují k detektoru pro detekci jejich hmotnosti a četnosti. Detektor pak měří intenzitu proudu iontů, které na něj dopadly a převádí ji na měřitelnou veličinu (elektrický proud). Základními vlastnostmi jakéhokoli iontového detektoru jsou citlivost, správnost, rozlišení a doba odezvy[37]. Jako detektory se používají dynody (např. Faradayův detektor), elektronové násobiče či fotonásobiče.

1.6 Metody pro diagnostiku CAH

1.6.1 Fluorescenční imunoanalýza (FIA)

Fluorescenční imunoanalýza (FIA) je vysoce citlivá a specifická metoda pro stanovení antigenních substancí jako jsou hormony, léky, imunoglobuliny a jiné. Základním principem FIA je kompetitivní vazebná reakce, kde analyt (antigen) soutěží s fluorescenčně značeným antigenem o vazbu na fixovanou protilátku nebo vazebná místa receptoru. Vazba neznačeného antigenu na omezené množství protilátky způsobuje vytěsnění fluorescenčně značeného antigenu a vede ke snížení fluorescence komplexu antigen-protilátka. V případě detekce CAH se využívá antigen značený europiem. Princip stanovení se nachází na schématu - Obr.8.



Obr.8: Princip FIA metody pro stanovení 17-OHP v rámci kitu novorozeneckého screeningu CAH (obrázek upraven z příbalového letáku kitu firmy Perkin Elmer (https://newbornscreening.perkinelmer.com)

V rámci novorozeneckého screeningu se z důvodu velkého množství vzorků používají pro detekci pacientů s CAH právě imunometody, které jsou většinou realizována ve formátu komerčně dodávaného kitu, schopného takové množství analyzovat v relativně krátkém časovém intervalu od narození. Stanovení probíhá na základě měření koncentrace jednoho parametru a to 17-OHP. Jak však bylo zmíněno výše (kap. 1.3.2), tento diagnostický přístup generuje značné množství falešně pozitivních (a v některých případech i negativních), a tedy nespolehlivých výsledků. Mezi faktory přispívající k falešně pozitivnímu screeningu patří

například stres, relativní nezralost nadledvin a interferující steroidy[7]. K potvrzení dat získaných FIA metodou se proto používají více specifické metody popsané v následujících dvou odstavcích.

1.6.2 Plynová chromatografie s hmotností detekcí (GC-MS)

Separace v plynové chromatografii probíhá v kapilární nebo náplňové koloně, která obsahuje stacionární fázi (sorbent) a mobilní fázi (nosný plyn). Plynná mobilní fáze zde slouží pouze k transportu analytů a neovlivňuje stacionární fázi. GC je vhodná pro analýzy těkavých a tepelně stabilních látek. Pro metodu GC je charakteristická především účinná a rychlá separace složitých směsí a práce s malými množstvími vzorku za použití relativně jednoduché aparatury[28].

Plynová chromatografie ve spojení s hmotnostní spektrometrií je nepostradatelná v oborech environmentální vědy, v oboru forenzní vědy, ve zdravotnictví, i v lékařském a biologickém výzkumu[41]. Z důvodu strukturní povahy stanovovaných analytů byla metoda GC-MS první volbou při diagnostice CAH z biologických vzorků séra a moče. Instrumentální metodika GC-MS byla, a stále je častá pro stanovení steroidních látek, kde je využíváno její přednosti vysoké separační účinnosti a citlivosti, nezbytné pro složité biologické matrice[42]. Nevýhodou tohoto přístupu je nutnost extrakce a derivatizace každého vzorku. Komplikace jsou také spojeny s přípravou vzorku pro analýzu v případě použití matrice suché krevní kapky.

S rozvojem tandemových technik MS a vysoce citlivých systémů je v poslední dekádě znát zřetelný posun od využití GC-MS technik k technikám LC-MS/MS, které s méně náročnou přípravou vzorků poskytnou větší množství informací o látkách přítomných v analyzovaném vzorku[43].

1.6.3 Kapalinová hmotnostní chromatografie s tandemovou hmotnostní detekcí (LC-MS/MS)

Při analýze 17-OHP, který je klíčový u diagnostiky CAH, docházelo při použití GC-MS k vyšší míře falešné pozitivity. Za hlavní zdroj kontaminace, a tedy i za navyšování hladiny 17-OHP, je odpovědný 17-OH-pregnelon sulfát[25]. V roce 2009 pak byla provedena studie, která GC-MS metodu považuje za vhodnou techniku pro diagnostiku CAH, ale zároveň potvrzuje, že tato metoda není spolehlivá pro potvrzení výsledků z NS, kde je používán vzorek suché krevní kapky[44]. Proto byl vyvinut sekundární test, který byl založen na LC-MS/MS. Ten měl sloužit jako potvrzovací u případů, které vyšly pozitivní při provedení imunoanalýzy[45]. Dále bylo zjištěno, že pokud se společně se 17-OHP stanovují také androstenedion (AND) a kortisol

(KOR), výrazně se snížil počet falešných pozitivit,[46] ale stále to bylo relativně vysoké číslo. Do analýzy byly proto zahrnuty další specifické analyty. Jedním z nejdůležitějších byl 21-deoxykortisol (21-DC), který je o jeden hydroxylační krok blíže ke kortisolu než 17-OHP, a proto by měl být i lepším diagnostickým markerem. 17-OHP má ústřední roli v biosyntéze steroidů, která vede buď ke kortisolu nebo k androgenům, u 21-DC se androgeny tvoří jen v případě, pokud je nedostatek 21-OHP. Existuje mnoho důvodů, proč se v séru může objevit zvýšená hladina 17-OHP. Jsou to např. již zmíněné předčasné narození novorozence, porodní hmotnost nebo stres[47]. Později se ukázalo, že kvantifikace 21-DC by mohla umožňovat přesnější diagnózu stavu nezávisle na předčasném narození, porodní hmotnosti, či jiných faktorech. Přesto tato informace bude vyžadovat pečlivé ověření a screeningové programy budou pokračovat v měření 17-OHP i 21-DC, aby bylo možné objektivně porovnat výsledky s oběma analyty[48]. Následně byla publikována další studie, jejíž panel zahrnoval měření 17-OHP, AND, KOR, 11-DC a 21-DC a při níž bylo použito jen 50 µL krevního séra[49].

Navzdory tomuto pokroku ve vývoji diagnostických metod na bázi MS, existují některá omezení instrumentální a interpretační. Pokud pracujeme se vzorkem DBS, máme k dispozici cca 3 µL zaschlé krve, která musí být převedena do měřitelného roztoku, což klade velké požadavky na způsob přípravy vzorku a citlivost detekce. V případě těchto steroidních látek se pohybujeme v koncentracích jednotek ng/ml, resp. nmol/l. Rozmanité spektrum strukturních analogů v biologické matrici také znamená, že tyto podobné látky mohou být detekovány na sledovaném MRM přechodu a mohou tedy interferovat s měřeným analytem. V rámci interpretace je pak klíčové rozhodnout, které koncentrace analytů, či jejich vzájemné profily, budou brány jako suspektně pozitivní.

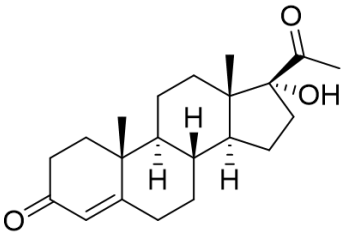
1.7 Cíl práce

Cílem této diplomové práce je vývoj a aplikace LC-MS/MS metodiky pro vybrané steroidní látky, které jsou aktivní v metabolismu kortisolu s ohledem na diagnostiku onemocnění CAH. Vyvinutá metoda bude následně zvalidována a bude ověřena její použitelnost pro měření klíčových metabolitů v biologické matrici suché krevní kapky. Dále bude metoda použita k měření klinických vzorků a bude vyzkoušena schopnost metody rozpoznat pacienty od negativních kontrol. Na základě výsledků z měření budou určeny diagnostické parametry, které by pomohly snížit vysokou falešnou pozitivitu, kterou je zatížen program novorozeneckého screeningu CAH. Cílem diplomové práce je také ověřit, zda lze metodu využít i pro měření ze vzorku séra, respektive plazmy.

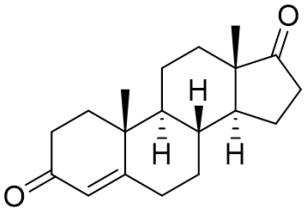
2 Experimentální část

2.1 Studované analyty

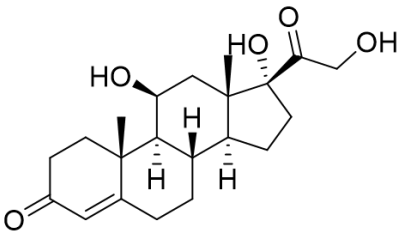
Na následujícím obrázku (Obr.9) se nacházejí analyty stanovované v této diplomové práci.



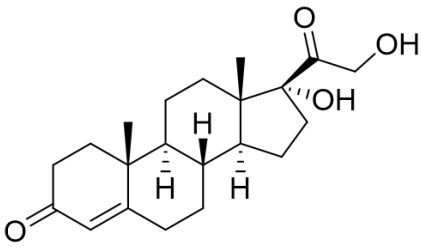
17-OH-progesteron
M = 330,46 g/mol



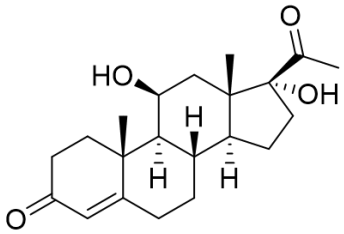
Androstenedion
M = 286,41 g/mol



Kortisol
M = 362,46 g/mol



11-deoxykortisol
M = 346,46 g/mol



21-deoxykortisol
M = 346,46 g/mol

Obr.9: Struktury a molární hmotnosti studovaných metabolitů

2.2 Použité chemikálie

Acetonitril ≥ 99,9% (Honeywell, Riedel-de Haën, Německo)

Kyselina mravenčí, 98% (Honeywell, Fluka, Německo)

Metanol pro LC-MS, min. 99,95% (Biosolve, Nizozemsko)

Voda pro HPLC LC-MS (VWR CHEMICALS, USA)

17-α-hydroxyprogesteron (M = 330,46 g/mol) , CAS No. 68-96-2 (Sigma, Čína)

Androstenedion (M = 286,41 g/mol), CAS No. 63-05-8 (Sigma, Německo)

Kortisol (M = 362,46 g/mol), CAS No. 50-23-7 (Sigma, Německo)

11-deoxykortisol (M = 346,46 g/mol) CAS No. 152-58-9 (Sigma, USA)

21-deoxykortisol (M = 346,46 g/mol) CAS No. 641-77-0 (Sigma, Israel)

17-α-hydroxyprogesteron-d_8 (M = 338,51 g/mol) CAS No. 850023-80-2 (CDN isotopes, Kanada)

Androstenedion-d_7 (M = 293,45 g/mol) CAS No.67034-85-9 (CDN isotopes, Kanada)

Hydrokortison-d_4 (M = 366,48 g/mol) CAS No.73565-87-4 (CDN isotopes, Kanada)

11-deoxykortisol-d_2 (M = 348,48 g/mol) CAS No.1271728-08-5 (CDN isotopes, Kanada)

21-deoxykortisol-d_8 (M = 354,51 g/mol) CAS No.641-77-0 (CDN isotopes, Kanada)

2.3 Studované vzorky

2.3.1 Plazma/sérum

Krevní plazma je tekutá složka krve, která vytváří suspenzní prostředí pro krvinky a krevní destičky. Její nažloutlé zbarvení podmiňují ve velké míře barviva vznikající při rozkladu hemoglobinu. Skládá se z vody (90-92 %) a z organických a anorganických látek (8-10 %) a tvoří asi 4 % tělesné hmotnosti[50].

Plazma je ta část krve, která obsahuje krevní fibrinogen, zatímco sérum je tekutá část krve a neobsahuje srážecí faktory. Plazmu a sérum lze extrahovat odstředěním krve[51]. Pokud není bezprostředně analyzována, je zamražena na teplotu – 30 °C resp. – 80 °C, dle charakteru testovaného analytu.

2.3.2 Suchá krevní kapka (DBS)

Suchá krevní kapka (DBS) je příklad biologického vzorku, který je široce používaný v mnoha bioanalytických testech a hraje významnou roli při screeningu dědičných metabolických chorob nebo v léčbě a diagnostice infekčních chorob[52]. Také byl prokázán klinický potenciál DBS pro genomiku, a to již v roce 1987[53]. DNA extrakce z DBS umožňuje detekci mutací, které jsou zodpovědné za např. cystickou fibrózu[54] nebo spinální svalovou atrofii[55].

DBS se získává pomocí obtisku kapilární krve na speciální vzorkovací (filtrační) papír, je usušena a následně zaslána do laboratoře, kde může být analyzována. Velkou přednostní tohoto vzorku je především jeho příprava, která je velmi jednoduchá a je zvládnutelná i samotnými pacienty. Také neexistuje prakticky žádné riziko při přepravě vzorků, které lze bezpečně posílat i jako standardní zásilku[56]. Výzkumy také uvádějí, že některé metabolity mají lepší stabilitu, pokud jsou uchovávány ve formě „blotované“ krve, než když jsou ve formě plazmy[57]. Stabilita DBS vzorku je pro různé analyty různá. Vzorky mohou být stabilní po dobu minimálně sedmi dnů[58], také ale několik měsíců (farmaceutická léčiva, opiáty, NK)[59], až dokonce více než 20 let (vitamin D)[60]. Také se ukázalo, že uchovávání vzorků při teplotě –20 °C nebo –80 °C zvyšuje jejich stabilitu ze dnů (měsíců) až na několik let[61].

Jednou z mála komplikací je velmi malý objem krve zachycený na filtračním papírku (cca 50 μL) a proto je k analýze zapotřebí velmi citlivé metody. V praxi se po vyražení „terčíku“

z DBS (průměr 3.2 mm, objem krve cca 4 μL) a jeho extrakci v extrakčním rozpouštědle používá pro kvantifikaci či detekci obsažených analytů tandemová hmotnostní spektrometrie[58].

2.3.3 Použité biologické vzorky

Všechny biologické vzorky byly použity v souladu a s cílem zlepšení programu detekce pacientů s CAH v rámci novorozeneckého screeningu ČR. Vzorky byly odebrány a skladovány standartním způsobem, dle doporučení klinické laboratoře. Tedy, novorozenecký vzorek DBS byl odebrán 48-72 hodin po porodu, po zaschnutí transportován za běžné teploty a před analýzou skladován při teplotě – 20 °C. Plazma/sérum byla získána centrifugací plné krve, bezprostředně po odběru a v zamraženém stavu transportována do laboratoře, vzorky byly uchovávány při teplotě – 20 °C. Vzorky plazmy/séra byly anonymní.

2.4 Přístroje a vybavení

Hmotnostní spektrometr (QTRAP 6500+ System, Sciex, USA)

HPLC (Nexerax2 LC-30AD, Shimadzu, Japonsko)

DBS Puncher (Perkinelmer, USA)

Vortex – Titramax 101/1000 (Heidolph, Německo)

Vzorkovací filtrační papír Whatman 903 (Sigma, Německo)

Mikrotitrační destička (Well Plate 96, Chromsystems, Německo)

Centrifuga – Universal 320R (Hettich, Německo)

Běžné laboratorní vybavení (špičky, pipety, analytické váhy)

Programy na vyhodnocování: MedCalc ® Version 14.8.1, Analyst ® 1.6.3 (Sciex)

2.5 Vzorky a jejich příprava

2.5.1 Příprava kalibrace pro analýzu DBS

Kvantifikace jednotlivých analytů při stanovení ze suché krevní kapky byla realizována pomocí kalibrace připravené jako DBS kalibrační bod. Byla odebrána plná krev do zkumavky obsahující EDTA, čili tzv. nesrážlivá krev. Následně byla do definovaného objemu krve přidána ve směsi odstupňovaná koncentrace jednotlivých analytů (17-OHP, AND, 11-DC, 21-DC a KOR) tak, aby vznikl roztok krve o koncentraci 0; 2; 5; 10; 20; 50; 100; 200 a 500 ng/ml pro 17-OHP, AND, 21-DC, 11-DC, respektive 0; 20; 50; 100; 200 a 500 ng/ml pro KOR.

Kalibračním bodem 0 ng/ml byla krev bez přídavku standardu. Takto vzniklá směs byla pipetou nakapána („spotována“) na speciální odběrový papírek Whatman typ 903. Krevní spoty byly pak přes noc usušeny za laboratorní teploty a následně uloženy do mrazáku. Z následných dat měření vyplynulo, že takto připravené vzorky jsou při teplotě - 20 °C stabilní minimálně 6 měsíců.

2.5.2 Příprava interního značeného standardu

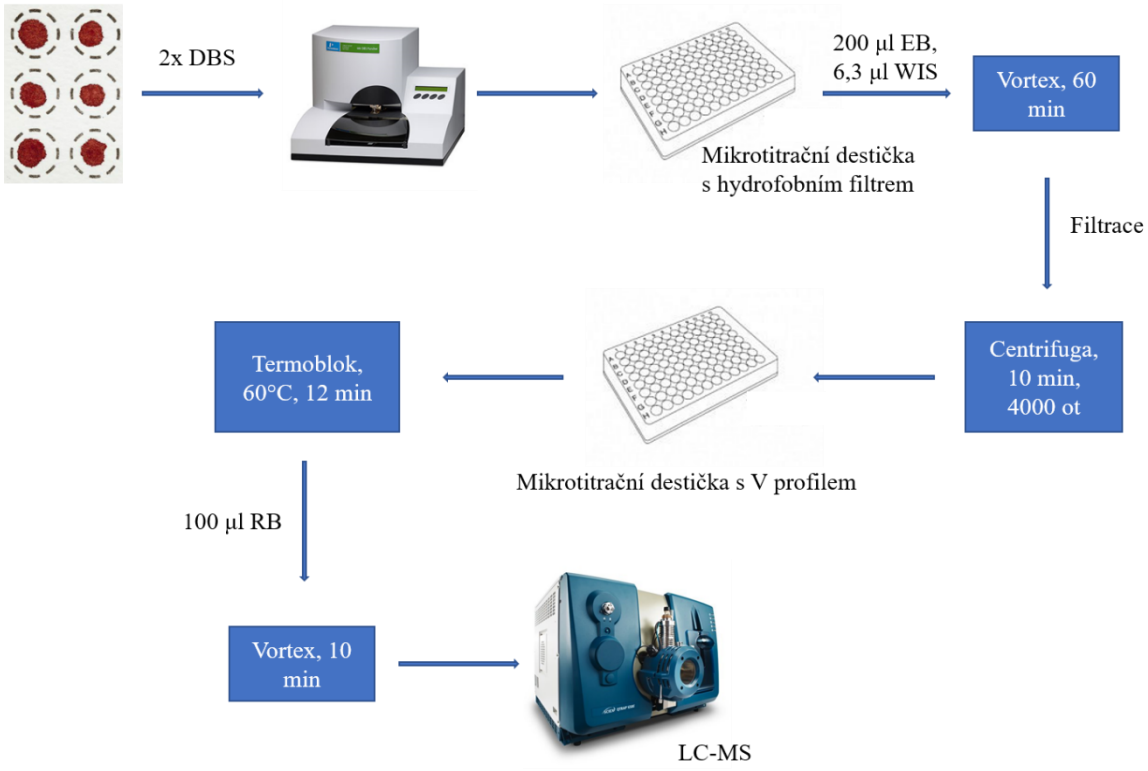
Interní značený standard byl připraven navážením jednotlivých značených standardů a jejich rozpuštěním v MeOH. Požadované koncentrace 10 ng/ml směsného standardu 17-OHP-d_8, AND-d_7, 11-DC-d_2, 21-DC-d_8 a 100 ng/ml KOR-d_4 bylo dosaženo ředěním MeOH/W (1:1). Takto připravený interní standard byl použit při následné přípravě vzorku a byl označen jako WIS (z angl. Working internal standard). Stabilita standardu při –20 °C by měla být min. 6 měsíců. Analýzou získaná plocha WIS byla vždy použita při výpočtu koncentrace jednotlivých analytů proto, aby se eliminoval vliv špatného nástřiku vzorku, či vliv iontové suprese v závislosti na dané matrici vzorku.

2.5.3 Příprava kalibrace pro analýzu plazmy/séra

Ke kvantifikaci analytů při stanovení ze séra/plazmy bylo použito kalibrační řady připravené do směsi MeOH/W (1:1). Byly naváženy jednotlivé standardy 17-OHP, AND, KOR, 11-DC a 21-DC a rozpuštěny v MeOH. Následně bylo ředěním směsí MeOH/W (1:1) dosaženo jednotlivých kalibračních bodů 0; 0,5; 2; 4; 10; 20; 50 ng/ml pro všechny analyty. Stabilita při – 20 °C by měla být min. 6 měsíců.

2.5.4 Příprava vzorků DBS

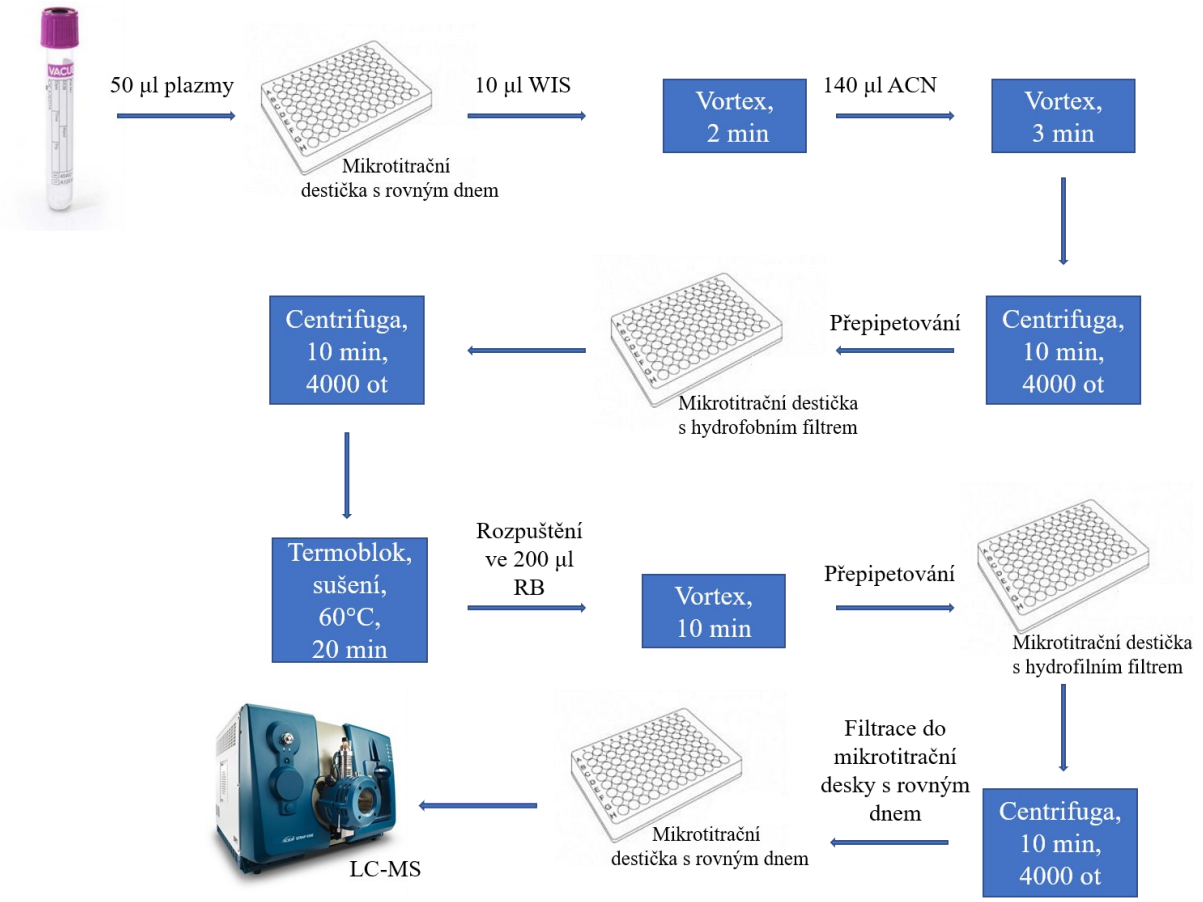
Všechny vzorky DBS (pacienti, kontroly a kalibrátory) byly pro LC-MS/MS analýzu připraveny následujícím postupem. Ze vzorku DBS byly do mikrotitrační destičky (MD) vyraženy dva terčíky (průměr 2,3 mm), které byly, po přídavku vnitřního značeného standardu (WIS) o koncentraci 10 ng/ml, extrahovány ve směsi extrakčního pufru (EB) ve složení ACN:MeOH+W (1:1+10 %). Poté byl extrakt přefiltrován centrifugací, odsušen na termobloku vyhřátém na teplotu 60 °C a následně rozpuštěn v rekonstitučním pufru (RB) kompatibilním s počátečním složením MF, tedy MeOH:W (1:1). Po rozpuštění vzorku byla MD přikryta ochranou folii a obsah byl dávkován do LC-MS/MS. Schéma přípravy je popsáno na Obr.10.



Obr.10: Schéma přípravy vzorků, EB = extrakční pufr ve složení ACN:MeOH+W (1:1 +10 %), RB = Rekonstituční pufr ve složení MeOH:W (1:1)

2.5.5 Příprava vzorků plazmy/séra

Všechny vzorky plazmy/séra (pacienti, kontroly) a kalibrační vzorky (viz. kap. 2.5.3) byly připraveny následujícím postupem. Do MD byl odpipetován objem 50 µl vzorku, byl přidán WIS o koncentraci 10 ng/ml a obsah byl deproteinován přídavkem ANC. Poté byl vzorek centrifugován a roztok nad peletkou přepipetován do MD s filtrem. Po filtraci centrifugací do nové MD byl obsah odsušen na termobloku vyhřátém na 60 °C a následně rekonstituován v RB o složení MeOH:W (1:1). Pro získání čistého vzorku byl obsah znovu přepipetován do filtrační destičky a centrifugován do čisté MD, z které bylo poté dávkováno do LC-MS/MS. Schéma přípravy je znázorněno na Obr.11.



Obr.11: Schéma přípravy vzorků z plazmy, RB = rekonstituční pufr ve složení MeOH:W (1:1)

3 Výsledky a diskuze

3.1 Vývoj metody

3.1.1 Optimalizace MS parametrů

Jako první bylo nutné najít optimální parametry pro nastavení tandemového hmotnostního spektrometru (TMS). Nejprve byly připraveny roztoky jednotlivých analytů o koncentraci 0,2 µg/ml ve směsi MeOH:W (1:1). Vzorek byl zaváděn přímo do sprejovací kapiláry lineárním čerpadlem v průtoku 10 µl/min. S ohledem na strukturu analyzovaných látek byla zvolena ionizace v pozitivním modu. Pro každý analyt byl nalezen v běžném Q1 skenu protonovaný molekulový ion $[M+H]^+$, který byl následně fragmentován s identifikací produktového iontu, čímž byl nalezen optimální MRM přechod pro každý analyt. Jednotlivé přechody byly ve skenu MRM optimalizovány na parametrech napětí a potenciálů tak, aby bylo dosaženo co nejvyšší intenzity odezvy detektoru. Pro klíčové analyty byly definován přechod kvantifikační (KV) sloužící pro výpočet koncentrace a přechod konfirmační (KN) pro ověření identity analytu. Optimalizované podmínky pro všechny analyty jsou uvedeny v Tabulce 1 na následující stránce. Byla také zkoušena ionizaci v negativním modu, pro který byl volený stejný postup jako pro mód pozitivní, ale zde výsledky úrovně signálu nedosahovaly ani 20 % úrovně signálu v pozitivu, proto byl dále použit pouze mód pozitivní.

Analyt	Q1 [*m/z*]	Q3 [*m/z*]	DP [V]	EP [V]	CE [V]	CXP [V]
17-OHP_KV	331,2	97,1	70	10	31	12
IS 17-OHP-d_8	339,2	100,1	70	10	31	12
AND_KV	287,1	97,1	50	10	29	12
IS AND-d_7	294,2	100,0	50	10	29	12
KOR_KV	363,2	121,1	70	9	30	12
IS KOR-d_4	367,2	121,1	70	9	30	12
11-DC_KV	347,2	97,0	60	7	29	12
IS 11-DC-d_2	349,2	97,0	60	7	29	12
21-DC_KV	347,3	311,0	61	9	22	10
IS 21-DC-d_8	355,3	319,0	61	9	22	10
17-OHP_KN	331,3	109,1	70	10	31	12
21-DC_KN	347,3	121,1	70	10	34	10

Tabulka 1: Výsledek optimalizace MS parametrů pro jednotlivé analyty. MRM – monitorování vybraných reakcí, DP – deklastrační potenciál, EP – vstupní potenciál, CE – kolizní energie, CXP – potenciál při výstupu z kolizní cely, IS – interní standard, KV – kvantifikační přechod, KN – konfirmační přechod

3.1.2 Optimalizace LC parametrů

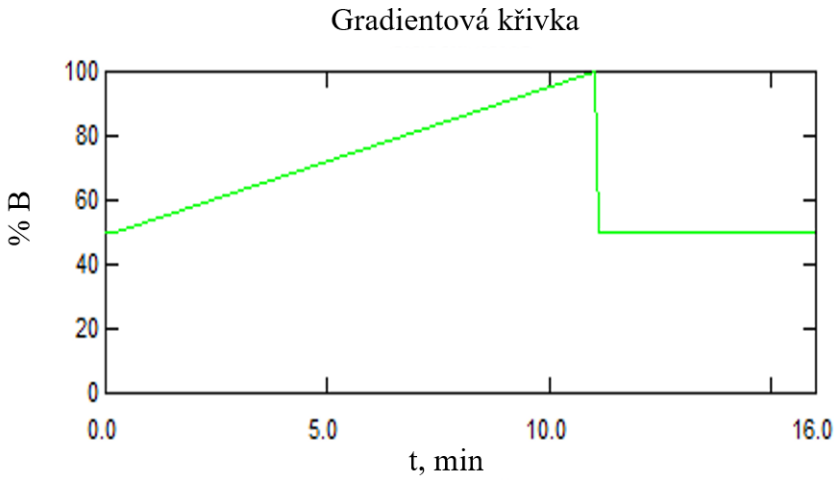
Dalším nezbytným krokem bylo optimalizovat parametry separace, najít podmínky za jakých bude probíhat analýza a nastavit iontový zdroj pro aktuální průtoky. Dále bylo nutné optimalizovat složení MF. Na základě dat z literatury a druhu analytů bylo rozhodnuto pracovat v reverzním modu (RP-HPLC)[62,63], využít gradientovou eluci směsi MeOH:W (1:1) s přídavkem 0,1 % FA jako iontového činidla a použít kolonu s vázaným ligandem C18. Kolonou první volby byla Symmetry C18 (3,5 μm, 2,1 x 50 mm, Waters). Vzhledem k parametrům kolony se tlak pohyboval okolo 120 bar. Všechny sledované analyty byly separovány. Následně byly odzkoušeny další kolony (Tabulka 2) s menší velikostí částic. Jako optimální, se na základě parametrů separace a poměru signálu analytu k šumu (S/N), ukázala kolona s označením „D“. V porovnání s kolonou Symmetry došlo k výraznému nárůstu

tlaku, nicméně S/N se zvýšil zhruba o 130 %. Byl nalezen optimální průtok (250 µl/min) a gradient (Obr.12) tak, aby došlo k separaci klíčových izobarických látek. Na základě nalezených LC parametrů byl nastaven i iontový zdroj. V experimentálním uspořádání, kde byl LC čerpadlem pumpován pracovní průtok se složením MF (MeOH:W+FA – 1:1+0,1%) a za pomoci T-kusu lineárním čerpadlem kontinuálně přidávána směs analytů, bylo při sledování MRM přechodů zjištěno, že nejvyšší intenzity signálu se dosahuje při teplotě sušících plynů (TEM) 500 °C a napětí na kapiláře 5500 V. Stejně tak byla nalezena ideální geometrie sprejování, tj. poloha konce sprejovací jehly vůči vstupu do MS.

Ve složení MF byl také ve směsi s vodou vyzkoušen acetonitril za počátečního složení gradientové eluce 1:1, ovšem zde nedošlo k uspokojivé separaci píků, a to především u klíčových izobarických látek. U složení MF bylo také přidáno větší procento FA (0,25 – 0,5 %), ale při zvýšení nedocházelo ke zlepšení ionizace ani ke zvýšení signálu, proto byl ponechán procentuální obsah 0,1 %.

Testovaná Kolona	**Pracovní tlak systému (bar)**	**Schopnost separovat**
A) Agilent Eclipse Plus C18 1,8 µm, 2,1 x 50 mm	293	ANO
B) Kintex XB-C18 1,7 µm, 2,1 x 50 mm	300	ANO
C) Kintex Biphenyl 1,7 µm, 2,1 x 50 mm	284	NE
D) Luna Omega Polar C18 1,7 µm, 2,1 x 50 mm	339	ANO

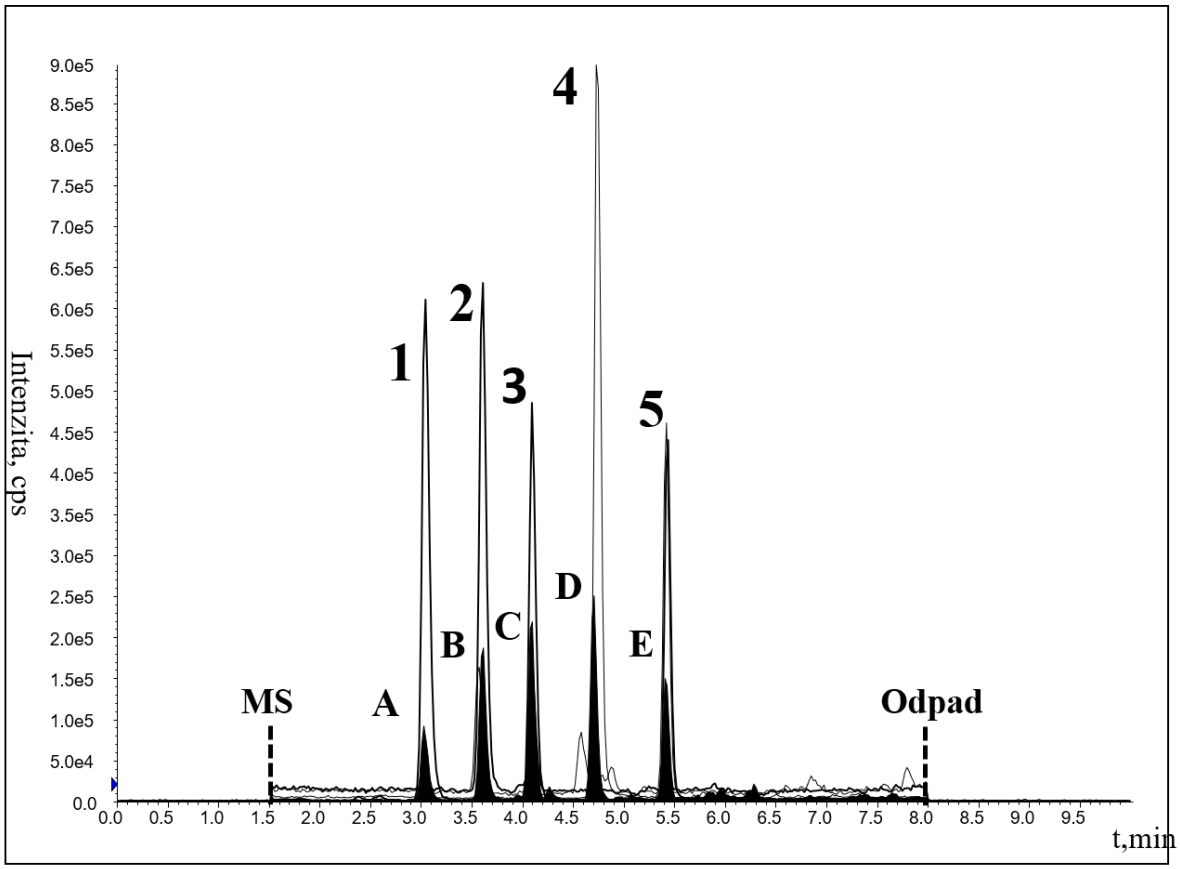
Tabulka 2: Přehled testovaných kolon v rámci optimalizace LC-parametrů za průtoku MF 250 µl/min



Obr.12: Nalezený optimální gradient pro separaci analytů, počáteční složení MF A: W + 0.1 % FA, B: MeOH

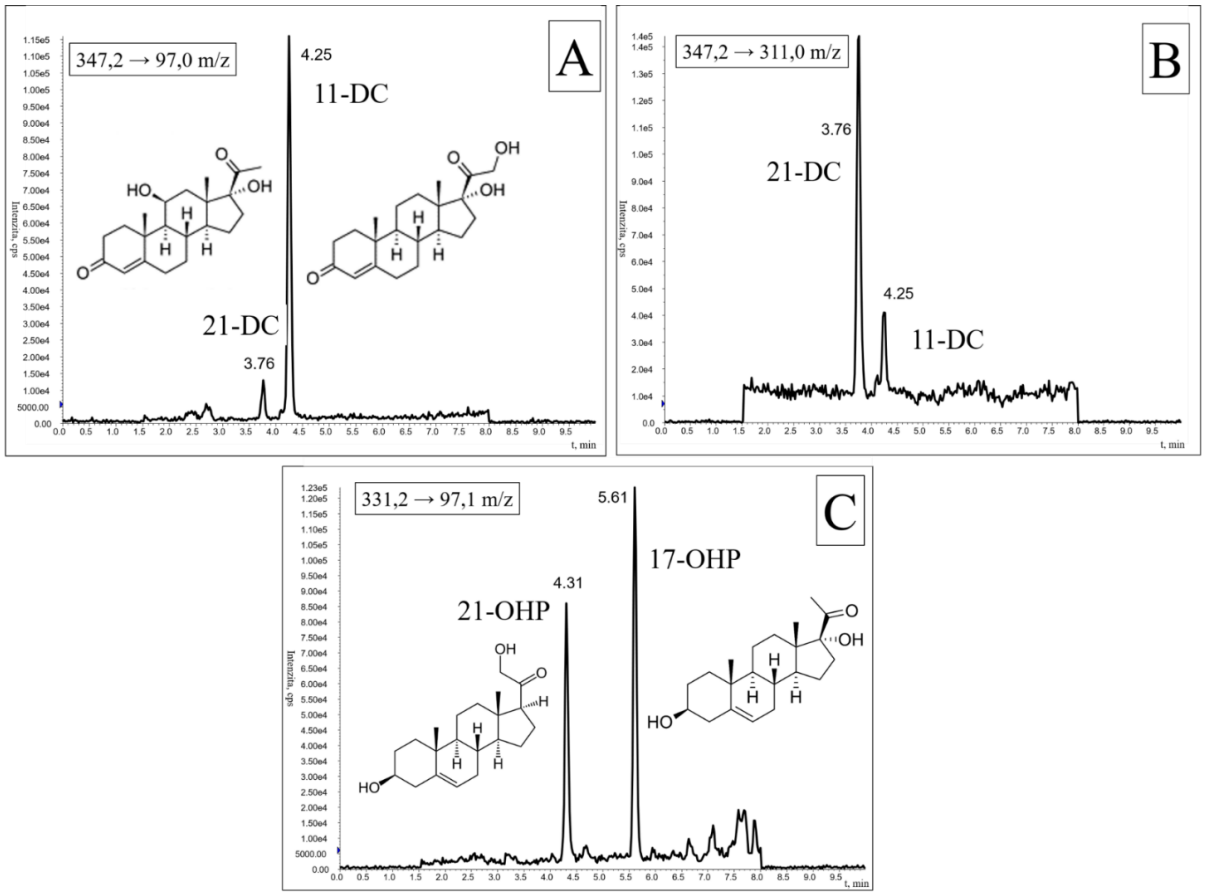
3.1.3 Spojení LC-MS

Po celkové optimalizaci LC-MS/MS metody byl výstup eluentu z kolony před vstupem do MS napojen přes přepínací ventil. Na základě retenčních časů analytů byl pak do MS pouštěn eluent v časovém rozmezí 1,5 min – 8,0 min, zbylý čas byl odkloněn do odpadu. To, že metoda bude použitelná i pro biologický vzorek obsahující složitou biologickou matrici, bylo vyzkoušeno nástřikem extraktu vzorku DBS, kde byla krev obohacena jednotlivými analyty o koncentraci 50 ng/ml. I v tomto případě byly všechny analyty separovány. Posledním krokem bylo otestování velikosti objemu nástřiku vzorku (i.v. – z angl. „injection volume“). Ukázalo se, že i.v. lze zvýšit až na 20 µl, při zachování chromatografických vlastností systému. Analýza směsi sledovaných metabolitů a jejich vnitřních značených standardů se nachází na Obr.13.



*Obr.13: Analýza směsi sledovaných metabolitů (1-5) a jejich vnitřních značených standardů (A-E); **1**: COR; **2**: 21-DC; **3**: 11-DC; **4**: AND; **5**: 17-OHP, **A:** KOR-d_4; **B**: 21-DC-d_8; **C**: 11-DC-d_2; **D**: AND-d_7; **E**: 17-OHP-d_8, MS – přepnutí toku MF do hmotnostního spektrometru, Odpad – přepnutí toku MF do odpadu, nástřik vzorku 20 µl*

Díky optimalizaci metody bylo také dosaženo separace klíčových izobarických párů, které by jinak mohly způsobovat interferenci při hodnocení analytů. Chromatografická separaci izobarických molekul na jednotlivých MRM přechodech společně s jejich strukturami se nachází na Obr.14.

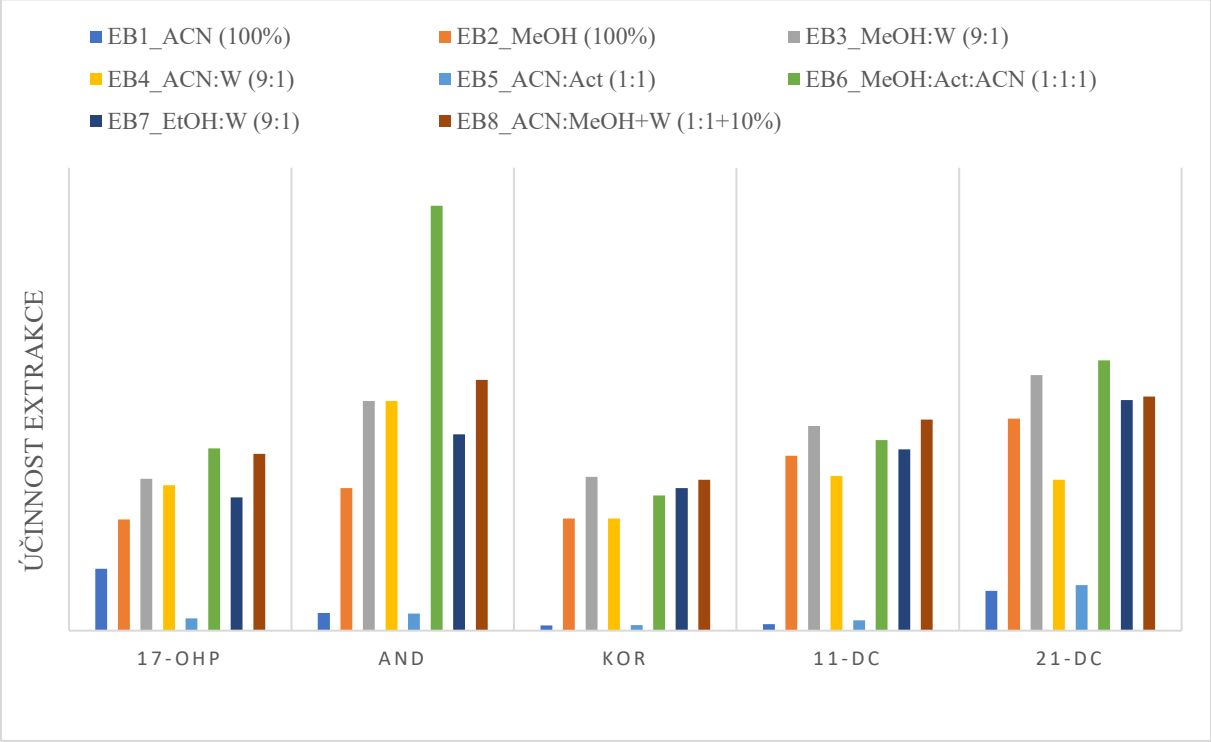


Obr.14: Chromatografická separace izobarických molekul na jednotlivých MRM přechodech; A: roztok 11-DC o koncentraci 10 ng/ml; B: 10 ng/ml 21-DC; C: pacient s deficitem CAH (21-OHP = 21-hydroxyprogesteron)

3.1.4 Optimalizace extrakce DBS

Důležitým preanalytickým krokem byla extrakce analytů z DBS. Bylo nezbytné najít rozpouštědlo, popřípadě jeho směs, do které bude extrakce probíhat v co nejvyšším procentu a zároveň se s takto získaným extraktem bude moci dále pracovat, aby pak mohl být ve finální podobě dávkován do počátečního složení MF kapalinového chromatografu (viz kapitola 2.6.2). Konstantní množství vzorku vzatého do extrakce bylo zajištěno jeho vyražením speciálním strojem (viz. Kapitola 2.4), který měl definovaný průměr vyrážecí hlavy. Extrakce probíhala v mikrotitračních destičkách Well plate (viz. Kapitola 2.4). Při optimalizace bylo vyzkoušeno

celkem 8 různých extrakčních činidel (EB 1 – 8), u nichž byla sledována plocha signálů jednotlivých analytů po 60 minutovém třepání (450 rpm), následném odsušení a rekonstituci v RB (stejný postup jako u kap. 2.5.4). Jako optimální se ukázalo činidlo ACN:MeOH+W ve složení 1:1 + 10 % (EB 8) z důvodu nejčistší linie na MRM přechodech (bez interferencí) a vysoké plochy signálu. Graf s plochou signálů jednotlivých analytů se nachází na Obr.15.



Obr.15: Plochy píků jednotlivých analytů po extrakci ve zkoušených extrakčních činidlech/směsích

3.2 Validace

3.2.1 LOD a LOQ

Mez detekce (LOD) je nejnižší možné množství analytu ve vzorku, které jsme schopni detekovat, ale které není nutně kvantifikovatelné jako exaktní hodnota. Mez stanovitelnosti (LOQ) je pak nejnižší množství analytu ve vzorku, které jsme schopni stanovit jako exaktní hodnotu se stanovenou přesností.

LOD, respektive LOQ byl stanoven jako trojnásobek odstupu S/N v případě LOD a jako desetinásobek odstupu S/N v případě LOQ. Experiment byl realizován postupným ředěním značených standardů, jejíž odstupňovaně snižující se koncentrace byly přidávány ke vzorku biologické matrice. Takto zjištěné hodnoty se nalézají v Tabulce 3.

Analyt	**LOD [ng/ml]**	**LOQ [ng/ml]**
17-OHP	0,3	0,8
AND	0,3	0,8
KOR	0,5	0,7
11-DC	0,2	0,5
21-DC	0,4	0,7

Tabulka 3: LOD a LOQ pro jednotlivé analyty

3.2.2 Opakovatelnost

Opakovatelnost vyjadřuje přesnost metody za stejných podmínek v krátkém časovém intervalu. Opakovatelnost byla testována jako míra variability výsledku analytů na dvou koncentračních hladinách a to nízké (Low) o koncentraci cca 5 ng/ml a vysoké (High) o koncentraci cca 20 ng/ml v rámci jedné série. Vzorek byl na obou hladinách připraven a změřen v pěti opakováních. Výsledky z těchto měření se nalézají v Tabulkách 4 a 5. Všechny analyty byly hodnoceny pod variabilitu 15 %, čili dostatečně pro zamýšlený účel metody.

Low	17-OHP	AND	KOR	11-DC	21-DC
Průměr [ng/ml]	5,5	4,9	5,4	4,6	5,0
SD [ng/ml]	0,6	0,3	0,6	0,2	0,5
CV [%]	10,3	6,8	11,1	4,7	10,5

Tabulka 4: Míra variability výsledku opakovatelnosti na koncentrační hladině 5 ng/ml, SD – směrodatná odchylka, CV – koeficient variability

High	17-OHP	AND	KOR	11-DC	21-DC
Průměr [ng/ml]	21,8	21,6	21,8	20,6	19,0
SD [ng/m]	1,4	1,5	1,9	1,0	1,3
CV [%]	6,6	6,7	8,9	4,7	6,8

Tabulka 5: Míra variability výsledku opakovatelnosti na koncentrační hladině 20 ng/ml, SD – směrodatná odchylka, CV – koeficient variability

3.2.3 Reprodukovatelnost

Reprodukovatelnost byla testována jako míra variability výsledku analytů na dvou koncentračních hladinách, a to opět nízké (Low) o koncentraci cca 5 ng/ml a vysoké (High) o koncentraci cca 20 ng/ml. Měření probíhalo v různých dnech a bylo realizováno v rámci různých sérií v časovém intervalu tří týdnů. Všechny analyty byly opět hodnoceny pod variabilitu 15 %, čili dostatečně pro zamýšlený účel metody. Výsledky z těchto měření se nalézají v Tabulkách 6 a 7.

Low	17-OHP	AND	KOR	11-DC	21-DC
Průměr [ng/ml]	5,9	4,5	5,6	4,6	4,9
SD [ng/ml]	0,6	0,3	0,5	0,2	0,5
CV [%]	10,7	7,4	9,3	4,0	10,9

Tabulka 6: Míra variability výsledků reprodukovatelnosti na koncentrační hladině 5 ng/ml, SD – směrodatná odchylka, CV – koeficient variability

High	17-OHP	AND	KOR	11-DC	21-DC
Průměr [ng/ml]	23,2	23,1	22,6	22,4	22,3
SD [ng/ml]	1,6	2,1	2,3	1,0	2,6
CV [%]	6,9	9,2	10,1	4,3	11,5

Tabulka 7: Míra variability výsledků reprodukovatelnosti na koncentrační hladině 20 ng/ml, SD – směrodatná odchylka, CV – koeficient variability

3.2.4 Linearita

Linearita, jako schopnost analytické metody v daném rozsahu poskytovat odezvy (resp. výsledky), které jsou přímo úměrné koncentraci (množství) analytu ve vzorku, byla otestována do koncentračního rozsahu až 500 ng/ml pro každý analyt. Pro tento účel byly použity vzorky DBS obohacené analyty v daném koncentračním rozsahu. Bylo zjištěno, že odezva je pro všechny analyty lineární až do koncentrace 500 mg/ml ($R^2 > 0,998$).

3.2.5 Výtěžnost

Výtěžnosti této vyvinuté metody byla otestována za použití vzorku nesrážlivé krve, který byl rozdělen na tři části: A – bez přídavku analytů, B – s přídavkem analytů na finální koncentraci 5 ng/ml a C – s přídavkem na finální koncentraci 50 ng/ml. Následně byla krev aplikována na papírky a odsušena přes noc při pokojové teplotě. Takto byly vytvořeny DBS vzorky A, B a C. Po změření vzorků byla dopočítána výtěžnost jako procentuální poměr analytu získaného touto metodou a teoretické cílové hodnoty vzniklé součtem endogenního množství analytu (tedy výsledku vzorku A) a přídavkem analytů (+ 5 ng/ml, resp. + 50 ng/ml). Výtěžnost metody v % je uvedena v Tabulce 8.

Analyt	17-OHP	AND	KOR	11-DC	21-DC
Přídavek 5 ng/ml	101	100	91	98	100
Přídavek 50 ng/ml	91	93	85	96	97

Tabulka 8: Výtěžnost metody (v %) pro jednotlivé analyty na dvou koncentračních hladinách

3.2.6 Přenos vzorku

Přenos vzorku byl ověřen nástřikem MF po změření kalibračního bodu o koncentraci 500 ng/ml. Výsledný signál analytů byl pod LOD, k přenosu vzorku tedy nedocházelo.

3.2.7 Matriční efekt

Vliv matričního efektu (ME) pro jednotlivé analyty byl posouzen z porovnání plochy píku vnitřního standardu (WIS) ve vzorcích bez biologické matrice (tj, blanky a čisté standardy) a vzorcích klinických, obsahujících matrici. Byly brány průměry z několika měření. Pro každý analyt pak byla vypočítána hodnota matričního efektu (ME %) pomocí vzorce ((B/A) -1)*100, kde A je průměr ploch čistého standardu bez matrice a B je průměr ploch vnitřního standardu s matrici. Vypočítané hodnoty s ME společně s průměrem ploch se nacházejí v Tabulce 9.

Analyt	**A**	**B**	**ME %**
17-OHP	1196667	1257273	5.1
AND	3426667	3352500	-2.2
KOR	730000	794000	8.8
11-DC	1506667	1607273	6.7
21-DC	1250000	1309091	4.7

Tabulka 9: A – průměr ploch vnitřního standardu bez matrice, B – průměr ploch vnitřního standardu s matrici, ME % - hodnota matričního efektu

3.3 Klinická aplikace metody

Po validaci následovala aplikace metody. Probíhalo měření biologických vzorků DBS v rámci zlepšení diagnostiky CAH programu novorozeneckého screeningu a zároveň byla metoda odzkoušena pro stanovení týchž analytů ze vzorku séra. Novorozenecké vzorky DBS byly rozděleny do tří skupin na základě výsledků konvenčního screeningového programu realizovaného pomocí FIA metody. První skupina obsahovala vzorky s negativním výsledkem (pacienti bez enzymového deficitu). Ty byly označeny jako negativní kontrola (NK). Další skupina obsahovala pozitivní vzorky (PK), které měly prokázaný enzymový deficit a poslední skupina byla označena jako šedá zóna (GZ, z anglického „gray zone“), kde se pozitivní výsledek FIA screeningu nacházel nad aktuální cut-off, což je hranice oddělující pozitivní nález od negativního. CAH u nich následně ale nebyl prokázán. Vzorky z šedé zóny tedy patřily mezi falešně pozitivní nálezy.

3.3.1 Měření biologických vzorků suché krevní kapky

3.3.1.1 Referenční rozmezí

Referenční hodnoty (referenční rozmezí, fyziologická rozmezí) jsou takové hodnoty laboratorního testu, mezi nimiž leží většina hodnot získaná měřením referenční populace. Statisticky definovaný referenční interval zahrnuje hodnoty v hranicích x±2SD a/nebo hodnoty na úrovni 2,5/97,5 percentilu. Hodnoty mimo toto rozmezí není vhodné a priori označovat za patologické, ale velmi vysoké nebo velmi nízké, protože tyto hodnoty se vyskytují ve výběrové referenční populaci s určitou předem definovanou pravděpodobností (např. mimo fyziologické rozmezí je 5 % výsledků u jedinců bez přítomnosti choroby). Je-li výsledek významně vzdálen od referenční meze, jedná se s velkou pravděpodobností o patologický nález. Referenční hodnoty se mohou u jednotlivých pracovišť lišit v důsledku odlišných analytických metod a používaných komerčních souprav[64]. V případě NS programů je za horní hranici považován 99 percentil, tz. cut-off[65].

Referenční rozmezí (koncentrační rozsah), ve kterém je výsledek považován za negativní, bylo vytvořeno na základě dat získaných měřením souboru NK a nachází se v Tabulce 10.

	17-OHP	AND	KOR	11-DC	21-DC
Percentil	**c [ng/ml]**	**c [ng/ml]**	**c [ng/ml]**	**c [ng/ml]**	**c [ng/ml]**
2,5	**0,5**	**0,2**	**4,0**	**0,4**	**0,1**
5	0,5	0,3	4,5	0,4	0,2
10	0,7	0,4	5,8	0,5	0,2
25	1,1	0,5	6,9	0,6	0,3
50	1,6	0,7	16,5	0,8	0,5
75	2,2	0,8	28,9	1,1	0,7
97,5	**4,3**	**1,6**	**56,1**	**1,9**	**1,3**
99	5,0	1,9	67,4	2,1	1,7

Tabulka 10: Koncentrační referenční rozmezí pro stanovované analyty se zvýrazněnými hodnotami na úrovni 2,5 a 97,5 percentilu (n=60)

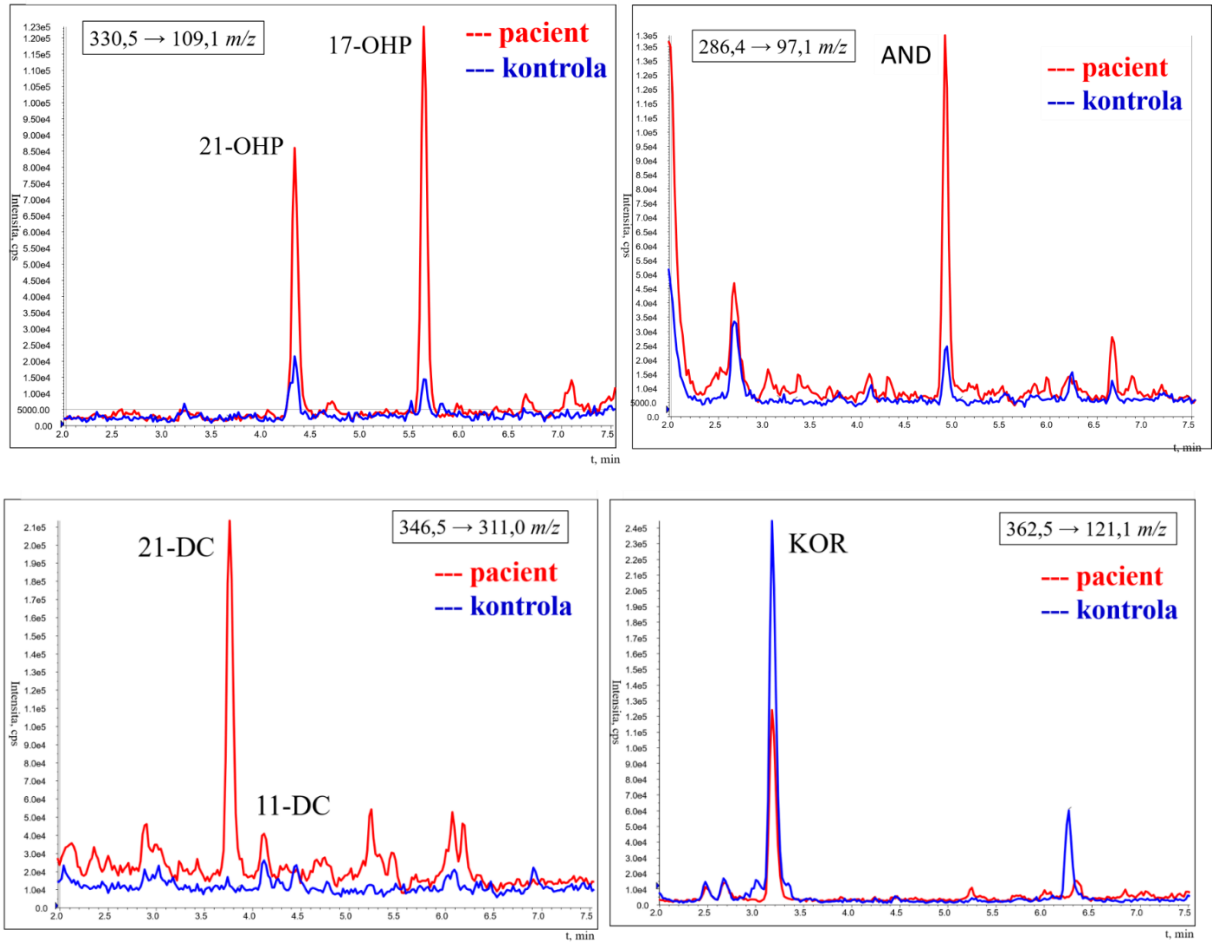
Protože měřením byla získána data pro jednotlivé analyty, bylo možné nadefinovat i některé jejich vzájemné poměry, které by mohly pomoci v následující diagnostice. Poměry jednotlivých analytů se nacházejí v Tabulce 11.

	(17-OHP+AND)/KOR	11-DC/KOR	(17-OHP+AND+21-DC)/KOR
Percentil			
2,5	**0,10**	**0,10**	**0,10**
5	0,10	0,10	0,10
10	0,10	0,10	0,10
25	0,20	0,10	0,20
50	0,20	0,10	0,20
75	0,20	0,14	0,20
97,5	**0,44**	**0,28**	**0,64**
99	0,45	0,29	0,69

Tabulka 11: Referenční rozmezí pro poměry některých stanovovaných analytů se zvýrazněnými hodnotami na úrovni 2,5 a 97,5 percentilu (n=60)

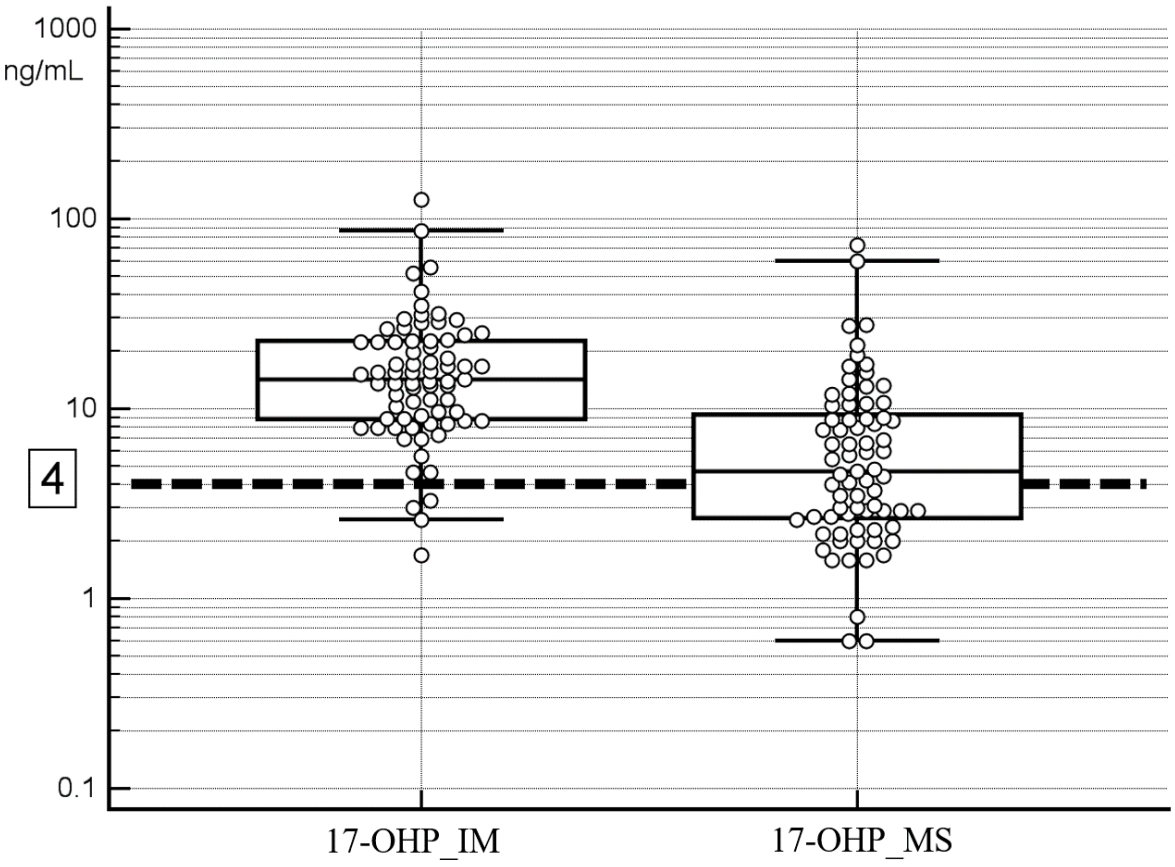
3.3.1.2 Pacienti s diagnosou CAH (PK) a vzorky šedé zóny (GZ)

Celkem bylo změřeno 12 vzorků od pacientů s potvrzenou diagnosou CAH. U všech vzorků byla prokázána zvýšená koncentrace 17-OHP nad 4 ng/ml. Vzorky se nacházely v koncentračním rozmezí 5,4 – 233 ng/ml a zároveň se vyskytovaly další markery, které odlišují pacienty od zdravých kontrol (viz kapitola 1.1.3). Chromatografický příklad porovnávající vzorek PK a NK přeložením záznamů MRM přechodů se nachází na Obr.16. Jak bylo předpokládáno, vzorek PK obsahuje zvýšené koncentrace 17-OHP, AND a 21-DC, zatímco koncentrace KOR je snížena.

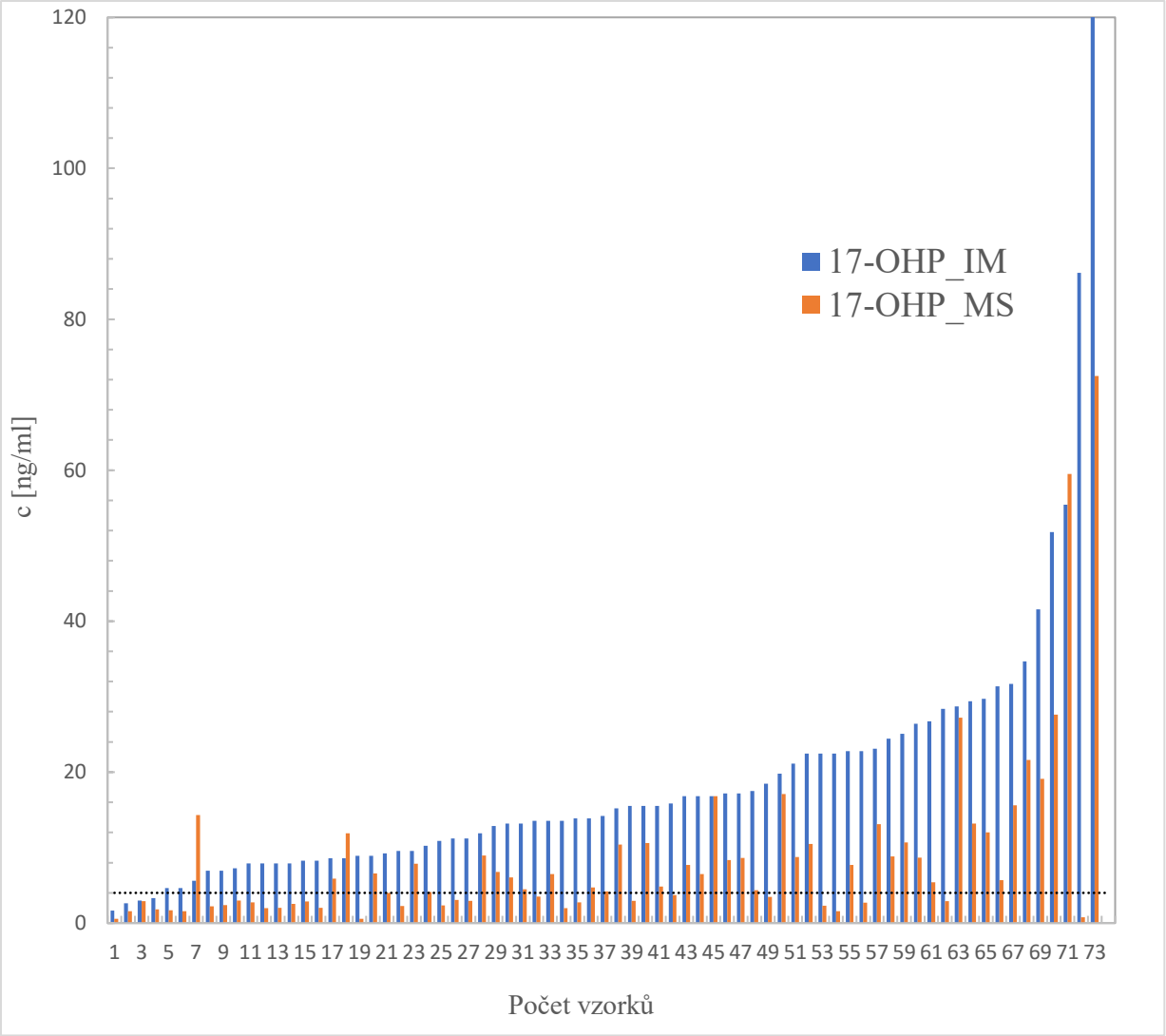


Obr.16: Porovnání analýzy vzorku DBS negativní kontroly (modrá linie) a pacienta s deficitem CAH (červená linie) s vybranými MRM přechody pro jednotlivé metabolity, výsledná koncentrace sledovaných metabolitů u vzorku pacienta: 17-OHP – 12,4 ng/ml (n.< 4), AND 3,2 ng/ml (n.< 1,9), 21-DC 18,2 ng/ml (n.< 1,3)

Z diagnostického hlediska byla nejzajímavější skupina vzorků GZ, která v rámci měření FIA metodou byla označena jako falešně pozitivní, protože koncentrace 17-OHP se nacházela nad cut-off 4 ng/ml (koncentrační rozmezí změřeného souboru bylo 4,6 – 126,4 ng/ml). Celkem bylo proměřeno LC-MS/MS metodou 73 vzorků. Srovnáním výsledků koncentrace 17-OHP naměřených FIA a LC-MS/MS metodou ukázalo, že pokud by se použil cut-off 4 ng/ml, došlo by při použití LC-MS/MS metody k redukci pozitivních nálezů o 40 %, respektive 50 %, pokud by byla použita hranice cut-off 5 ng/ml. Srovnání výsledků získaných měřením oběma metodami je znázorněno v grafu na Obr.17a a 17b. V souboru jsou také obsaženy 4 vzorky s výsledkem pod 4 ng/ml z důvodu suspektní klinické anamnézy, která se následně neprokázala.



Obr.17a: Porovnání výsledků měření koncentrace 17-OHP u vzorků GZ skupiny pomocí imuno a MS metody, IM - imunometoda (FIA), MS: LC-MS/MS. Osa krabicového grafu je v logaritmickém měřítku, přerušovaná čára naznačuje cut-off hodnotu 4 ng/ml

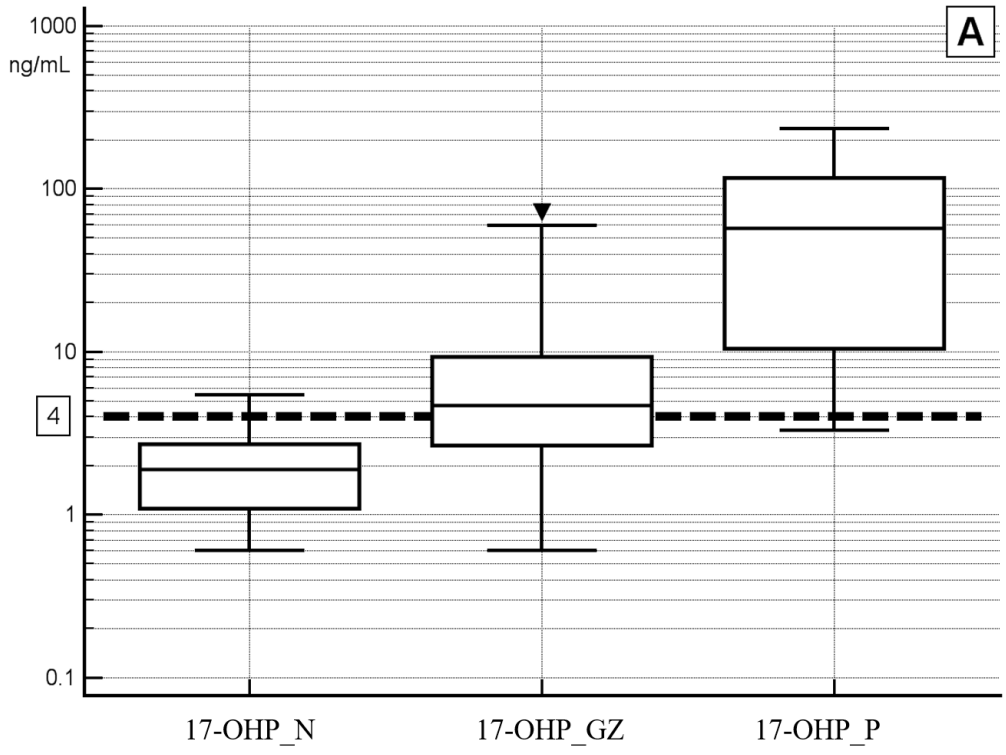


Obr.17b: Porovnání výsledků měření koncentrace 17-OHP u vzorků GZ skupiny pomocí imuno a MS metody, IM - imunometoda (FIA), MS: LC-MS/MS. Přerušovaná čára naznačuje cut-off hodnotu 4 ng/ml

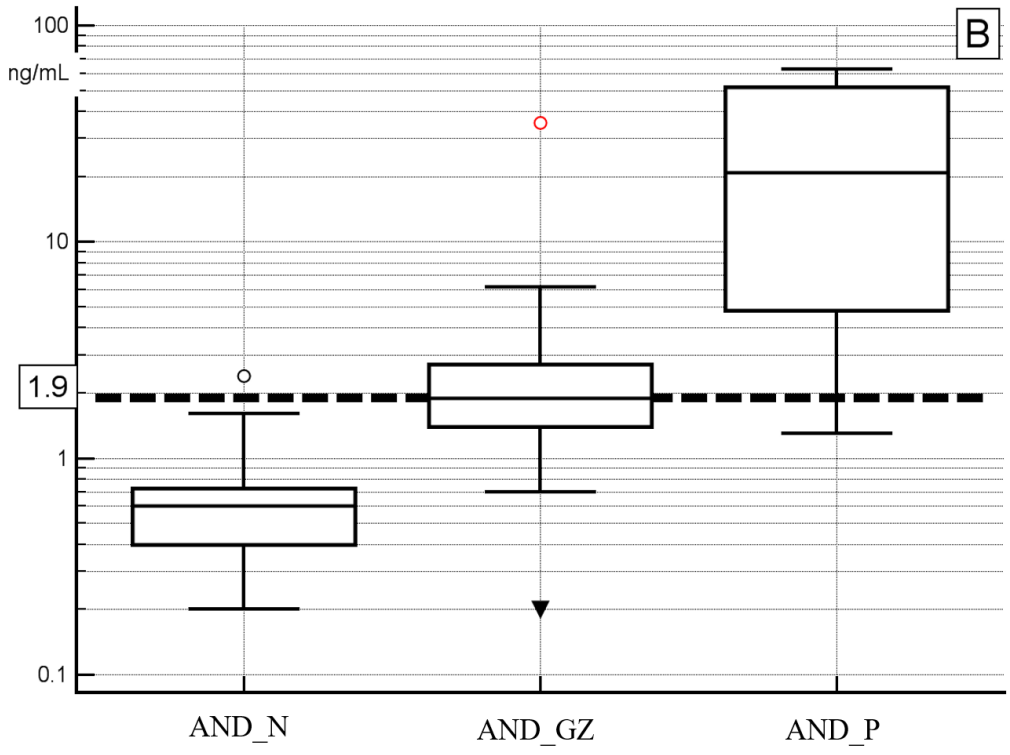
4.1.1.3 Porovnání skupin NK, PK a GZ pomocí metody LC MS/MS

Pomocí LC-MS/MS metody byly následně změřeny všechny tři skupiny pacientů a to NK (n=60), PK (n=12) a GZ (n=73). Získané koncentrace metabolitů 17-OHP, AND, 11-DC, 21-DC a KOR byly porovnány vůči sobě a nacházejí se na obrázku 18A - 18E. Zároveň byly navrženy, dopočítány a porovnány 3 poměry (Obr.18F-18H) vybraných změřených metabolitů. Tyto metabolity byly vybrány s ohledem na předpoklad jejich koncentrační změny v případě CAH diagnosy, jak je uvedeno na Obr.3 (str.12). Zjišťovalo se, jaké markery nejlépe diskriminují jednotlivé skupiny a jestli je lze využít pro diagnostické účely. V případě 17-OHP (Obr.18A) je patrné, že aplikací cut-off 4 ng/ml rozlišíme pacienty (P) a negativní kontroly (N),

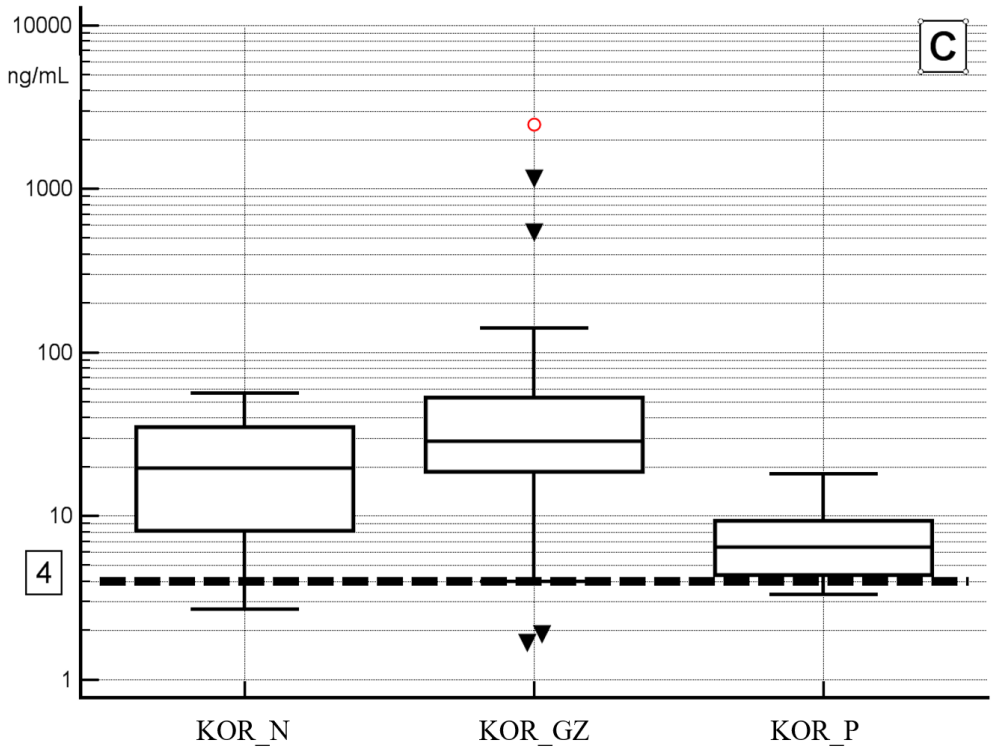
zatímco u skupiny vzorků GZ je zhruba 50% přesah do pozitivity i negativity. Podobná situace nastala i v případě AND (Obr.18B) při použití cut-off 1,9 ng/ml (99th percentil referenčního rozmezí). V případě KOR (Obr.18C) byly očekávány snížené hodnoty, ovšem z kumulativních dat sice vyplývá snížení mediánu u pacientů oproti kontrolám, nicméně použití cut-off 4 ng/ml (2,5th) rozlišení nepřineslo. U 11-DC (Obr.18D) je vidět větší rozptyl hodnot ve skupině GZ, nicméně tento parametr neodliší skupiny PK a NK. Z podstaty patobiochemie vyplývá, že u CAH pacientů s deficitem 21-OHD (95 % všech případů CAH) by měla být zvýšena koncentrace 21-DC. To je prokázáno na Obr.18E, kde lze vidět oddělení pacientů od kontrol, a dokonce i od GZ. 21-DC by tak měl být dostatečně specifickým markerem pro snížení falešné pozitivity u primárního NS metodou FIA. Podobné specifické vlastnosti jsou viditelné při aplikaci poměru P1 (Obr.18F), tedy (17-OHP+AND)/KOR a poměru P3 (Obr.18H) (17-OHP+AND+21-DC)/KOR. Aplikace poměru P3 zajistila oddělení skupin PK od NK i GZ.



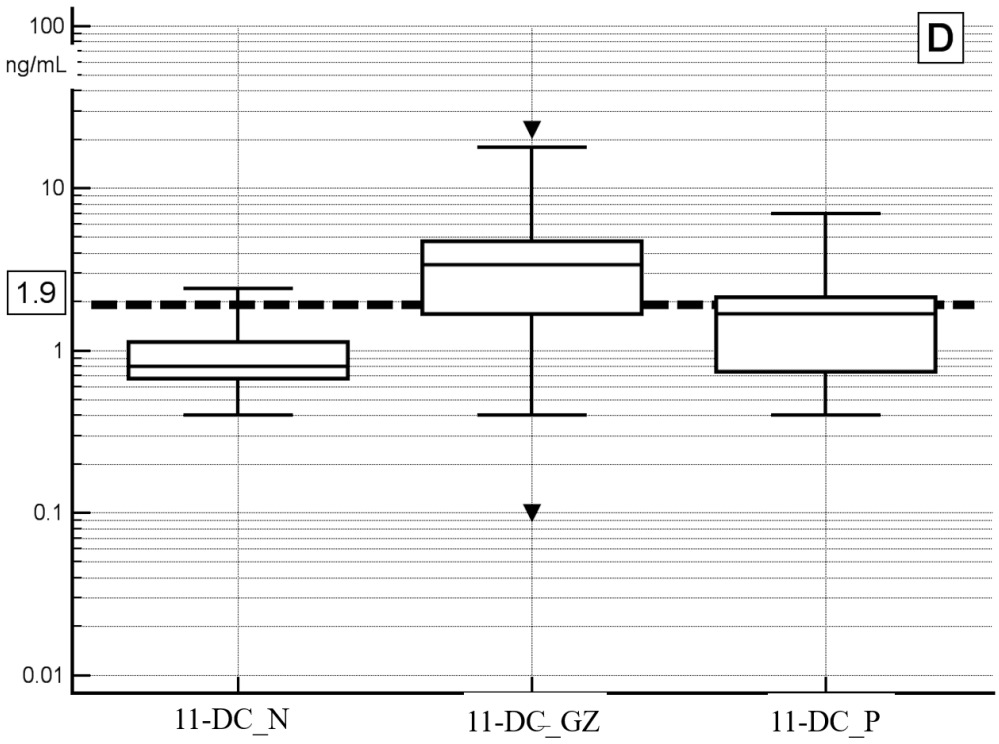
Obr.18A: Boxový graf s naměřenými výsledky 17-OHP pro negativní (N), šedou zónu (GZ) a pozitivní (P) vzorky. Přerušovanou čárou je naznačen cut-off 4 ng/ml



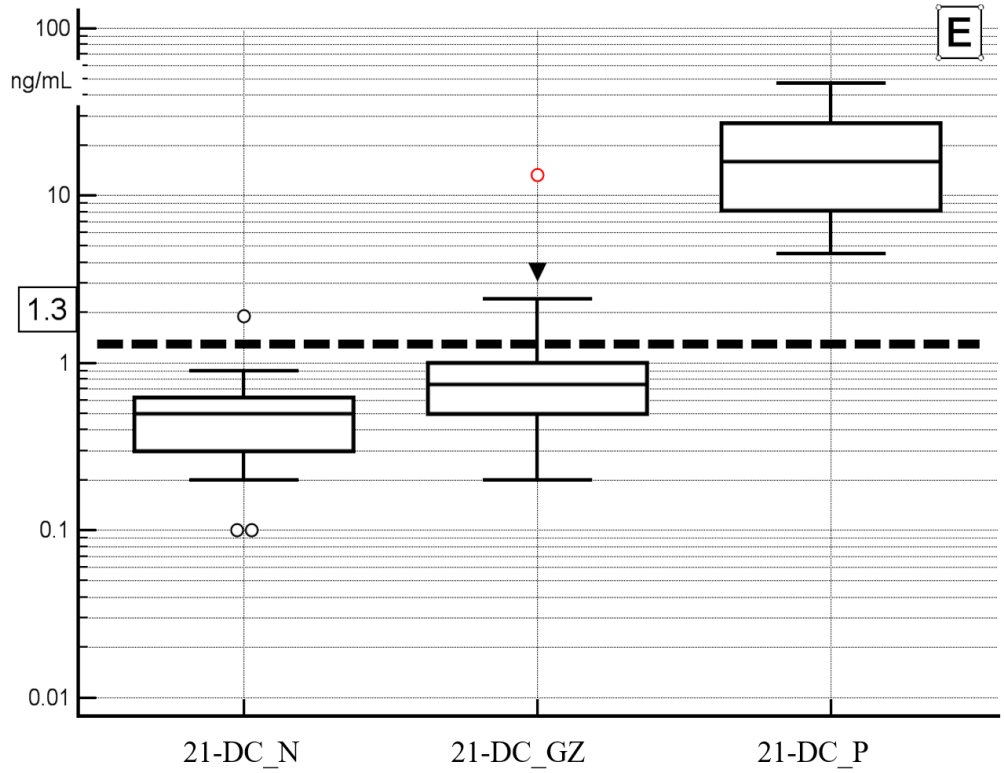
Obr.18B: Boxový graf s naměřenými výsledky AND pro negativní (N), šedou zónu (GZ) a pozitivní (P) vzorky. Přerušovanou čárou je naznačen cut-off 1,9 ng/ml



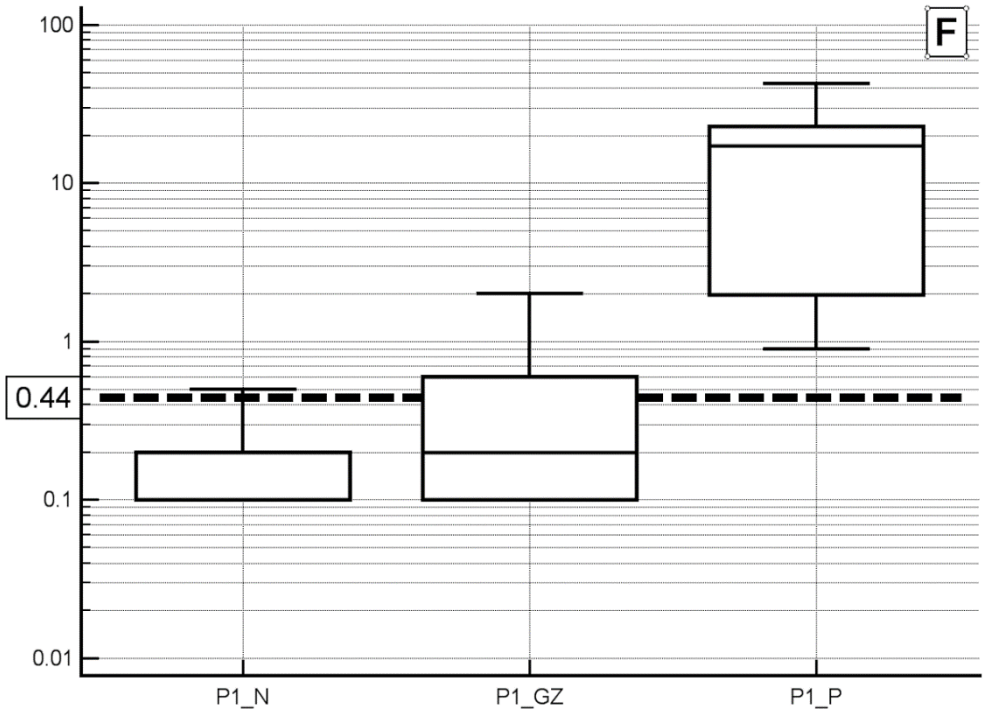
Obr.18C: Boxový graf s naměřenými výsledky KOR pro negativní (N), šedou zónu (GZ) a pozitivní (P) vzorky. Přerušovanou čárou je naznačen cut-off 4 ng/ml



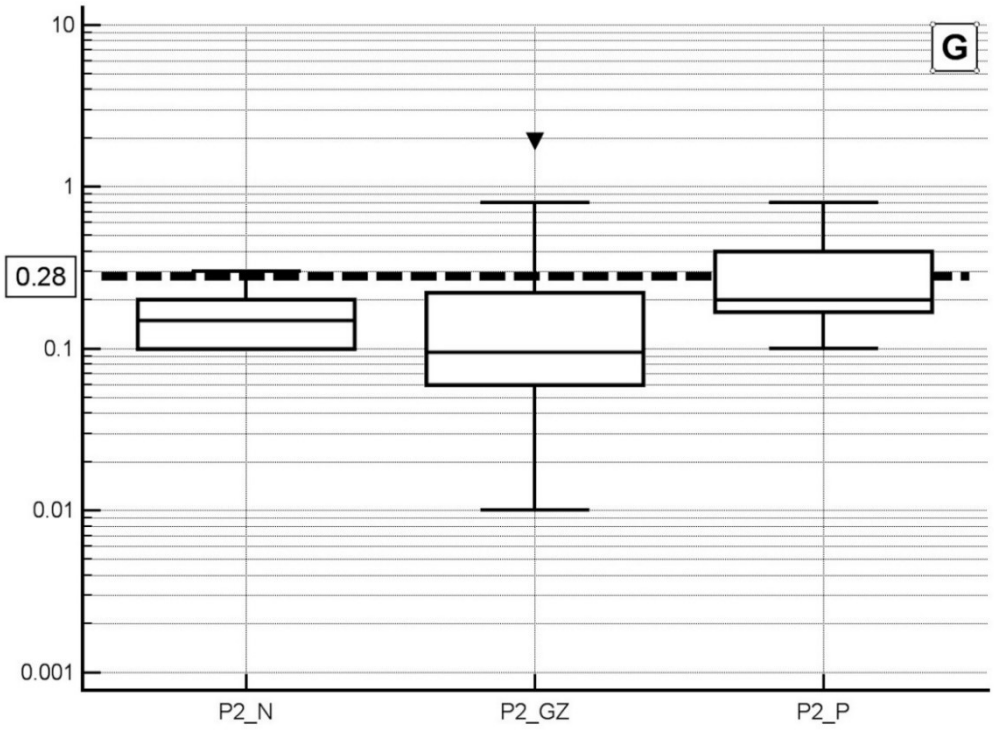
Obr.18D: Boxový graf s naměřenými výsledky 11-DC pro negativní (N), šedou zónu (GZ) a pozitivní (P) vzorky. Přerušovanou čárou je naznačen cut-off 1,9 ng/ml



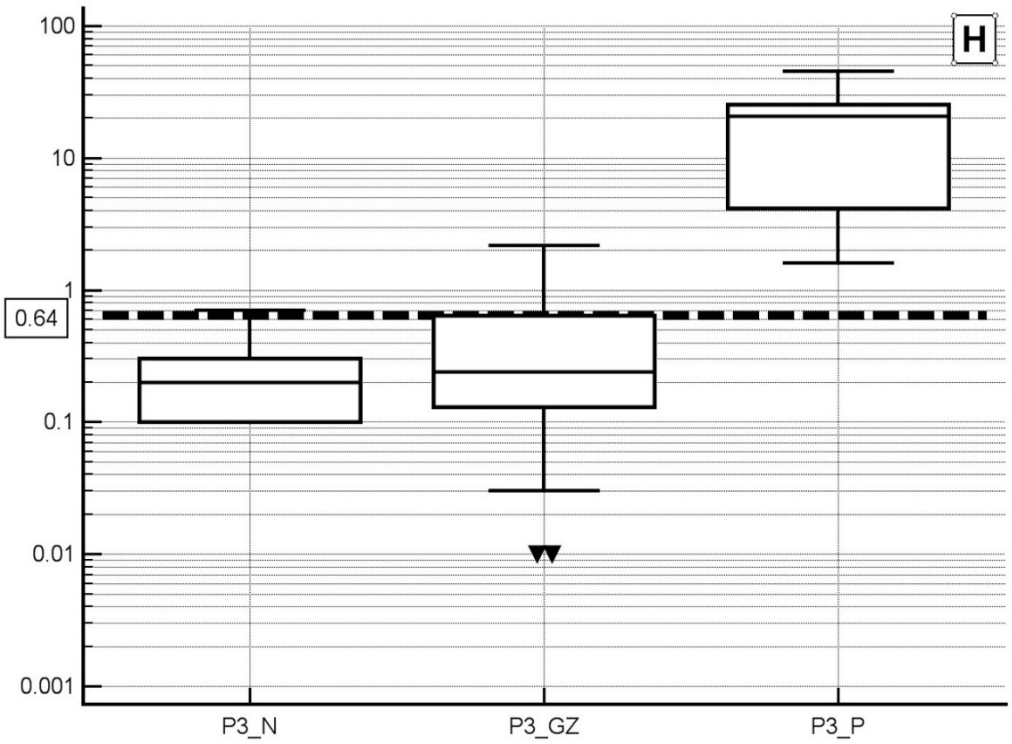
Obr.18E: Boxový graf s naměřenými výsledky 21-DC pro negativní (N), šedou zónu (GZ) a pozitivní (P) vzorky. Přerušovanou čárou je naznačen cut-off 1,3 ng/ml



Obr.18F: Boxový graf s numerickými poměry analytů (17-OHP+AND)/KOR pro negativní (N), šedou zónu (GZ) a pozitivní (P) vzorky. Přerušovanou čárou je naznačen cut-off



Obr.18G: Boxový graf s numerickými poměry analytů (17-OHP+11-DC)/KOR pro negativní (N), šedou zónu (GZ) a pozitivní (P) vzorky. Přerušovanou čárou je naznačen cut-off



Obr.18H: Boxový graf s numerickými poměry analytů (17-OHP+AND+21-DC)/KOR pro negativní (N), šedou zónu (GZ) a pozitivní (P) vzorky. Přerušovanou čárou je naznačen cut-off

Pokud je tedy jako rozhodovací faktor použita pouze koncentrace 17-OHP, sníží se tím falešná pozitivita (FP) o 40 % (viz. kap 4.1.1.2). Přidáme-li však i další parametry jako koncentraci 21-DC a numerické poměry analytů (17-OHP+AND)/KOR resp. (17-OHP+AND+21-DC)/KOR, podaří se FP snížit až o 98 %. V rámci laboratorního algoritmu pro posouzení suspekce CAH by pak mělo být klíčové následující kritérium: koncentrace 17-OHP > 4 ng/ml a současně koncentrace 21-DC > 1,3 ng/ml. Také by měly být zvýšené oba poměry ke KOR. V případě minoritního deficitu 11-OHD by se měl nález projevit ve zvýšené koncentraci 11-DC > 1,9 ng/ml se zvýšeným poměrem (17-OHP+11-DC)/KOR > 0,28 ng/ml.

3.3.2 Měření biologických vzorků séra/plazmy

Zvalidovaná LC-MS/MS metoda byla následně aplikována i pro měření výše uvedených metabolitů ze vzorků séra/plazmy. Po přípravě (postup v kapitole 2.5.5) 50 µl anonymně vybraných deseti vzorků séra byly změřeny koncentrace 17-OHP, AND, KOR, 11-DC a 21-DC. Změřené koncentrační rozmezí analytů se nachází v Tabulce 12.

Analyt	**Koncentrační rozmezí [ng/ml]**
17-OHP	0,4 – 3,1
AND	0,3 – 0,6
KOR	37 – 187
11-DC	0,4 – 0,9
21-DC	0,3 – 0,5

Tabulka 12: Koncentrační rozmezí jednotlivých analytů ze vzorků séra/plazmy měřených LC-MS/MS metodou

Ze získaných výsledků lze tedy z referenčního rozmezí předpokládat, že všechny vybrané vzorky byly negativní. Pozitivní vzorek od pacienta s CAH nebyl k dispozici. Dále byly změřeny vzorky kontrolního séra s definovanou cílovou koncentrací pro každý z pěti analytů (vzorek kontroly kvality), a to na koncentračních hladinách 0,4 ng/ml, 4,0 ng/ml a 10,0 ng/ml. Všechny analyty na všech třech koncentračních úrovních vykazovaly po změření odchylku (CV %), která nepřesahovala 10 % vůči cílovým hodnotám. Bylo tím potvrzeno, že metoda může být také použita pro měření vzorků ze séra, respektive plazmy a může sloužit jako ověřovací při odchylkách, nebo interferencích ve vzorku DBS.

4 Závěr

Byla vyvinuta LC-MS/MS metoda pro stanovení 17-hydroxyprogesteronu, androstenedionu, kortisolu, 11-deoxykortisolu a 21-deoxykortisolu v suché krevní kapce. Tato metoda byla následně zvalidována a byla prokázána její robustnost a použitelnost pro měření biologických vzorků. Metoda byla aplikována na klinické vzorky programu novorozeneckého screeningu kongenitální adrenální hyperplasie (CAH), rozpoznala pacienty od negativních kontrol a zásadně zredukovala falešnou pozitivitu výsledků novorozeneckého screeningu použitím dalších parametrů hodnocení. Bylo také ověřeno, že metodu lze využít i pro měření ze vzorků séra, resp. plazmy. To umožní další konfirmaci suspektních nálezů a zacílení diagnosy CAH. Do budoucna bude metoda součástí laboratorního algoritmu v rámci diagnostiky CAH probíhajícího novorozeneckého screeningu, jako tzv. konfirmační druhostupňový test.

5 Použitá literatura

[1] Hampl R. (**2015**): Hormony. https://www.natur.cuni.cz/chemie/biochem/ke-stazeni/hormony-prof.-richard-hampl/skripta-hormony-prof.-richard-hampl/view ,(cit. 12.1. 2020).

[2] Ledvina, M, Stoklasová A, Cerman J. (**2009**): Biochemie pro studující medicíny. Karolinum. Praha.

[3] New M. I. 21-Hydroxylase Deficiency Congenital Adrenal Hyperplasia. *J. Steroid. Biochem*. **1994**, 48 (1),15–22.

[4] Speiser P. W., White, P. C. Congenital Adrenal Hyperplasia. *N. Engl. J. Med.* **2003**, 349 (8), 776–788.

[5] Merke D. P. Approach to the Adult with Congenital Adrenal Hyperplasia Due to 21-Hydroxylase Deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *93* (3), 653–660.

[6] Huynh T, McGown I, Cowley D, et al. The clinical and biochemical spectrum of congenital adrenal hyperplasia secondary to 21-hydroxylase deficiency. *Clin Biochem Rev.* **2009**, 30 (2), 75-86.

[7] L. Delle Piane P.F., Rinaudo W.L. Miller, 150 years of congenital adrenal hyperplasia: translation and commentary of de Crecchio's classic paper, *Endocrinology.* **2015***,* 156 (4), 1210–1217.

[8] CAH. https://www.novorozeneckyscreening.cz/kongenitalni-adrenalni-hyperplazie-cah ,(cit. 4.11.2019).

[9] Podgórski R., Aebisher D., Stompor M., Podgórska D., Mazur A. Congenital Adrenal Hyperplasia: Clinical Symptoms and Diagnostic Methods. *Acta Biochim Pol*. **2018**, 65 (1), 25–33.

[10] Stokowski L. Congenital Adrenal Hyperplasia: An Endocrine Disorder with Neonatal Onset. *Crit. Care. Nurs. Clin*. **2009**, 21 (2), 195–212.

[11] Parsa A. A., New, M. I. Steroid 21-hydroxylase deficiency in congenital adrenal hyperplasia. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol*. **2017**, 165, 2-11.

[12] What are the symptoms of congenital adrenal hyperplasia. https://www.nichd.nih.gov/health/-topics/cah/conditioninfo/symptoms,(cit. 4.11.2019).

[13] J. Decourt, M. F. Jayle, and E. Baulieu, Virilisme cliniquement tardif avec excretion de pr ´ egnanetriol et insu ´ ffisance de la production du cortisol. Ann. Endocrinol. **1957**, 18 (3), 416–422.

[14] Falhammar H., Nordenström A. Nonclassic Congenital Adrenal Hyperplasia Due to 21-Hydroxylase Deficiency: Clinical Presentation, Diagnosis, Treatment, and Outcome. *Endocrine. Humana Press*, **2015**, 50 (1), 32–50.

[15] Feldman Witchel S.; Azziz R. Nonclassic Congenital Adrenal Hyperplasia. *Int. J. Pediatr. Endocrinol.* **2010**, 95 (13), 1-11.

[16] Kamoun M., Feki M., Sfar M., Abid M. Congenital Adrenal Hyperplasia: Treatment and Outcomes. *Indian J. Endocrinol. Metab.* **2013**, *17* (7), 14.

[17] Co je novorozenecký screening. https://www.novorozeneckyscreening.cz/ov-co-je-novorozenecky-screening, (cit. 5.11. 2019).

[18] Alexander D. The National Institute of Child Health and Human Development and phenylketonuria. *Pediatrics*. **2003**, 112 (6), 1514-1515.

[19] Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*. **1963**, 32: 338–43.

[20] Pang S., Hotchkiss J., Drash A. L., Levine L. S., New M. I. Microfilter Paper Method for 17α-Hydroxyprogesterone Radioimmunoassay: Its Application for Rapid Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1977**, *45* (5), 1003–1008.

[21] Honour J. W. 17-Hydroxyprogesterone in Children, Adolescents and Adults. *Ann. Clin. Biochem*. **2014**, 51 (4), 424–440.

[22] Witchel S. F. Newborn Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia: Beyond 17-hydroxyprogesterone Concentrations. *J. Pediatr.* **2019**, *95* (3), 257–259.

[23] Yau M., Gujral J., New M., I. (2019), Congenital Adrenal Hyperplasia: Diagnosis and Emergency Treatment. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279085/,(cit. 27.1.2020).

[24] Janzen N., Peter M., Sander S., Steuerwald U., Terhardt M., Holtkamp U., Sander J. Newborn Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia: Additional Steroid Profile using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Clin. Endocr. Metab*. **2007**, 92(7), 2006-2890.

[25] Wong T, Shackleton CH, Covey TR, Ellis G. Identification of the steroids in neonatal plasma that interfere with 17α-hydroxyprogesterone radioimmunoassays. *Clin Chem.* **1992**, 38 (9), 1830–1837.

[26] Lacey J. M., Minutti C. Z., Magera M. J., Tauscher A. L., Casetta B., McCann M., Lymp J., Hahn S. H., Rinaldo P., Matern D. Improved Specificity of Newborn Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia by Second-Tier Steroid Profiling Using Tandem Mass Spectrometry. *Clin. Chem.* **2004**, *50* (3), 621–625.

[27] Záruba K. (**2016**): Analytická chemie. Vysoká škola chemicko-technologická, Praha.

[28] Motyka K., Hlaváč J. (**2009**): Stručný přehled separačních metod. Univerzita Palackého, Olomouc.

[29] Cvačka J. Detekce ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii. https://web.natur.cuni.cz/~analchem/bosakova/hplc3.pdf, (cit. 8.12.2019).

[30] Harvey, D. (**2000**): Modern Analytical Chemistry. McGraw-Hill, Print, Boston.

[31] Griffiths J. A Brief History of Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2008**, 80 (15), 5678–5683.

[32] Cvačka J.:Hmotnostní detekce v separačních metodách. http://www.muj-web.cz/vyuka/MS/files/01_MC230P83_2020.pdf, (cit.20.1.2020).

[33] Friedecký D; Lemr K. Úvod Do Hmotnostní Spektrometrie. **2012**; Klin. Biochem. Metab., 20 (41), 152–157.

[34] Wilm M. S., Mann M. Electrospray and Taylor-Cone theory, Dole´s beam of macromolecules at last? *Int. J. Mass Spectrom. Ion. Proc*. **1994**, 136 (2-3), 167-180.

[35] Dass, Ch. (**2001**): Principles and practice of biological mass spectrometry. John Wiley, New York.

[36] Mirzaei H., Carrasco M. (**2016**): Modern Proteomics – Sample Preparation, Analysis and Practical Applications. Springer. Švýcarsko.

[37] Holčapek M.: Hmotnostní spektrometrie v organické analýze. http://holcapek.upce.cz/teaching/Mol_spek/Mol_spek_prednaska6_MS.pdf, (cit.7.2.2020).

[38] Schreiber A.: Advantages of Using Triple Quadrupole over Single Quadrupole Mass Spectrometry to Quantify and Identify the Presence of Pesticides in Water and Soil Samples. https://sciex.com/x51131, (cit. 15.2. 2020).

[39] Sadílek M. Úvod do tandemové hmotnostní spektrometrie. *Chem. Listy*. **2020**, *114*, 133-144. Upraveno.

[40] de Hoffmann E. (**2006**): Tandem Mass Spectrometry: Fundamentals and Instrumentation. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK.

[41] Sparkman O. D., Penton Z., Kitson F. G. (**2011**): Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide. Elsevier, Boston.

[42] Wudy S.A., Watcher U.A., Homoki J., Teller W.M. 17 alpha-hydroxyprogesterone,4-androstenedione, and testosterone profiled by routine stable isotope dilution/gas chromatography-mass spectrometry in plasma of children. *Pediatr Res.* **1995**, 38, 76–80.

[43] Pluháček T., Havlíček V. Hmotnostní spektrometrie v toxikologii a forenzní analýze, *Chem. Listy.* **2020***, 114*, 220-224. Upraveno.

[44] Fingerhut R. False positive rate in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia (CAH)-ether extraction reveals two distinct reasons for elevated 17alpha-hydroxyprogesterone (17-OHP) values, *Steroids*. **2009**, 74 (8), 662–665.

[45] Minutti C.Z., Lacey J.M., Magera M.J., et al., Steroid profiling by tandem mass spectrometry improves the positive predictive value of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004***,* 89 (8), 3687–3693.

[46] Schwarz E., Liu A., Randall H., et al. Use of steroid profiling by UPLC–MS/MS as a second tier test in newborn screening for congenital adrenal hyperplasia: the Utah experience, *Pediatr. Res.* **2009**, 66 (2), 230–235.

[47] Shackleton, C. Clinical Steroid Mass Spectrometry: A 45-Year History Culminating in HPLC-MS/MS Becoming an Essential Tool for Patient Diagnosis. *J. Steroid. Biochem.* **2010**, 121 (3-5), 481–490.

[48] Miller, Walter L. Congenital Adrenal Hyperplasia: Time to Replace 17OHP with 21-Deoxycortisol. *Horm. Res. Paediatr*. **2019**, 91, 1-5.

[49] Rossi C., Calton L., Hammond G., et al. Serum steroid profiling for congenital adrenal hyperplasia using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Clin. Chim. Acta.* **2010**, 411 (3-4), 222–228.

[50] Javorka K. (**2001**): Lekárska fyziológia: učebnica pre lekárske fakulty. Osveta, Martin.

[51] Difference Between Plasma and Serum. https://biodifferences.com/difference-between-plasma-and-serum.html, (cit.11.5.2020).

[52] Meesters, R. J.; Hoof, G. P. Dried Blood Samples Technique. *Bioanal. Futur. Sci.* **2013**, *5* (17), 2187–2208.

[53] McCabe ER., Huang SZ., Seltzer WK., Law ML. DNA microextraction from dried blood spots on filter paper blotters: potential applications to newborn screening. *Hum Genet.* **1987**, 75 (3), 213–216.

[54] Makowski GS, Aslanzadeh J, Hopfer SM. In situ PCR amplification of guthrie card DNA to detect cystic fibrosis mutations. *Clin Chem.* **1995**, 41 (3), 477–479.

[55] Harahap NI, Harahap IS, Kaszynski RH, Nurputra DK, Hartomo TB, Pham HT, et al. Spinal muscular atrophy patient detection and carrier screening using dried blood spots on filter paper. *Genet Test Mol Bioma.* **2012**, 16 (2), 123–129.

[56] Edelbroek P. M., Heijden, J. Van Der, Stolk L. M. L. Dried Blood Spot Methods in Therapeutic Drug Monitoring: Methods, Assays, and Pitfalls. *Ther. drug. monit*. **2009**, 31 (3), 327–336.

[57] D'Arienzo C. J., Ji Q. C., Discenza L., Cornelius G., Hynes J., Cornelius L., et al. DBS sampling can be used to stabilize prodrugs in drug discovery rodent studies without the addition of esterase inhibitors. *Bioanalysis*. **2010**, 2 (8), 1415-1422.

[58] Lehmann S., Delaby C., Vialaret J., Ducos J., Hirtz C. Current and future use of "dried blood spot" analyses in clinical chemistry. *Clin. chem. lab. med.* **2013**, 51(10), 1897-1909.

[59] Garcia Boy R., Henseler J., Mattern R., Skopp G. Determination of morphine and 6-acetylmorphine in blood with use of dried blood spots. *Ther. drug. monit*. **2008**, 30(6), 733-739.

[60] Heath A. K., Williamson E.J., Ebeling P.R., Kvaskoff D., Eyles D.W., English D. R. Measurements of 25-hydroxyvitamin D concentrations in archived dried blood spots are reliable and accurately reflect those in plasma. *J. Clin. Endocrinol.* **2014**, 99 (9), 3319-3324.

[61] Uttayamakul S., Likanonsakul S., Sunthornkachit R., Kuntiranont K., Louisirirotchanakul S., Chaovavanich A., et al. Usage of dried blood spots for molecular diagnosis and monitoring HIV-1 infection. *J Virol Methods.* **2005**, 128 (1-2), 128–134.

[62] Etter M., Eichhorst J., Lehotay D. Clinical determination of 17-hydroxyprogesterone in serum by LC–MS/MS: Comparison to Coat-A-Count™ RIA method. *J. Chromatogr. B.* **2006**, 840 (1), 69–74.

[63] Turpeinen U., Itkonen O., Ahola L., Stenman U. H. Determination of 17α-hydroxyprogesterone in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and immunoassay. *Scan. J. Clin. Lab. Inv.* **2005**, 65 (1), 3–12.

[64] Referenční hodnoty laboratorních vyšetření, Masarykův onkologický ústav. www.mou.cz (cit.17.4.2020).

[65] McHugh D. M. S., Cameron C. A., Abdenur J. E., Abdulrahman M., Adair O., Al Nuaimi S. A., Archer S. Clinical validation of cutoff target ranges in newborn screening of metabolic disorders by tandem mass spectrometry: A worldwide collaborative project. *Genet Med.* **2011**, 13 (3), 230–254.