

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra analytické chemie



**VYUŽITÍ HPLC A LC-MS/MS METOD
V DIAGNOSTICE DĚDIČNÝCH
METABOLICKÝCH PORUCH**

disertační práce

Praha 2014

Josef Bártl

Prohlášení

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

V Praze dne 10. června 2014

Mgr. Josef Bártl

Tato disertační práce byla vypracována v Ústavu dědičných metabolických poruch,
VFN a 1. LF UK, Ke Karlovu 2, Praha 2.

Školitel: Doc. RNDr. Ivan Jelínek, CSc.
Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze

Konzultant: Ing. Petr Chrastina
Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK

Děkuji všem, kteří do této práce vložili svoji odbornost, finanční prostředky, trpělivost a
toleranci.

Seznam použitých zkratek a symbolů

AMP	adenosinmonofosfát
AO	aldehydoxidas
APCI	chemická ionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Chemical Ionization)
APPI	fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure Photoionization)
ATP	adenosintrifosfát
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CBS	cystathionin beta-syntasa
CV	variační koeficient (Coefficient of Variation)
Cysta	cystathionin
CZE	kapilární zónová elektroforéza (Capillary Zone Electrophoresis)
DBS	suchá krevní kapka (Dried Blood Spot)
DDT	dithiotreitol
DMP	dědičné metabolické poruchy
ESI	ionizace elektrosprejem (Electrospray Ionization)
FAD	flavinadenindinukleotid
FIA	přítoková injekční analýza (Flow Injection Analysis)
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
GMP	guanosinmonofosfát
GTP	guanosintrifosfát
HILIC	hydrofilní interakční chromatografie (Hydrophilic Interaction Chromatography)
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
HPX	hypoxanthin
IMP	inosinmonofosfát
IT	iontová past (Ion Trap)

IXP	isoxanthopterin
LC	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
LOQ	limit kvantifikace (Limit of Quantitation)
Met	methionin
MRM	monitorování vybraných reakcí (Multiple Reaction Monitoring)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem Mass Spectrometry)
NAD	nikotinamidadenindinukleotid
NS	novorozenecký screening (Newborn Screening)
NL	skan neutrální ztráty (Neutral Loss)
PI	skan produktových iontů (Product Ion scan)
PRPP	fosforibosylpyrofosfát
PS	skan prekurzoru (Precursor ion Scan)
QqQ	trojitý kvadrupól (triple quadrupole)
RP-HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie na reverzní fázi (reverse phase)
TCEP	tris(2-carboxyethyl)phosphin
tHcy	celkový homocystein (total Homocysteine)
TLC	tenkovrstvá chromatografie (Thin-Layer Chromatography)
UDP	uridindifosfát
UV	ultrafialová oblast spektra (ultraviolet)
XAN	xanthin
XDH	xanthindehydrogenasa
λ	vlnová délka

ABSTRAKT

V rámci této disertační práce byly vyvinuty a optimalizovány metody kapalinové chromatografie (HPLC) a tandemové hmotnostní spektrometrie (LC-MS/MS) a následně využity pro diagnostiku dědičných metabolických poruch.

První tematický okruh popisuje zavedení komplexního laboratorního postupu pro diagnostiku pacientů s dědičnou xanthinurií využívající kvantifikaci klíčových biochemických markerů a stanovení aktivity enzymu v plazmě. Pro tyto účely byla zavedena HPLC metoda s detekcí diodového pole pro kvantifikaci hypoxanthinu, xanthinu, allopurinolu a oxypurinolu v moči a plazmě a metoda pro stanovení pterinu a isoxanthopterinu v plazmě využívající HPLC separaci a detekci látek fluorimetrickým detektorem. Tyto metody byly úspěšně aplikovány v klinické praxi při diagnostice dvou pacientů s xanthinurií I. typu.

Druhý tematický okruh je věnován vývoji a klinické aplikaci LC-MS/MS metody pro kvantitativní stanovení celkového homocysteinu (tHcy), methioninu (Met) a cystathioninu (Cysta) v suché krevní kapce a plazmě. Bylo prokázáno, že tato metoda dokáže detekovat pacienty s homocystinurií a zároveň rozlišit na základě koncentračních poměrů jednotlivých analytů, zda je porucha v transsulfurační či remethylační části metabolismu homocysteinu. Díky jednoduchému odběru a transportu vzorku suché krevní kapky je tato metoda také vhodná pro monitoring koncentrací tHcy a Met u již diagnostikovaných pacientů v rámci sledování dietní kompenzace. Zároveň může být ideálním nástrojem pro rychlou detekci pacientů s hyperhomocysteinemií v rámci novorozeneckého screeningu, který využívá suchou krevní kapku pro vyhledávání poruch metabolismu methioninu. Během studie byla také získána unikátní data o koncentracích cystathioninu v suché krevní kapce, která nebyla dosud publikována.

ABSTRACT (English)

This dissertation thesis is focused on development and optimization of high-performance liquid chromatography (HPLC) and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) methods, and its utility for diagnosis of inherited metabolic diseases.

The first thematic part describes a comprehensive laboratory approach to diagnostics of patients with hereditary xanthinuria by determination of specific markers and enzyme activity. For this purpose HPLC method with diode array detection for measurement of hypoxanthine, xanthine, allopurinol and oxypurinol in urine and plasma and HPLC method with fluorimetric detection for analysis of pterin and isoxanthopterin in plasma were employed. These methods were successfully applied in clinical practice to ascertain two patients with hereditary xanthinuria type I.

The second thematic part aims at developing and clinical application of new LC-MS/MS method for simultaneous determination of total homocysteine (tHcy), methionine (Met) and cystathionine in dried blood spots (DBS) and plasma. The results demonstrated the clinical utility of this method for detection of patient with homocystinuria and possibility to distinguish between defects in the remethylation and transsulfuration pathways of homocysteine metabolism. Due to ease of DBS collection and sample transportation this method is suitable for monitoring of tHcy and Met concentrations of homocystinuria patients and also as a rapid screening procedure for detecting patients with hyperhomocysteinemia applied in newborn screening of Met disorders. During the study unique and unpublished data of Cysta concentrations in DBS were obtained.

Obsah

Seznam použitých zkratk a symbolů	4
ABSTRAKT	6
ABSTRACT (English)	7
Obsah	8
1. Úvod	9
1.1. Dědičné metabolické poruchy	9
1.2. Laboratorní diagnostika	9
1.3. Cíl práce.....	10
1.4. Literatura.....	10
2. Purinový metabolismus.....	12
2.1. Poruchy metabolismu purinů.....	12
2.2. Dědičná xanthinurie	13
2.3. Literatura.....	15
3. Metabolismus homocysteinu.....	17
3.1. Poruchy metabolismu homocysteinu	17
3.2. Suchá krevní kapka (DBS).....	19
3.3. Literatura.....	20
4. Kapalinová chromatografie a tandemová hmotnostní spektrometrie	22
4.1. Literatura.....	25
5. Výsledky a diskuse.....	27
5.1. Laboratorní diagnostika dědičné xanthinurie pomocí HPLC.....	27
5.1.1. Stanovení purinových metabolitů.....	27
5.1.2. Allopurinolový test	31
5.1.3. Stanovení aktivity xanthindehydrogenasy v plazmě.....	32
5.2. Stanovení markerů metabolismu homocysteinu metodou LC-MS/MS	34
5.2.1. Optimalizace a validace metody	34
5.2.2. Porovnání výsledků	36
5.2.3. Aplikace metody v praxi	36
6. Závěr.....	38
Příloha I	40
Příloha II	48
Příloha III – Seznam publikací a posterových prezentací.....	69
Příloha IV – Potvrzení účasti.....	72

1. Úvod

1.1. Dědičné metabolické poruchy

Dědičné metabolické poruchy (DMP) jsou heterogenní soubor zhruba 800 vzácných onemocnění, s kumulativní incidencí 1:800 narozených dětí¹. Jsou důsledkem vrozené genetické mutace, která vede k poruše funkce některého enzymu nebo strukturálního či transportního proteinu v organismu². Následkem toho se v daném místě hromadí substrát daného enzymu či jeho patologický metabolit a produkt je naopak v koncentraci snížen. Široká škála možných defektů v jakékoli části metabolismu implikuje klinickou variabilitu symptomů od benigních forem až po akutní onemocnění podílející se na mortalitě převážně u dětí³. Včasná diagnostika těchto poruch je klíčová pro jejich léčbu a většinou rozhoduje o míře poškození pacienta. Studium patogeneze DMP je také výrazným faktorem pro rozvoj poznání biochemické podstaty procesů v lidském organismu.

1.2. Laboratorní diagnostika

DMP jsou diagnostikovány a studovány v různých biologických matricích a tkáních na třech úrovních; metabolit – enzym – gen. Pokud se dané onemocnění vyznačuje specifickým biochemickým markerem, vždy se začíná od nejrychlejší a nejlevnější varianty, tedy vyšetření metabolitů v moči, krvi, suché krevní kapce, plazmě, likvoru nebo tkáni. Ideálním přístupem je následně komplexní vyšetření potvrzené na všech třech úrovních.

Značná diverzita DMP a jejich biochemických markerů předurčuje i širokou škálu analytických metod pro jejich diagnostiku na úrovni metabolitů. Dle fyzikálně-chemických vlastností analytů se volí různé přístupy pro separaci a detekci, od jednoduchých aplikací například tenkovrstvé chromatografie až po složité instrumentální metody. Volba metody je závislá nejen na analytu samotném, ale musí odstínit i vliv biologické matrice, obsahující velké množství interferentů, mnohdy v koncentracích vysoce převyšujících analyt. Dalším významným faktorem pro volbu metody je koncentrace sledovaných analytů v dané matrici, která se může pohybovat od nmol/l až po mmol/l.

Díky rozvoji metod s velmi citlivou detekcí je možné analyzovat látky v nízké koncentraci (nmol/l) a monitorovat tak části metabolismu, které nebyly v minulosti analyticky přístupné. V této oblasti má nezastupitelnou pozici hmotnostní spektrometrie kombinovaná s GC či LC separačním modulem. Vysoká citlivost a selektivita MS v kombinaci s univerzálností chromatografických systémů hraje klíčovou roli v diagnostice DMP. Tuto skutečnost potvrzuje také fakt, že v rámci celosvětově rozšířených programů novorozeneckého screeningu (NS) se pro tyto účely využívá technologie tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS)⁴. Také v České republice se od 1. října 2009 provádí rozšířený novorozenecký screening deseti DMP využívající MS/MS instrumentaci pro kvantifikaci aminokyselin a acylkarnitinů ze suché krevní kapky⁵.

1.3. Cíl práce

Tato disertační práce je zaměřena na vývoj a optimalizaci metod kapalinové chromatografie a tandemové hmotnostní spektrometrie a jejich využití v diagnostice dědičných poruch metabolismu.

Cílem této práce je rozšířit možnosti laboratorní diagnostiky poruch metabolismu purinů se zaměřením na dědičnou xanthinurii. Pro tyto účely optimalizovat HPLC metody pro detekci a kvantifikaci klíčových markerů asociovaných s touto poruchou a úspěšně je aplikovat v klinické praxi.

Další cíl je zaměřen na oblast metabolismu homocysteinu - na vývoj a aplikaci LC-MS/MS metody, která by umožnila rychlou a komplexní kvantifikaci diagnosticky významných metabolitů ze suché krevní kapky nebo plazmy a přispěla tak k detekci pacientů s homocystinurií.

Koncept práce je založen na dvou publikacích uvedených jako součást práce v přílohách I a II.

1.4. Literatura

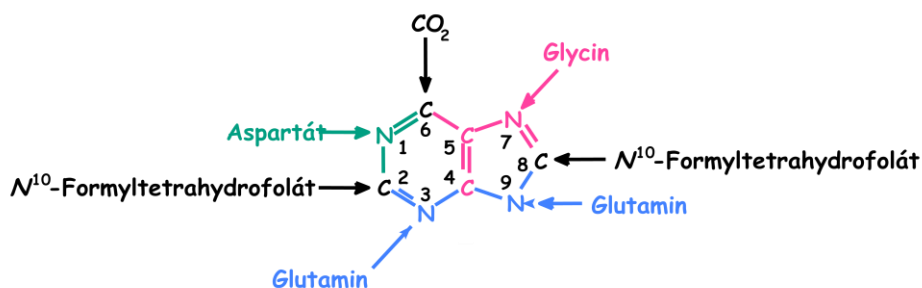
1. Stuart G, Ahmad N. Perioperative care of children with inherited metabolic disorders. *Contin Educ Anaesth Crit Care Pain* 2011;11:62–8.
2. Saudubray JM, Sedel F, Walter JH. Clinical approach to treatable inborn metabolic diseases: *J Inherit Metab Dis* 2006;29:261–274.

3. Pampols T. Inherited metabolic rare diseases. In: Posada de la Paz M, Groft SC, editors. Rare diseases epidemiology. Dordrecht, Heidelberg, London, new York: Springer; 2010,p.397-431.
4. Mak CM, Lee HC, Chan AY, Lam CW. Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening: review and update. Crit Rev Clin Lab Sci 2013;50:142-62.
5. Metodický návod k zajištění celoplošného novorozeneckého laboratorního screeningu a následné péče. Věstník Ministerstva zdravotnictví ČR 2009; 6:7-14.

2. Purinový metabolismus

2.1. Poruchy metabolismu purinů

Puriny jsou heterocyklické dusíkaté sloučeniny tvořené kondenzovaným pyrimidinovým a imidazolovým kruhem. Vzhledem k jejich důležité funkci v živých systémech se všechny deriváty obsahující purinový skelet (nukleotidy, nukleosidy) nazývají souhrnně puriny. Představují důležité sloučeniny participující na mnoha biochemických procesech. Spolu s pyrimidiny tvoří základní stavební složky nukleových kyselin. Mají klíčovou funkci při transportu a ukládání energie (ATP, GTP). Tvoří aktivované intermediáty v biosyntetických cestách (UDP-glukóza). Jsou součástí koenzymů (NAD^+ , FAD) a neurotransmiterů. Regulují buněčný metabolismus (cAMP).



Obr. 2.1 Struktura purinu s původem biosynteticky inkorporovaných atomů

Purinový metabolismus lze rozdělit do tří základních částí: 1) biosyntéza de novo začínající tvorbou fosforibosylpyrofosfátu (PRPP) a vedoucí k syntéze inosinmonofosfátu (IMP) respektive adenosinmonofosfátu (AMP) a guanosinmonofosfátu (GMP); 2) katabolická cesta, kde dochází k odbourávání GMP, IMP a AMP za konečné produkce kyseliny močové; 3) recyklační metabolická cesta, využívající purinové báze guanin, hypoxanthin a adenin ze stravy nebo z katabolické cesty k opětovné tvorbě GMP, IMP a AMP¹. Enzymové defekty vedoucí k metabolické poruše byly popsány ve všech třech částech purinového metabolismu. Z důvodu rozsáhlého biochemického uplatnění purinů je klinická manifestace těchto poruch velmi široká a může postihovat jakýkoli systém^{2,3}.

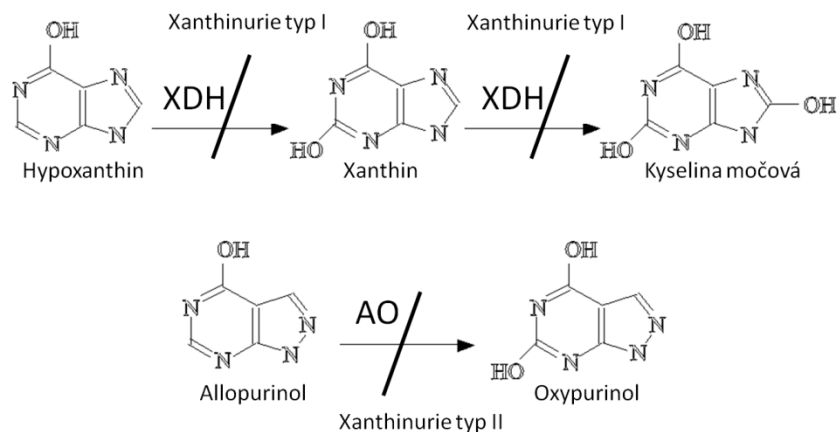
Výhodou pro laboratorní diagnostiku jsou signifikantní odchylky v koncentracích analytů v tělních tekutinách charakteristických pro jednotlivé defekty.

Materiálem první volby je vždy moč, do které jsou tyto látky ochotně vylučovány. V současné době je k diagnostice poruch metabolismu purinů využíváno mnoho analytických přístupů moderní instrumentace. Díky heterocyklické struktuře obsahující dvojné vazby a polárním charakteru analytů je velmi častým přístupem použití RP-HPLC s detekcí v ultrafialové oblasti^{4,5}. Vzhledem k velmi dobré ionizovatelnosti purinových derivátů je ideálním nástrojem také kapilární elektroforéza⁶. Komplexní biologická matrice může ovšem obsahovat mnoho interferujících látek, proto bylo publikováno několik aplikací využívajících selektivnější přístup na bázi kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií s ionizací elektrosprejem^{7,8}.

Navzdory klinické závažnosti těchto poruch se však z důvodu jejich vzácného výskytu v populaci a relativně náročné instrumentaci komplexní laboratorní diagnostika provádí v několika laboratořích na světě. V Evropě se těmto poruchám systematicky věnují pouze ve Velké Británii a v Nizozemsku.

2.2. Dědičná xanthinurie

Xanthinurie je metabolická porucha způsobená dysfunkcí enzymů katalyzujících poslední dva kroky degradace purinů, oxidaci hypoxanthinu (HPX) na xanthin (XAN) a následně XAN na kyselinu močovou. Důsledkem je nadměrné vylučování XAN a HYP do moče. Incidence této poruchy bývá odhadována zhruba na 1:70,000⁹. Na základě poruchy příslušného enzymu je dědičná xanthinurie rozlišována na dva základní typy. Xanthinurie I. typu je způsobena izolovaným deficitem xanthindehydrogenasy (XDH), zatímco typ II je kombinací deficitu XDH a zároveň strukturně příbuzného enzymu aldehydoxidas (AO)¹⁰ (Obr.2.2). XDH a AO jsou evolučně příbuzné enzymy sdílející sulfurovaný molybdenový kofaktor. Zatímco role XDH v purinovém metabolismu je dobře popsána, fyziologická funkce AO je stále neznámá¹¹. Z omezených zdrojů publikovaných v oblasti diagnostiky xanthinurie se zdá, že typ I je v populaci více rozšířen¹².



Obr. 2.2 Metabolické schéma oxidace purinových derivátů rozlišující xanthinurii typ I (deficit XDH) a typ II (kombinovaný deficit XDH a AO).

Z klinického hlediska je hlavním problémem urolitiáza způsobená hromaděním xanthinu v moči, která může vést až k renálnímu postižení¹⁰. Většina pacientů je asymptomatická, nicméně byly popsány symptomy související s kloubními změnami, myopatií či tvorbou duodenálních vředů^{13,14}. O důsledcích výrazně snížené produkce kyseliny močové se nadále vedou spory, ale zatím nebyla prokázána žádná klinická korelace.

Prvním krokem v laboratorní diagnostice xanthinurie je rutinní vyšetření kyseliny močové v krvi a moči, které odhalí tuto poruchu mnohdy náhodně. Pokud jsou vyloučeny poruchy funkce ledvin a podobné obtíže, které by mohly ovlivnit výsledky, u všech pacientů je koncentrace kyseliny močové signifikantně snížená až nedetekovaná (spodní mez referenčního rozmezí pro kyselinu močovou v plazmě je 90 $\mu\text{mol/l}$). Dalším možným, již více specifickým krokem, je vyšetření koncentrace HPX a XAN v moči, případně v plazmě⁴⁻⁸. Tyto techniky již byly popsány v kapitole 2.1 a jsou většinou založeny na principu HPLC s UV detekcí. Pro rozlišení typu xanthinurie se v některých laboratořích používá allopurinolový test nebo enzymové vyšetření z jaterní tkáně¹⁵. Zátěžový test s allopurinolem je realizován vyšetřením plazmy před podáním a 1 hodinu po podání allopurinolu. Jestliže je po hodině v plazmě přítomen jeho metabolický produkt oxypurinol, je tento nálezní důkazem správné funkce AO a dá se usuzovat na typ I. V případě absence oxypurinolu se jedná o xanthinurii II. typu. Rozlišení typu je nezbytné pro následné molekulárně-genetické vyšetření. Vzhledem k tomu, že enzym XDH je exprimován převážně v játrech, většinou enzymovému vyšetření předchází biopsie jaterní tkáně. Ovšem vzácně byly popsány i práce, kde byla

aktivita měřena v plasmě za využití pterinu jako substrátu a jeho následné konverze na isoxanthopterin¹⁶. Konfirmačním a nejvíce finančně nákladným krokem je pak molekulárně-genetické vyšetření genu kódující příslušný enzym.

Navzdory výše popsaným metodám je komplexní vyšetření, zahrnující diferenciální diagnostiku xanthinurií na biochemické úrovni ve světě spíše vzácností. Také proto se soudí, že incidence tohoto metabolického defektu je značně podhodnocena.

2.3. Literatura

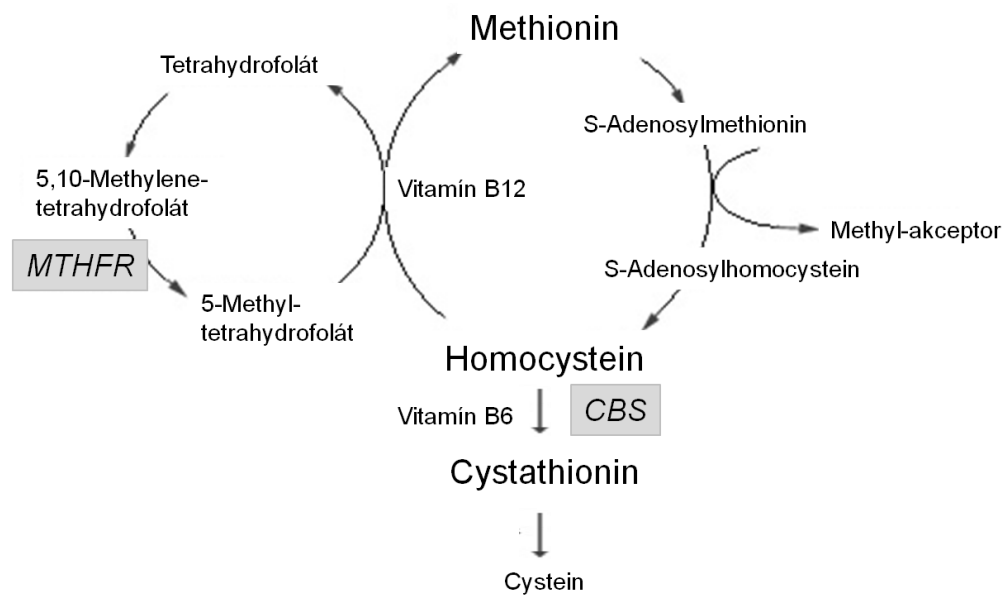
1. van den Berghe G, Vincent MF, Marie S. Disorders of purine and pyrimidine metabolism. In: Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH. Inborn metabolic diseases: diagnosis and treatment. Heidelberg: Springer;2006, p.435-37.
2. Simmonds HA, Duley JA, Fairbanks LD, McBride MB. When to investigate for purine and pyrimidine disorders. Introduction and review of clinical and laboratory indications. *J Inher Metab Dis* 1997;20:214-26.
3. van den Berghe G, Vincent MF, Jaeken J. Inborn errors of the purine nucleotide cycle: adenylosuccinase deficiency. *J Inher Metab Dis* 1997;20:193-202.
4. Simmonds HA, Duley JA, Davies PM. Analysis of purine and pyrimidines in blood, urine and other physiological fluids. In: Hommes FA editor. Techniques indignant human biochemical genetics – a laboratory manual. New York: Wiley-Liss;1991,p.397-422.
5. Vidotto C, Fousert D, Akkermann M, Griesmacher A, Müller MM. Purine and pyrimidine metabolites in children's urine. *Clinica Chimica Acta* 2003; 335:27-32.
6. Adam T, Friedecky D, Fairbanks LD, Ševčík J, Barták P. Capillary electrophoresis for detection of inherited disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Clin Chem* 1999;45:2086-93.
7. Hartmann S, Okun JG, Schimdt C, Langhans CD, Garbade SF, Burgard P, Haas D, Sass JO, Nyhan WL, Hoffmann GF. Comprehensive detection of disorders of purine and pyrimidine metabolism by HPLC with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2006;52:1127-37.
8. la Marca G, Casetta B, Malvagia S, Pasquini E, Innocenti M, Donati MA, Zammarchi E. Implementing tandem mass spectrometry as a routine tool for characterizing the complete purine and pyrimidine metabolic profile in urine sample. *J Mass Spectrom* 2006;41:1442-52.

9. Harkness RA, McCreanor GM, Simpson D, MacFadyen IR. Pregnancy in and incidence of xanthine oxidase deficiency. *J Inherited Metab Dis* 1986; 9:407-408.
10. Simmons A, Reiter S, Nishino T. Hereditary Xanthinuria. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D, Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*. New York: McGraw-Hill; 1995, p.1781–97.
11. Peretz H, Watson DG, Blackburn G. Urine metabolomics reveals novel physiologic functions of human aldehyde oxidase and provides biomarkers for typing xanthinuria. *Metabolomics* 2012;8:951-959.
12. Simmonds HA, Hoffmann GF, Pérignon JL, Micheli V, van Gennip AH. Diagnosis of molybdenum cofactor deficiency. *Lancet* 1999;353:675.
13. Delbarre F, Weissenbach R, Auscher C, de Gery A. Attack of gout in a xanthinuric patient. *Nouv Presse Med* 1973;2:2465–66.
14. Chalmers RA, Watts RW, Pallis C, Bitensky L, Chayen J. Crystalline deposits in striped muscle in xanthinuria. *Nature* 1969;221:170–71.
15. Ichida K, Yoshida M, Sakuma R, Hosoya T. Two siblings with classical xanthinuria type 1: Significance of allopurinol loading test. *Intern Med* 1998;37: 77–82.
16. Yamamoto T, Moriwaki Y, Takahashi S, et al. Determination of human plasma xanthine oxidase activity by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996;681:395-400.

3. Metabolismus homocysteinu

3.1. Poruchy metabolismu homocysteinu

Homocystein (Hcy) je sirtá aminokyselina, která vzniká jako intermediát v metabolismu methioninu (Met). Sám Hcy je metabolizován dvěma hlavními cestami: remethylační (RM), která vede k obnově methioninu a vyžaduje přítomnost folátů a vitamínu B₁₂ a transulfurační, která odbourává Hcy na cystathionin (Cysta) a následně cystein, za přítomnosti vitamínu B6 (Obr.3.1).



Obr. 3.1 Metabolismus methioninu, respektive homocysteinu.

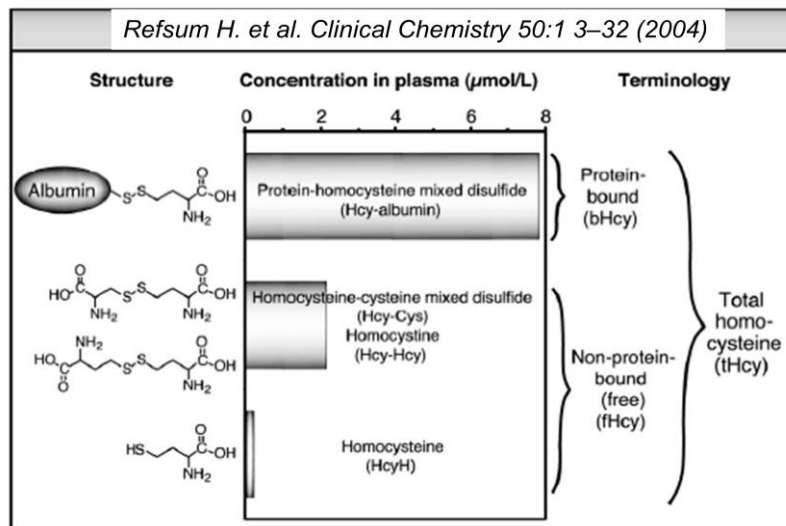
(CBS – Cystathionin beta-syntasa, MTHFR – 5,10-Methylenetetrahydrofolátreduktasa)

Poruchy metabolismu Hcy mohou mít geneticky podmíněnou etiologii, související s deficitem klíčových enzymů RM či transulfurační metabolické dráhy, nebo mohou být důsledkem nutriční nevyváženosti na úrovni vitaminů řady B (foláty, riboflavin, kobalaminy a pyridoxin)¹. Tyto poruchy jsou charakteristické zvýšenou koncentrací Hcy v plazmě a v moči a jsou souhrnně označovány jako homocystinurie. V současné době je popsáno 8 enzymových defektů vedoucích k homocystinurii. Na základě lokalizace enzymové poruchy můžeme rozlišit dvě formy homocystinurie se specifickým metabolickým profilem: a) defekty v remethylační dráze, jako je deficit methylenetetrahydrofolátreduktasy, a defekty v syntéze intracelulárních methylkobalaminů (cblC, cblD, cblE, cblF, cblG a cblJ) – charakterizované vysokou

koncentrací Hcy, zvýšenou koncentrací Cysta a sníženou koncentrací Met; b) deficit cystathionin beta-syntasy (CBS) vyskytující se v transsulfurační dráze s nálezem naopak zvýšené koncentrace Met, snížené koncentrace Cysta a vysoké koncentrace Hcy.

Klinicky se jedná o heterogenní skupinu poruch, která má společný rizikový faktor v podobě tromboembolismu, asociovaného s vysokými koncentracemi Hcy v plazmě². Někteří pacienti s deficitem CBS mohou trpět defekty v pojivových tkáních, poruchou řeči, narušením kognitivních funkcí či epilepsií. U RM defektů může být dominantní neurologické postižení a megaloblastická anémie³. Incidence homocystinurií jako celku je neznámá a pohybuje se v rozmezí 1:8,000 v Kataru až po 1:900,000 v Japonsku⁴.

Laboratorní detekce homocystinurií je založena na dnes již rutinním stanovení koncentrace celkového homocysteinu v plazmě. Za fyziologických podmínek je Hcy v plazmě přítomen pouze v nepatrném množství, většina je vázána na plazmatické bílkoviny či v disulfidech (Obr.3.2). Proto je tedy nezbytné před samotným stanovením provést redukci všech těchto vázaných forem a následně pak stanovit sumu celkového homocysteinu (tHcy).



Obr. 3.2 Různé formy homocysteinu vyskytující se v krevní plazmě.

U pacientů s geneticky podmíněným defektem se koncentrace tHcy pohybují v oblasti výrazné hyperhomocysteinemie, zhruba od 70 µmol/l do 400 µmol/l (referenční rozmezí do 15 µmol/l), takže mohou být odlišeny od sekundárních nálezů

mírného zvýšení tHcy způsobeného například civilizačními chorobami nebo lehkou nutriční disbalancí vitamínů.

Principiálně lze metody stanovení tHcy rozdělit do dvou skupin. Metody založené na chromatografii nebo na enzymovém či imunochemickém stanovení^{5,6}. Velmi častou aplikací jsou HPLC metody jak ve spojení s UV detekcí tak s detekcí fluorimetrickou využívající různé druhy derivatizace^{7,8}. Byla také popsána práce s využitím GC-MS systému⁹. V poslední době byly také publikovány metody využívající LC-MS/MS instrumentaci, kde je po redukci vázaného Hcy za použití dithiothreitolu (DDT) nebo tris(2-carboxyethyl)phosphinu (TCEP) kvantifikován tHcy, případně další sirmé aminokyseliny^{10,11,12}. Využití těchto aplikací bylo důsledkem rutinního rozšíření technik tandemové hmotnostní spektrometrie (hlavně na bázi trojitého kvadrupólu) a také tlaku na vývoj druhostupňových metod pro potřeby novorozeneckého screeningu vyhledávajícího poruchy metabolismu methioninu.

Pro podrobnější diferenciální diagnostiku poruch metabolismu homocysteinu většina laboratoří zpravidla kombinuje enzymové stanovení tHcy pomocí automatických analyzátorů a profilové vyšetření aminokyselin pomocí HPLC, CZE případně automatických aminoanalyzátorů na principu ionexové chromatografie¹³. Kvantifikace cystathioninu v plazmě je využívána pro diagnostické účely spíše vzácně,¹⁴ a to také z důvodu, že Cysta se v plazmě vyskytuje v řádech desetin $\mu\text{mol/l}$, což je o řád níže než v případě tHcy a Met.

3.2. Suchá krevní kapka (DBS)

Suchá krevní kapka, zkracovaná jako DBS z ang. „Dried Blood Spot“, je typ biologického vzorku využívaného pro analytické účely v diagnostice DMP. Je připraven aplikací kapilární krve na speciální druh filtračního papíru, který zajistí homogenní nasáknutí krví v definovaném objemu na jednotku plochy. Po zaschnutí krve může být DBS skladována za laboratorní teploty v závislosti na stabilitě vyšetřovaných analytů. Velkou předností DBS je jednoduchá příprava a transport do laboratoře, který může být realizován jako standardní poštovní zásilka. Z tohoto důvodu jsou DBS vzorky po celém světě využívány pro novorozenecký screening dědičných metabolických poruch za použití tandemové hmotnostní spektrometrie s přímým nástřikem vzorku (ESI-QqQ). Technologie MS/MS je zde nezbytná z důvodu vysoké citlivosti a selektivity. Před

analýzou jsou metabolity extrahovány do různých rozpouštědel na základě jejich chemických vlastností. Pro stanovení je nezbytné použít vnitřní značené standardy minimalizující chyby při kvantifikaci v důsledku iontové suprese, která je pro takto komplexní matrice velmi častá. Ideálním přístupem je také použití kalibračních bodů, připravených jako DBS.

DBS jsou využívány hlavně pro NS, nicméně se také ukazuje jejich výhoda v oblasti rychlého monitoringu dietní kompenzace u již diagnostikovaných pacientů, kteří mohou vzorky odebírat doma a zasílat je do laboratoře poštou. Také byly publikovány práce používající DBS pro stanovení aktivit enzymů¹⁵. V dalších aplikacích jsou DBS také využívány pro stanovení hormonů, lipidů, různých druhů léků a jejich metabolitů, v mikrobiologii či sérologii nebo pro molekulárně-genetická vyšetření.

3.3. Literatura

1. Mudd SH, Levy HL, Kraus JP. Disorders of transsulfuration. In: Scriver ChR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. The metabolic and molecular bases of inherited disease, New York: McGraw-Hill;2001,p.2007-57.
2. Yap S, Boers GH, Wilcken B, Wilcken DE, Brenton DP, Lee PJ, et al. Vascular outcome in patients with homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency treated chronically: a multicenter observational study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:2080-5.
3. Schiff M, Benoist JF, Tilea B, Royer N, Giraudier S, Ogier de Baulny H. Isolated remethylation disorders: Do our treatments benefit patients? *J Inherit Metab Dis* 2011;34:137-45.
4. Naughten ER, Yap S, Mayne PD. Newborn screening for homocystinuria: Irish and world experience. *Eur J Pediatr* 1998;157:84-7.
5. Ubbink JB. Assay methods for the measurement of total homocyst(e)ine in plasma. *Semin Thromb Hemost* 2000;26:233-41.
6. Powers HJ, Moat SJ. Developments in the measurement of plasma total homocysteine. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2000;3:391-7.
7. Rizzo V, Montalbetti L, Valli M et al. Study of factors affecting the determination of total plasma 7-fluorobenzo-2-oxa-1,3-diazole-4-sulfonate (SBD)-thiol derivatives by liquid chromatography. *J Chromatogr B* 1998;706:209-15.

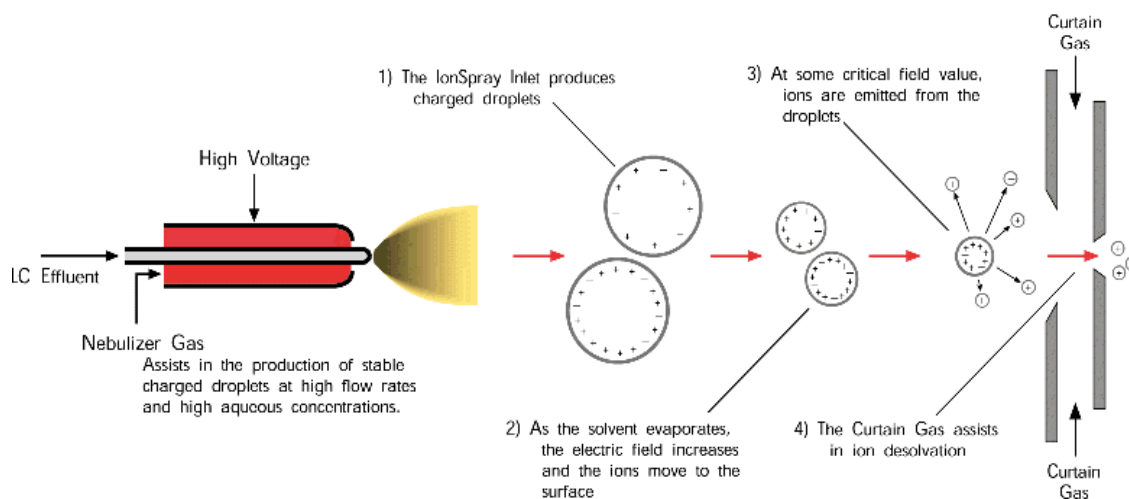
8. Pfeiffer CM, Huff DL, Gunter EW. Rapid and accurate HPLC assay for plasma total homocysteine and cysteine in a clinical laboratory setting. *Clin Chem* 1999; 45:290-2.
9. Kuhara T, Ohse M, Ohdoi C, Ishida S. Differential diagnosis of homocystinuria by urease treatment, isotope dilution and gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;26:742:59-70.
10. Gempel K, Gerbitz KD, Casetta B, Bauer MF. Rapid determination of total homocysteine in blood spots by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2000;46:122-3.
11. Turgeon CT, Magera MJ, Cuthbert CD, Loken PR, Gavrilov DK, Tortorelli S, et al. Determination of total homocysteine, methylmalonic acid, and 2-methylcitric acid in dried blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2010;56:1686-95.
12. Weaving G, Rocks BF, Iversen SA, Titheradge MA. Simultaneous quantitation of homocysteine, cysteine and methionine in plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ann Clin Biochem* 2006;43:474-80.
13. Hyaneck J. Dědičné metabolické poruchy. Praha: Avicenum; 1991.
14. Krijt J, Kopecka J, Hnizda A, Moat S, Kluijtmans LA, Mayne P, Kozich V. Determination of cystathionine beta-synthase activity in human plasma by LC-MS/MS: potential use in diagnosis of CBS deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2011;34:49-55.
15. Chamoles NA, Blanco MB, Gaggioli D, Casentini C. Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chem* 2001;47:2098-102.

4. Kapalinová chromatografie a tandemová hmotnostní spektrometrie

Z důvodu širokého spektra metabolitů s rozdílnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi a jejich rozdílnými koncentracemi v různých biologických matricích je pro komplexní diagnostiku dědičných metabolických poruch využívána celá řada analytických technik. Počínaje jednoduchými aplikacemi např. na tenké vrstvě (TLC) pro separaci a semikvantitativní stanovení oligosacharidů¹ až po komplexní vyšetření několika desítek metabolitů pomocí technik hmotnostní spektrometrie². Tato práce se zabývá převážně analýzou malých polárních molekul, které jsou snadno vylučovány do moče nebo krve. Pro tyto aplikace je ideálním nástrojem kapalinová chromatografie se spektrofotometrickou nebo fluorimetrickou detekcí a tandemová hmotnostní spektrometrie využívající uspořádání trojitého kvadrupólu pro citlivou a selektivní kvantifikaci analytů ve složitých biologických matricích.

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie, zvláště ve spojení s hmotnostní spektrometrií dovoluje stanovení celé řady analytů. HPLC může být díky různým mechanismům separace využita pro analyty jak hydrofobní tak hydrofilní povahy, pro různé soli nebo analyty kyselé či bazické povahy. Nejčastěji bývá z důvodu polárního charakteru metabolitů využívána separace na reverzní fázi, ovšem existují i aplikace na normální fázi³ a v poslední době se rozvíjejí i hydrofilní interakční chromatografie (HILIC)⁴. Nicméně v případě HILIC aplikací může být problémem s robustností metody a špatnou reprodukovatelností dat. Pro rychlé zpracování většího množství vzorků s přístupem „Dilute and Shoot“, tedy jednoduché naředění či extrakce a následná aplikace na kolonu, může představovat problém dlouhá ekvilibrace systému. Ačkoli se do popředí zájmu v oblasti kapalinové chromatografie stále častěji dostávají separační aplikace realizované za vysokých tlaků využívajících částice stacionární fáze menší než 2 μm , v případě metabolických diagnostických metod zatím stále přetrvávají spíše metody využívající standardní HPLC systém s tlakovým rozmezím do 400 bar a kolonami s částicemi 3-5 μm . Důvodem může být vyšší robustnost standardních systémů pro aplikace realizované na komplexních biologických vzorcích, které mohou znečišťovat systém, či komplikovaný přechod na jiné kolony v případě složitých separací.

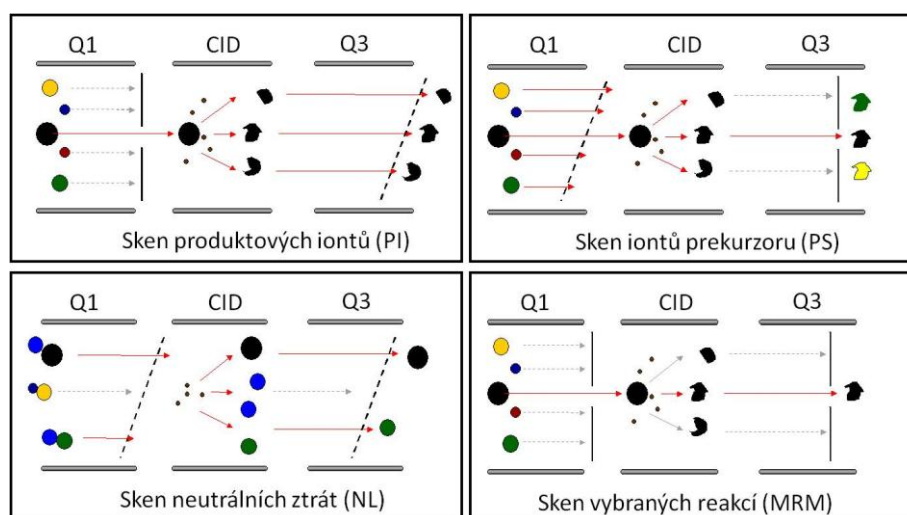
Rozšíření tandemové hmotnostní spektrometrie vneslo do oblasti diagnostiky DMP nový rozměr. Speciálně v oblasti cílené metabolomiky, která se orientuje na kvantifikaci předem vytipovaných metabolitů definované struktury. Díky této technice je možné selektivně kvantifikovat analyty i ve složitých biologických maticích jakými jsou krev nebo moč, a to bez složitých úprav vzorku⁵. Vzhledem k chemickému charakteru metabolitů je nejčastěji používanou ionizační technikou ionizace elektrosprejem (ESI), která je vhodná pro semi-polární a polární analyty (Obr.4.1). Jedná se o měkkou ionizační techniku tvořící ionty $[M+H]^+$, $[M-H]^-$, případně různé adukty. V případě méně polárních látek jakými jsou např. lipidy nebo steroidní hormony se využívá technik chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI) nebo fotoionizace za atmosférického tlaku (APPI)⁶.



Obr. 4.1 Princip ionizace elektrosprejem - konstrukce IonSpray™(AB Sciex).

Označení tandemová hmotnostní spektrometrie je odvozeno od skutečnosti, že přístroj je schopen pracovat v modu vícenásobných MS experimentů, ať už realizovaných v čase, například pomocí iontové pasti (IT), nebo v prostoru, velmi často za využití trojitého kvadrupólu (QqQ). Z pohledu kvantifikace, představuje QqQ velmi výhodné uspořádání. Jedná se o systém dvou analytických kvadrupólů, mezi nimiž je umístěn třetí kvadrupól sloužící jako kolizní cela pro fragmentaci iontů. Výhodou QqQ je snadné použití, vysoká selektivita a citlivost (pro MS/MS experimenty) a široký lineární dynamický rozsah. Díky selektivní separaci iontů je možno používat QqQ také bez kapalinové chromatografie a pracovat v uspořádání přímého nástřiku vzorku (FIA-MS/MS). Vzorek je v takovém případě přiváděn přímo do iontového zdroje a selekce

analytů probíhá na analytických kvadrupólech. Tohoto uspořádání je velmi často využíváno pro rychlé screeningové analýzy. V klinické biochemii je na tomto systému postaven celosvětově prováděný NS dědičných metabolických poruch, monitorující koncentrace aminokyselin a acylkarnitinů v suché krevní kapce⁷. Trojitý kvadrupól může pracovat v několika modech. V závislosti na zvoleném modu je možno použít analytické kvadrupóly v režimu skenu či selektivního filtru a tyto přístupy různě kombinovat (obr.4.2).



Obr. 4.2 Typy skenů používaných ve spojení s trojitým kvadrupólem.

Nejčastěji využívaným modem je monitorování vybraných reakcí (MRM), při kterém jsou oba kvadrupóly použity jako selektivní hmotnostní filtr pro izolaci prekurzoru (Q1) a specifického fragmentu (Q3). Častým přístupem je také kombinace několika skenovacích módů během jedné analýzy. V případě NS je například využíváno kombinace skenu neutrální ztráty (NL), skenu prekurzoru (PS) a MRM skenu. Některé aminokyseliny jsou díky specifické neutrální ztrátě 102 m/z monitorovány pomocí NL, u acylkarnitinů se využívá pro PS specifický fragment 85 m/z a ostatní analyty jsou monitorovány v režimu MRM⁸.

Pro účely diagnostiky DMP je nezbytná kvantifikace specifických metabolitů. Prvním předpokladem dobré kvantifikace je správná kalibrace hmotnostního spektrometru, která bývá v případě QqQ realizována přibližně jednou měsíčně s ohledem na skutečnost, že Q je robustní analyzátor nepracující ve vysokém rozlišení s přesnou hmotou. Pro kvantifikaci v hmotnostní spektrometrii je nezbytné použít vnitřní standard pro potlačení vlivu matrice. V klinických aplikacích je tento postup

nezbytný z důvodu komplexní biologické matrice, která může výrazně ovlivnit signál analytu. Ideálním přístupem je použití stabilního izotopicky značeného standardu (^2H , ^{13}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{34}S nebo ^{37}Cl), který je strukturně velmi podobný a dá se předpokládat stejný fragmentační mechanismus. Při použití těchto standardů je však nezbytné, zvláště u stopových analýz, brát v úvahu jejich čistotu a dostatečný hmotnostní odstup od analytu, aby nedocházelo k interferencím (zvláště u standardů značených deuteriem)^{9,10}. Stejně jako u jiných analytických metod je dobré používat pro kvantifikaci adekvátní kalibraci, kde je kvantitativní výsledek získán z poměru plochy píku analytu a jeho izotopicky značeného standardu, který je konvertován na koncentraci vztažením na příslušnou kalibraci v dané sérii.

4.1. Literatura

1. Zhang Z, Xie J, Zhang F, Linhardt RJ. Thin-layer chromatography for the analysis of glycosaminoglycan oligosaccharides. *Analytical Biochemistry* 2007;371:118-120.
2. Tian H, Bai J, An Z, Chen Y, Zhang R, He J, Bi X et al. Plasma metabolome analysis by integrated ionization rapid-resolution liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2013;30:2071-80.
3. Nakamura A, Tanaka S, Watanabe T. Normal-phase HPLC separation of possible biosynthetic intermediates of pheophytin a and chlorophyll a. *Anal Sci* 2001;17:509-13.
4. Cubbon S, Bradbury T, Wilson J, Thomas-Oates J. Hydrophilic interaction chromatography for mass spectrometric metabolomic studies of urine. *Anal Chem* 2007;79:8911-8.
5. Li W, Tse FL. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomed Chromatogr* 2010;24:49-65.
6. Rauh M, Gröschl M, Rascher W, Dörr HG. Automated, fast and sensitive quantification of 17 alpha-hydroxy-progesterone, androstenedione and testosterone by tandem mass spectrometry with on-line extraction. *Steroids* 2006;71:450-8.
7. Millington DS, Kodo N, Norwood DL, Roe CR. Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. *J Inherit Metab Dis* 1990;13:321-4.
8. Zytovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D, Larson CA, Shih VE, Johnson DM et al. Tandem Mass Spectrometric Analysis for Amino, Organic, and Fatty Acid Disorders in Newborn Dried Blood Spots: A Two-Year Summary from the New England Newborn Screening Program. *Clin Chem* 2001;47:1945-55.

9. Urry FM, Kushnir MM, Nelson G, McDowell M, Jennison TA. Improving ion mass ratio performance at low concentrations in methamphetamine GC-MS assay through internal standard selection. *J Anal Tox* 1996;20:592-5.
10. Vogeser M, Seger Ch. Pitfalls Associated with the Use of Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory. *Clin Chem* 2010;56:81234–44.

5. Výsledky a diskuse

5.1. Laboratorní diagnostika dědičné xanthinurie pomocí HPLC

Cílem této části disertační práce bylo vyvinout komplexní přístup k laboratorní diagnostice dědičné xanthinurie založený na metodách kapalinové chromatografie. Prokázat defekt na úrovni metabolitů v různých biologických matricích, rozlišit typ poruchy a prokázat deficit enzymu. Tyto techniky byly aplikovány pro vyšetření dvou pacientů suspektních pro xanthinurii. Výsledky této části jsou sumarizací a rozšířením dat prezentovaných v publikaci v příloze I.

5.1.1. Stanovení purinových metabolitů

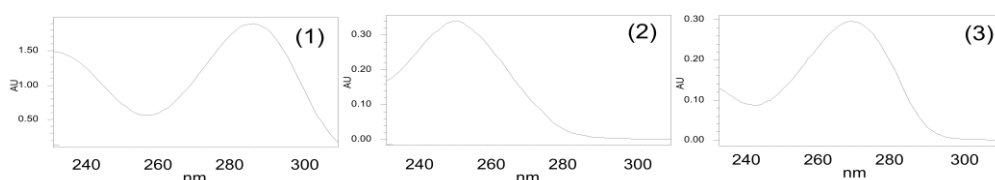
Prvním krokem v laboratorní diagnostice xanthinurie byla kvantifikace klíčových biomarkerů xantinu a hypoxanthinu v moči a plazmě. Stanovení bylo provedeno metodou HPLC s UV detekcí pomocí diodového pole na systému firmy Waters - Alliance 2695 s detektorem 2998.

Příprava vzorku plazmy spočívala v deproteinaci objemu 50 μ l kyselinou chloristou s následnou neutralizací pomocí KHCO_3 . Výsledná koncentrace HPX a XAN byla vyjádřena v absolutní hodnotě v jednotkách $\mu\text{mol/l}$. V případě různě koncentrovaných močí (bráno podle koncentrace kreatininu) byly vzorky ředěny vodou na koncentraci 1 mmol/l kreatininu ve vzorku moči. Výsledná hodnota analytů byla pro klinické účely vyjádřena jako vylučování v $\text{mmol/molKreatininu}$.

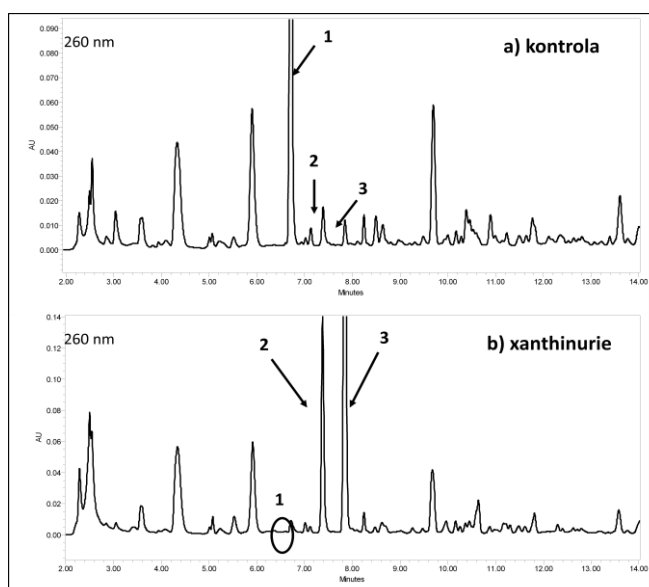
Objem nástřiku byl vzhledem k parametrům kolony optimalizován na 20 μ l. Separace byla realizována na chromatografické koloně Prontosil 120-3-C18 AQ (200 \times 4 mm, 5 μm , Bischoff) za použití gradientové eluce vodného roztoku octanu amonného a acetonitrilu. Hodnota pH mobilní fáze byla upravena pomocí přídavku kyseliny octové na 4,8. Pro identifikaci analytů byla použita informace o jejich retenčním čase a zároveň byly s knihovnou standardů porovnány profily UV spekter získaných v rozmezí 235 – 305 nm (Obr.5.1). Kvantifikace byla provedena pomocí kalibrační křivky v rozsahu koncentrací od 1 do 200 $\mu\text{mol/l}$. V rámci validace metody byl stanoven limit kvantifikace (LOQ) pro oba analyty na 1 $\mu\text{mol/l}$, což bylo dostatečně nízko při aplikaci na koncentrace v biologických vzorcích. Opakovatelnost v sérii nepřekročila 5% CV a

reprodukovatelnost v intervalu 20 dnů byla nižší než 10 % CV (testováno na dvou koncentračních hladinách 10 $\mu\text{mol/l}$ a 100 $\mu\text{mol/l}$). Pro klinické účely bylo nadefinováno referenční rozmezí obou analytů v moči a plazmě. Bylo změřeno vylučování HPX a XAN u 100 vzorků moči zdravých kontrol a na 99 percentilu dat byla nadefinována horní hranice referenčního rozmezí (cut-off) pro HPX 30 mmol/molKrea. a pro XAN 25 mmol/molKrea. V plazmě byl cut-off pro HXP 10 $\mu\text{mol/l}$ a pro XAN 7 $\mu\text{mol/l}$, data byla zpracována stejným statistickým postupem jako v případech moči na 50 vzorcích plazmy získaných od zdravých kontrol.

Tato metoda byla aplikována v klinické praxi pro diagnostiku dvou pacientů se suspektní xanthinurií. U obou pacientů bylo prokázáno signifikantně zvýšené vylučování XAN a HPX v moči a také zvýšené koncentrace těchto analytů v plazmě. Na chromatogramu byla také pozorována absence píku kyseliny močové (Obr.5.2).



Obr. 5.1 Charakteristické profily UV spekter pro kyselinu močovou (1, $\lambda_{\text{max}} = 286,1 \text{ nm}$), hypoxanthin (2, $\lambda_{\text{max}} = 249,4 \text{ nm}$) a xanthin (3, $\lambda_{\text{max}} = 267,1 \text{ nm}$).



Obr. 5.2 Separace hypoxanthinu a xantinu v moči metodou HPLC s UV detekcí ($\lambda = 260 \text{ nm}$) u fyziologické kontroly (a) a u pacienta s xanthinurií (b). Označení píku: (1) kyselina močová, (2) hypoxanthin, (3) xanthin.

Tato separační metoda byla také optimalizována pro širší profilové vyšetření purinových a pyrimidinových metabolitů v moči a plazmě. Za výše popsaných separačních podmínek bylo možno oddělit a kvantifikovat další diagnosticky významné metabolity, které mohou ve zvýšené či snížené koncentraci odhalit dalších 7 dědičných poruch spojených s purinovým a pyrimidinovým metabolismem (Tab. 5.1).

Tab. 5.1

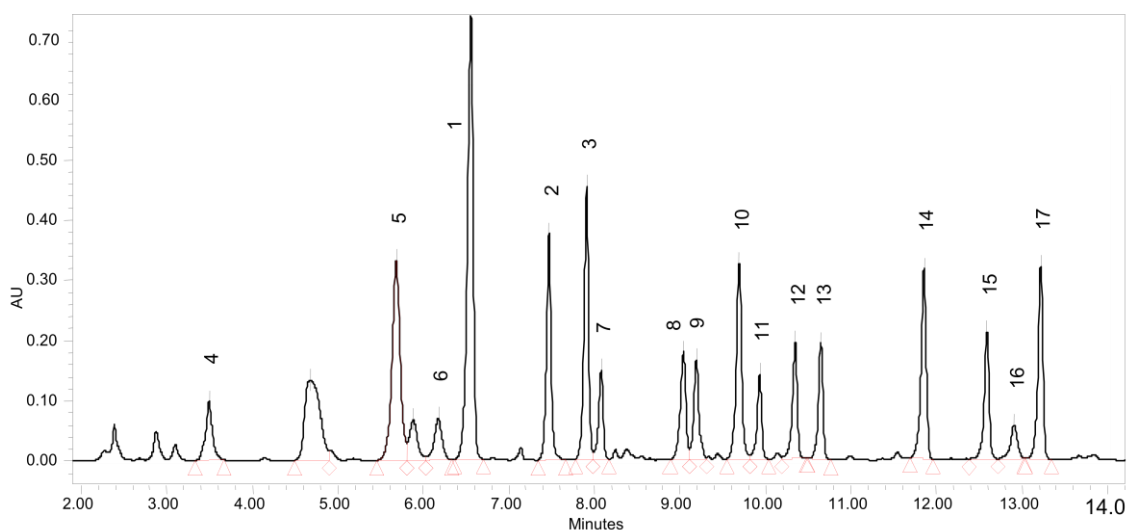
Enzymové defekty spojené s metabolismem purinových a pyrimidinových derivátů s diagnosticky významnými metabolity.

Enzymový defekt	Metabolismus	Diagnostický marker
deficit XDH	Puriny	↑ xanthin, ↑ hypoxanthin, ↓ kyselina močová
deficit HPRT	Puriny	↑ xanthin, ↑ hypoxanthin, ↑ kyselina močová
deficit APRT	Puriny	↑ 2,8-dihydroxyadenin, ↑ adenin
deficit ADA	Puriny	↑ adenosin, ↑ deoxyadenoson, ↓ kyselina močová
deficit PNP	Puriny	↑ inosin, ↑ deoxyinosin, ↑ guanosin, ↑ deoxyguanosin
deficit UMPS	Pyrimidiny	↑ kyselina orotová
deficit TP	Pyrimidiny	↑ uracil, ↑ thymin, ↑ deoxyuridin, ↑ tymidin
deficit DPD	Pyrimidiny	↑ uracil, thymin

HPRT-hypoxanthinfosforibosyltransferasa; APRT-adeninfosforibosyltransferasa; ADA-adenosindeaminasa; PNP-purinnukleosidfosforylasa; UMPS-uridinmonofosfáttransferasa; TP-thymidinfosforylasa; DPD- dihydropyrimidindehydrogenasa

Klíčovými parametry v separaci byla hodnota pH mobilní fáze a optimalizace gradientu. Již při odchýlení o dva desetinné stupně pH byl pozorován problém s dělením píků či dokonce záměna elučního pořadí. Pro některé analýzy je vhodné zvolit pH tak, aby došlo k separaci analytů od interferujících látek. Zejména moč může

obsahovat mnoho endogenních či exogenních interferentů aktivních v UV oblasti (např. deriváty kofeinu). Na základě retenčního času a charakteristického profilu UV spektra bylo možné píky identifikovat a při kvantifikaci odečítat jejich plochy v absorpčních maximech (λ_{max}) (Obr.5.3).



Obr. 5.3 Separace směsi standardů purinových a pyrimidinových analytů v moči na koloně Prontosil 120-3-C18 AQ 200×4 mm, 5 μ m. Složení mobilní fáze: (A) 40 mM octan amonný (pH 4,8); (B) Acetonitril; lineární gradient 0-30% (B) v 15 minutách; průtok 0,7 ml/min; $\lambda = 260$ nm; označení píky: (1) kyselina močová, (2) hypoxanthin, (3) xanthin, (4) kyselina orotová, $\lambda_{max} = 277,5$ nm, (5) uracil, $\lambda_{max} = 258,5$ nm, (6) pseudouridin, $\lambda_{max} = 263,2$ nm, (7) uridin, $\lambda_{max} = 262,1$ nm, (8) thymin, $\lambda_{max} = 264,4$ nm, (9) deoxyuridin, $\lambda_{max} = 262,1$ nm, (10) inosin, $\lambda_{max} = 249,0$ nm, (11) guanosin, $\lambda_{max} = 252,6$ nm, (12) deoxyinosin, $\lambda_{max} = 249,0$ nm, (13) deoxyguanosin, $\lambda_{max} = 252,6$ nm, (14) thymidin, $\lambda_{max} = 266,8$ nm, (15) adenosin, $\lambda_{max} = 259,7$ nm, (16) hipurát, $\lambda_{max} = 249,1$ nm, (17) deoxyadenosin, $\lambda_{max} = 259,7$ nm.

Klinická využitelnost této metody byla testována na reálných vzorcích močí pacientů s výše uvedenými defekty. Koncentrace klíčových metabolitů v moči byly v případě prokázané diagnózy signifikantně mimo referenční rozmezí zdravých kontrol (Tab.5.2).

Tab. 5.2

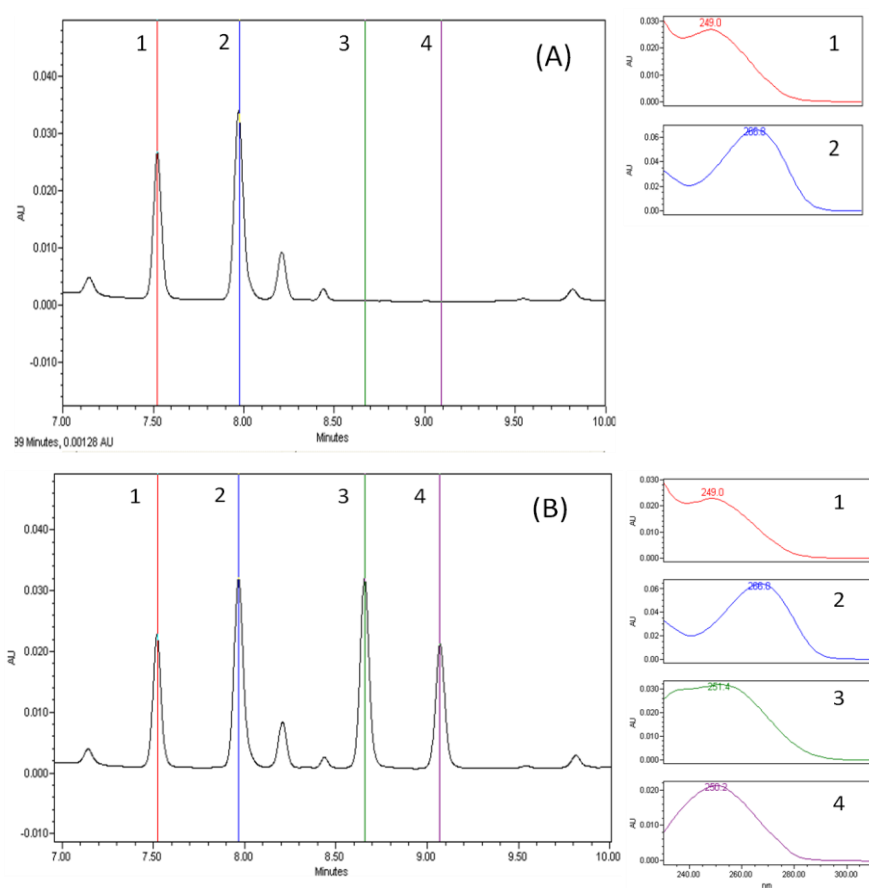
Rozmezí vylučování purinových a pyrimidinových metabolitů v moči u kontrolních vzorků a pozitivních vzorků moči u pacientů s defekty purinového a pyrimidinového metabolismu prezentovaných v Tab.5.1.

Analyt	Referenční mez (mmol/molKrea)	Pacienti (mmol/molKrea)
xanthin	< 25	60-500
hypoxanthin	< 30	90-450
kyselina orotová	< 5	50-5000
uracil	< 25	50-150
thymidin	< 5	30-230
deoxyuridin	< 2	25-100
inosin	n.d.	250-800
guanosin	n.d.	50-700
deoxyinosin	n.d.	280-630
deoxyguanosin	n.d.	200-400
thymidin	< 2	30-150
adenosin	n.d.	5-20
deoxyadenosin	n.d.	80-210

n.d. (nedetekováno = koncentrace pod 1 $\mu\text{mol/l}$)

5.1.2. Allopurinolový test

Pro rozlišení typu xanthinurie byl proveden allopurinolový test. Pacientům byl jednorázově podán allopurinol a byla sledována jeho metabolická přeměna na oxypurinol. Vzorek plazmy pro analýzu byl odebrán před a po 1 hodině po podání allopurinolu. Vznikající oxypurinol byl analyzován stejnou metodou a za stejných podmínek jako v bodě 5.1.1. Kvantifikace byla realizována jednobodovou kalibrací na externí standard oxypurinolu o koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$.



Obr. 5.4 HPLC analýza plazmy před podáním (A) a po podání (B) allopurinolu ($\lambda = 250 \text{ nm}$); označení píku: (1) hypoxanthin, (2) xanthin, (3) oxypurinol, $\lambda_{max} = 251,4 \text{ nm}$ (4) allopurinol, $\lambda_{max} = 250,2 \text{ nm}$.

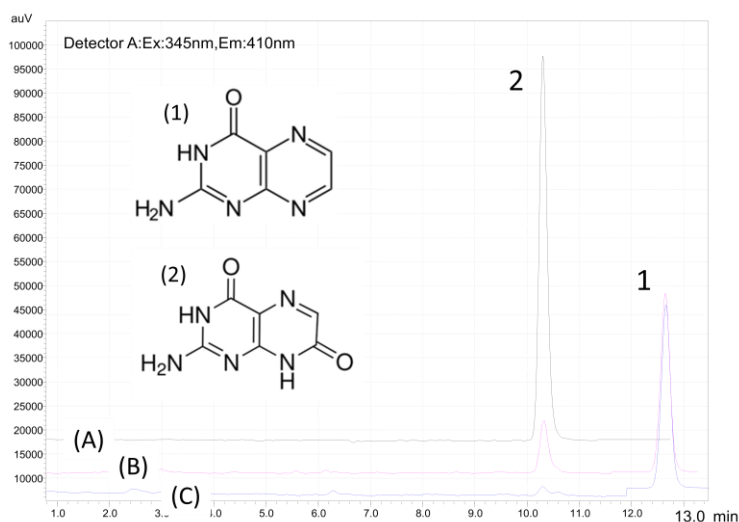
Prokázaná přítomnost oxypurinolu v plazmě v koncentraci 3 respektive 19 $\mu\text{mol/l}$ byla u obou pacientů důkazem správné enzymové funkce aldehydoxidasu a klasifikovala poruchu jako xanthinurii typ I.

5.1.3. Stanovení aktivity xanthindehydrogenasy v plazmě

Vyšetření na enzymové úrovni bylo provedeno z plazmy s využitím skutečnosti, že XDH oxiduje pterin na isoxanthopterin (IXP). Za použití pterinu jako substrátu enzymové reakce byl následně po 240 min. inkubaci ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) kvantifikován IXP a na základě vzniklého množství produktu se dala posoudit případná insuficience enzymu. Analýza $20 \mu\text{l}$ produktu probíhala na kapalinovém chromatografu Shimadzu (UFLC LC-20AD) za použití fluorimetrického detektoru (RF-20Axs) s excitační vlnovou délkou 345 nm a emisní 410 nm . Pro separaci byla použita kolona Prontosil 120-3-C18

AQ (200×4 mm, 3 μm, Bischoff). Výhodou tohoto stanovení využívajícího fluorimetrickou koncovku byla vysoká citlivost, která několikanásobně převyšuje oblast klasických spektrofotometrických aplikací a dovozovala kvantifikaci produktů na úrovni nmol/l.

Výsledky byly porovnány s referenčním rozmezím zdravých kontrol (n=36) a s aktuální kontrolou obsaženou v dané sérii, která byla odebraná a transportovaná za stejných podmínek jako vzorek pacienta. U obou pacientů byl touto metodou prokázán signifikantní pokles aktivity enzymu vyjádřený v pmol/h/ml. Porovnání množství vznikajícího IXP u kontrolního vzorku a pacienta je graficky znázorněn na překryvu chromatogramů na Obr.5.5.



Obr. 5.5 Separace pterinu (1) a isoxanthopterinu (2) v plazmě na koloně Prontosil 120-3-C18 AQ 200×4 mm, 3 μm po 240 min. inkubaci. Mobilní fáze 15mM fosfátový pufr (pH 6,8). Průtok 0,7 ml/min. Označení vzorků: (A) standard IXP o koncentraci 60 nmol/l, (B) fyziologická kontrola (IXP 10 nmol/l), (C) pacient s deficitem XDH.

Limity detekce a kvantifikace pro IXP se pohybovaly mezi 0,1 – 0,3 nmol/l. V případě fyziologických aktivit byla tedy kvantifikace produktu spolehlivě nad LOQ. U vzorků s těžkým enzymovým deficitem a absencí produktu (pod LOQ) byla aktivita hodnocena jako nulová. Opakovatelnost v sérii (n=10) a reprodukovatelnost v rámci intervalu 20 dnů byla provedena na standardu IXP o koncentraci 20 nmol/l, tedy v koncentraci odpovídající množství tohoto metabolitu v reálném vzorku po 240 min. inkubaci. Přesnost v sérii byla pod 5,4 % CV a v rámci mezidenního srovnání nepřesáhla 7,6 % CV. Interferenční efekty nebyly u této metody pozorovány.

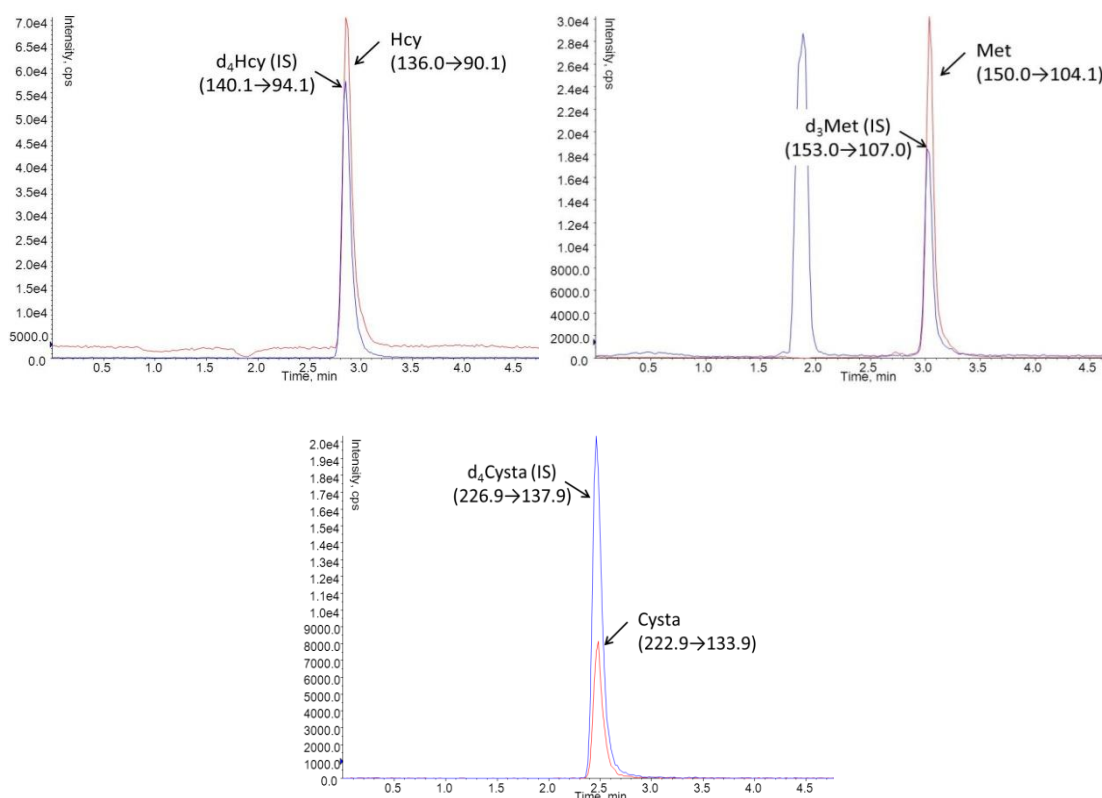
5.2. Stanovení markerů metabolismu homocysteinu metodou LC-MS/MS

Tato část disertační práce se zabývá vývojem LC-MS/MS metody pro kvantifikaci klíčových markerů poruch metabolismu homocysteinu. Cílem bylo na základě koncentračního zastoupení tHcy, Met a Cysta v suché krevní kapce diagnostikovat pacienty s homocystinurií a rozlišit zda je defekt v remethylační nebo transsulfurační části metabolismu homocysteinu. Porovnat výsledky této metody s výsledky metod rutinně užívaných pro měření těchto látek v plazmě a rozhodnout zda lze navrhovanou metodu aplikovat pro monitoring koncentrací tHcy a Met u pacientů s homocystinurií. Výsledky této části jsou sumarizací a rozšířením dat prezentovaných v publikaci v příloze II.

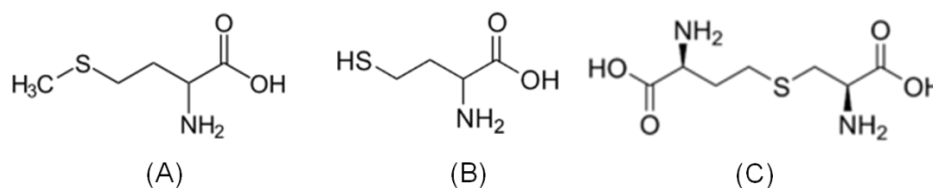
5.2.1. Optimalizace a validace metody

Při přípravě vzorku pro analýzu bylo nezbytné zvolit optimální extrakční postup analytů z DBS a zredukovat různé formy vázaného Hcy. Na základě porovnání různých solventů a redukčních činidel byla jako optimální postup použita 30 minutová extrakce DBS do směsi MeOH/voda/kyselina mravenčí, obsahující interní značené standardy homocystin-d₈, Met-d₃ a Cysta-d₄ s redukcí pomocí 500 mmol/l DTT. Volbu citlivé MS instrumentace pro detekci analytů předurčoval fakt, že objem krve ve vyraženém terčíku (3,2 mm v průměru) ze suché krevní kapky je přibližně 3,4 µl, čili po extrakci a naředění pracujeme s velmi malým množstvím analytu v komplexní matici.

Analýza byla realizována pomocí HPLC (Agilent 1290) ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (AB Sciex, API 4000) s ionizací elektrosprejem v pozitivním modu. Chromatografická separace probíhala v reverzním modu na koloně SunFire C8 3,5 µm, 4,6 x 100 mm (Waters) při laboratorní teplotě za použití izokratické eluce mobilní fáze voda/methanol/kyselina mravenčí 60/40/0,1 (v/v), průtoku 350 µl/min, a objemu nástřiku 5 µl. Extrahované MRM chromatogramy pro jednotlivé analyty a jejich adekvátní vnitřní značené standardy jsou znázorněny na Obr.5.6.



Obr. 5.6 Extrahované MRM chromatogramy Hcy, Met a Cysta a jejich interních značených standardů (vzorek DBS – tHcy 80 μmol /, Met 120 μmol /, a Cysta 10 μmol /).
 Separační podmínky: kolona SunFire C8 3,5 μm , 4,6 x 100 mm (Waters), izokratická eluce s použitím mobilní fáze voda/methanol/kyselina mravenčí 60/40/0,1 (v/v), průtok 350 $\mu\text{l}/\text{min}$, objem nástřiku 5 μl .



Obr. 5.7 Struktury analyzovaných metabolitů; (A) - methionin, (B) – homocystein, (C) - cystathionin

Nastavení trojitého kvadrupólu bylo optimalizováno pro jednotlivé MRM přechody analytů a jejich vnitřních značených standardů pomocí přímé infuze v mobilní fázi. Tato procedura byla velmi důležitá v případě Cysta, který se v krvi za fyziologických podmínek vyskytuje ve velmi nízkých koncentracích, čili bylo nezbytné měřit jeho signál za optimálních podmínek, zajišťujících nejvyšší odstup signálu k šumu. Pro kvantifikaci byla zvolena metoda kalibrační přímky. Kalibrační body byly

připraveny přímo do krve, která byla následně aplikována na filtrační papírek za vzniku DBS. Koncentrace byla počítána z poměru plochy analytu a příslušného vnitřního standardu s použitím kalibrace v dané sérii měření. Limity kvantifikace se u tHCy a Met (0,6 $\mu\text{mol/l}$) pohybovaly hluboko pod endogenní koncentrací těchto analytů v krvi. V případě Cysta byl LOQ blízko spodní hranici referenčního rozmezí endogenních koncentrací s mezidenním koeficientem variability 14,6 %. Opakovatelnost a reprodukovatelnost metody byla pro jednotlivé analyty úspěšně testována na třech klinicky relevantních koncentračních hladinách. Bylo nadefinováno referenční rozmezí koncentrací v DBS pro jednotlivé metabolity v závislosti na věku a u novorozenců na porodní hmotnosti. V případě Cysta se jedná o unikátní data, která nebyla doposud publikována.

5.2.2. Porovnání výsledků

Výsledky koncentrací jednotlivých metabolitů v DBS byly porovnány se vzorky plazmy odebranými ve stejný čas a měřenými třemi různými konvenčními metodami. Komparativní studie zahrnovala několik desítek vzorků s širokou škálou koncentrací od kontrolních vzorků po vzorky získané od pacientů. Porovnání prokázalo velmi dobrou korelaci výsledků z obou biologických matric, nicméně pomocí Bland-Altmanových grafů bylo zjištěno, že průměrné koncentrace tHCy jsou v DBS o 40,6 % níže než v plazmě, Met o 42,2 % a u Cysta o 6,4 %. Tento závěr byl v souladu s výsledky předchozích experimentů porovnávajících koncentrace tHCy a Met v DBS a plazmě a zároveň reflektoval skutečnost, že koncentrace těchto látek v erytrocytech jsou obecně nižší. Nicméně pro vyloučení systémové chyby měření byla LC-MS/MS metoda upravena pro měření vzorků plazmy, kde místo DBS bylo do přípravy vzorku použito 10 μl plazmy. V porovnání plazma vs. plazma (tzn. porovnání metod) nebyl tento negativní bias pozorován a bylo prokázáno, že původní odchylky byly způsobeny rozdílnými matricemi plné krve (DBS) a plazmy.

5.2.3. Aplikace metody v praxi

Nově vyvinutá a zvalidovaná metoda byla aplikována ve třech oblastech klinické praxe: 1) Jako druhostupňový test koncentrace tHCY (tzv. „second-tier testing) pro NS

poruch metabolismu methioninu. V rámci pilotní fáze rozšíření NS v ČR (grant IGA MZ NT/12213–3) bylo testováno 40,892 novorozenců na koncentraci Met. U 0,75 % vzorků z tohoto souboru byly zjištěny odchylky v koncentraci Met (mimo referenční rozmezí 7-35 $\mu\text{mol/l}$) a z téhož DBS vzorku byly u těchto novorozenců kvantifikovány tHcy, Met a Cysta. Metoda odhalila jednoho pacienta s deficitem CBS na základě zvýšené koncentrace tHcy 82,3 $\mu\text{mol/l}$ (ref.rozmezí $< 10 \mu\text{mol/l}$) a Met 75,4 $\mu\text{mol/l}$ a nízké koncentrace Cysta 0,06 $\mu\text{mol/l}$ (ref.rozmezí 0,13-0,82 $\mu\text{mol/l}$). 2) Jako metoda pro rychlou diagnostiku poruch metabolismu Hcy (DBS nebo plazma), která dokáže nejen detekovat zvýšené koncentrace tHcy, ale na základě koncentrací Met a Cysta dokáže rozlišit mezi poruchou v transulfurační (CBS deficit) respektive remethylační části metabolismu homocysteinu. Tato metoda pomohla diagnostikovat 7 pacientů s def. CBS a 2 pacienty s poruchou remethylace. 3) Metoda je ideální pro monitoring koncentrací tHcy a Met u již diagnostikovaných pacientů v rámci sledování dietní kompenzace. Pacient může realizovat odběr DBS doma a následně vzorky zaslat poštou, vyhne se tak návštěvě lékaře a invazivnímu odběru žilní krve. V současné době je touto metodou monitorováno 21 pacientů s poruchou metabolismu homocysteinu.

6. Závěr

Předkládaná disertační práce se zabývá vývojem a optimalizací metod kapalinové chromatografie a tandemové hmotností spektrometrie a jejich využitím v diagnostice dědičných poruch metabolismu. Rozšiřuje možnosti laboratorního diagnostického přístupu v oblasti detekce defektů spojených s metabolismem purinů a homocysteinu.

Koncept práce je založen na dvou publikacích uvedených jako součást práce v přílohách I a II.

Přínos disertační práce v této oblasti lze shrnout do následujících bodů.

1. Byl zaveden komplexní laboratorní postup pro diagnostiku dědičné xanthinurie s možností kvantifikace klíčových biochemických markerů, rozlišení typu a průkazu deficitu enzymu. Pro tyto účely byla zavedena HPLC metoda s detekcí diodového pole pro kvantifikaci hypoxanthinu, xanthinu, allopurinolu a oxypurinolu v moči a plazmě. Tato metoda byla také optimalizována jako profilové vyšetření dalších sedmi poruch purinového a pyrimidinového metabolismu. Dále byla zavedena metoda pro analýzu pterinu a isoxanthopterinu v plazmě v rámci stanovení enzymové aktivity XDH, využívající HPLC separaci a detekci látek fluorimetrickým detektorem.
2. Metody byly úspěšně aplikovány v klinické praxi při diagnostice dvou pacientů s xanthinurií I. typu.
3. Byla vyvinuta LC-MS/MS metoda pro kvantitativní stanovení celkového homocysteinu, methioninu a cystathioninu v suché krevní kapce a plazmě.
4. Metoda může být použita v klinické praxi jako druhostupňový test pro novorozenecký screening vyhledávající poruchy metabolismu methioninu. Dále pro rychlou detekci pacientů s homocystinurií s možností rozlišit na základě koncentračních poměrů jednotlivých analytů zda je porucha v transsulfurační či remethylační části metabolismu homocysteinu. Díky jednoduchému odběru a transportu vzorku suché krevní kapky je tato metoda vhodná pro monitoring

koncentrací tHcy a Met u již diagnostikovaných pacientů při sledování jejich dietní kompenzace.

5. V rámci tvorby jednotlivých referenčních rozmezí byla získána unikátní data koncentrací cystathioninu v suché krevní kapce, která nebyla dosud publikována.

Příloha I

Novel mutations in xanthine dehydrogenase/oxidase cause severe hypouricemia: Biochemical and molecular genetic analysis in two Czech families with xanthinuria type I.

Stibůrková B., Krijt J., Vyleťal P., **Bártl J.**, Gerhatová E., Kořínek M., Šebesta I.

Clin Chim Acta 2012;413:93-9.



Novel mutations in xanthine dehydrogenase/oxidase cause severe hypouricemia: Biochemical and molecular genetic analysis in two Czech families with xanthinuria type I

Blanka Stiburkova^{a,□}, Jakub Krijt^a, Petr Vyletal^{a,b}, Josef Bartl^a, Eva Gerhatova^c, Martin Korinek^d, Ivan Sebesta^{a,e}

^a Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Czech Republic

^b Center for Applied Genomics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague, Czech Republic

^c GENERI BIOTECH, Hradec Kralove, Czech Republic

^d Institute of Social Work, University of Hradec Kralove, Czech Republic

^e Institute of Clinical Biochemistry and Laboratory Diagnostics, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Czech Republic

article info

Article history:

Received 30 June 2011

Received in revised form 29 August 2011

Accepted 30 August 2011

Available online 22 September 2011

Keywords:

Xanthinuria

Xanthine dehydrogenase/oxidase

Hypouricemia

abstract

Background: The article describes the clinical, biochemical, enzymological and molecular genetics findings in two patients from two families with xanthinuria type I.

Methods: Biochemical analysis using high performance liquid chromatography, allopurinol loading test and analysis of xanthine oxidase activity in plasma and of uromodulin excretion in urine were performed. Sequencing analysis of the xanthine dehydrogenase gene and the haplotype and statistical analyses of consanguinity were performed.

Results: Probands showed extremely low concentrations of uric acid, on seven occasions under the limit of detection. The concentration of uric acid in 38-year-old female was 15 μmol/L in serum and 0.04 mmol/L in urine. Excretion of xanthine in urine was 170 mmol/mol creatinine. The concentration of uric acid in 25-year-old male was 0.03 mmol/L in urine. Excretion of xanthine in urine was 141 mmol/mol creatinine. The allopurinol loading test confirmed xanthinuria type I. The xanthine oxidase activities in patients were 0 and 0.4 pmol/h/mL of plasma. We found three nonsense changes: p.P214QfsX4 and unpublished p.R825X and p.R881X.

Conclusions: We found two nonconsanguineous compound heterozygotes with xanthinuria type I caused by three nonsense changes. The methods used did not confirm consanguinity in the probands, thus there might be an unconfirmed biological relationship or mutational hotspot.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Xanthinuria is a rare autosomal recessive inherited metabolic disorder classified into three forms. Type I and type II are collectively coined as classical xanthinuria. Type I (OMIM 278300) is caused by xanthine dehydrogenase/oxidase deficiency, type II (OMIM 603592) results from a combined deficiency of xanthine dehydrogenase and

aldehyde oxidase. A third type, clinically distinct, molybdenum cofactor deficiency (OMIM 252150) is characterized by the lack of sulfite oxidase activity as well as xanthine dehydrogenase and aldehyde oxidase activities.

So far, about 150 patients with classical xanthinuria have been described worldwide. The low concentration of uric acid in serum and high excretion of xanthine in urine can be used as preliminary biochemical diagnostic markers of this disease. Additional methods for diagnosis confirmation and/or identification of the type of xanthinuria include the allopurinol loading test, molecular analysis and the xanthine oxidase assay in plasma. Xanthinuria has large clinical variability and only about half of all patients have urolithiasis [1]. The patients may develop calculi in the urinary tract, acute renal failure (ARF) and myopathy due to deposits of xanthine.

Human xanthine dehydrogenase/oxidase (XDH/XO, EC 1.17.1.4/1.17.3.2) is a NAD-dependent molybdenum-containing hydroxylase that catalyzes the two terminal steps of the purine degradation pathway, i.e. the oxidation of hypoxanthine to xanthine and xanthine to

Abbreviations: ARF, acute renal failure; XDH/XO, xanthine dehydrogenase/oxidase; FAD, flavin adenine dinucleotide cofactor; UMOD, uromodulin; HPLC, high performance liquid chromatography; SDS-PAGE, sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis; THP, Tamm–Horsfall protein; PCR, polymerase chain reaction; STR, short tandem repeats; DXS, X chromosome polymorphic loci; HVR, hyper-variable region; KO, knock-out; RHUC, renal hypouricemia.

□ Corresponding author at: Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Ke Karlovu 2, 128 53 Prague 2, Czech Republic. Tel.: +420 224 918 283; fax: +420 224 967 119.

E-mail address: bstib@lf1.cuni.cz (B. Stiburkova).

0009-8981/\$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.cca.2011.08.038

uric acid. XDH/XO activity in humans is abundantly expressed only in the liver and small intestine. Although there is a certain amount of leakage of the enzyme into the circulation, the determination of XO activity in xanthinuria patients is not routinely performed and the diagnosis is established by clinical, metabolic and genetic investigations.

The human XDH gene is located on chromosome 2p23.1 [2]. The XDH gene comprises 36 exons encoding a protein composed of 1333 amino acids [3]. The mature enzyme is a homodimer with a subunit molecular mass of about 150 kDa. Each of the monomers acts independently during the reaction. Each subunit contains four redox active centers: two non-identical 2Fe–2S, one for flavin adenine dinucleotide (FAD) cofactor and one for molybdopterin cofactor [4, 5]. Currently 18 mutations in the XDH coding region (16 missense/nonsense, one small deletion and one small insertion) have been described [6], seven mutations are disease causing: p.R149C [7], p.R228X [8], p.K722X [9], p.T910K [10], p.T910M [11], c.2567del1 [8] and c.1664dup1 [12]. Five XDH variants have been described with low activity (22–69% compared with wild-type): p.P555S, p.R607Q, p.T623I, p.N909K, p.R1150P, p.C1318Y and two variants with high activity: p.L703V and p.H1221R [10]. Two variants have been associated with hypertension: p.A932T and p.N1109T [13].

Deterioration of kidney function and histopathological findings has been rarely reported in xanthinuria patients. We therefore decided to examine urinary uromodulin (UMOD) excretion in patients and their family members to reveal eventual primary or secondary involvement of Henle's loop and early distal convoluted tubule. Decreased or aberrant urinary uromodulin (UMOD) excretion and/or expression has been observed in a number of kidney related disease conditions [14].

In this article we present clinical, biochemical and molecular genetic evidence that a previously reported p.P214QfsX4 and novel p.R825X and p.R881X sequence variants in XDH/XO gene are causing xanthinuria type I in two Czech families.

2. Methods

2.1. Subjects

All patients received information about the study, agreed and signed an informed consent. All tests were performed in accordance with the standards of the institutional ethics committee, which approved the projects (MSM 0021620806, MZOVFN2005).

2.1.1. Proband 1

A 40-year-old female (nurse by occupation) was born to unrelated parents after an uncomplicated pregnancy. Her father had renal colic in his adolescence and is now suffering from coronary heart disease. No other family members had any obvious history of urolithiasis or exercise-induced acute renal failure. At the age of 25, hypercholesterolemia was found in the proband. Her cholesterol has been followed by a lipid clinic but remained above normal limits. Since the age of 27, she has suffered from repeated urinary tract infections. Kidney cysts were found as well. At the age of 30, she was found (coincidentally with a routine laboratory investigation) to have undetectable levels of uric acid in body fluids. At the same time, she was also diagnosed with hypertension. She was consequently referred to our Institute, where a detailed investigation of purine metabolism was performed.

2.1.2. Proband 2

A 25-year-old male was born to unrelated parents after an uncomplicated pregnancy. His paternal great-grandmother suffered from urolithiasis. No other family members had any obvious history of urolithiasis or exercise-induced acute renal failure. He was examined in the outpatient department, complaining of mild back pain. The

personal history obtained from his general practitioner indicated that the patient was thought to have kidney stones and was therefore referred to a nephrologist. An ultrasound of the kidney revealed no signs of urolithiasis. Afterwards the patient was referred to our department because of repeatedly undetectable uric acid in serum and urine.

2.2. Biochemical analyses

Creatinine in plasma and urine was measured using the Jaffé reaction adapted for an auto-analyzer (Hitachi Automatic Analyzer 902, Roche) [15]. Uric acid in serum and urine was measured using a specific enzymatic method on the same auto-analyzer [16]. High performance liquid chromatography (HPLC) determination of hypoxanthine, xanthine, allopurinol and oxypurinol in urine and plasma were performed on an Alliance 2695 with a Photodiode Array Detector 2998 (Waters, USA). Before HPLC analyses, the urine was diluted with water to final concentration of creatinine of 1 mmol/L. Plasma aliquots were deproteinized with an equal volume of 2 M perchloric acid. Samples were centrifuged for 5 min at 7000 g and supernatants were collected and neutralized with 2.5 M KHCO₃. After a subsequent centrifugation (7000 g, 5 min), potassium perchlorate precipitate was removed and the supernatants were injected into the column. 20 µl aliquots of diluted urine or plasma extracts were injected onto the HPLC column. The determination was performed using a reversed-phase Prontosil 120-3-C18 AQ (200 × 4 mm id) 3 µm HPLC column (Bischoff), eluted by a linear 15 min gradient from 0 to 30% of acetonitrile in 40 mM ammonium acetate buffer (pH 5), flow rate 0.7 ml/min and detected using UV absorbance scanned over the range of 230–305 nm [17].

2.3. Allopurinol loading test

The allopurinol loading test [18] was performed in order to distinguish the type of xanthinuria (I or II). First, sample of plasma was obtained before the administration of allopurinol. Then 300 mg of allopurinol was administered orally in one dose. After one hour, a second plasma sample was taken and the plasma allopurinol and oxypurinol levels were determined using HPLC. Patients with xanthinuria type I are able to metabolize allopurinol to oxypurinol using aldehyde oxidase, whereas xanthinuria type II patients with a combined deficiency of aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase are not and therefore oxypurinol is not detected in their plasma.

2.4. Xanthine oxidase assay

The xanthine oxidase activity was determined using a modified method published previously [19]. In brief, 20 µl of plasma (ethylenediaminetetraacetic acid used as the anticoagulant) was mixed with 80 µl of 125 µM pterine in 200 mM Tris–HCl buffer (pH 8.6). The assay mixture was incubated at 37 °C for 240 min, or alternatively was stopped immediately if a blank sample was processed. The enzyme reaction was stopped by the addition of 20 µl of 5% perchloric acid. The resulting mixture was centrifuged and 80 µl of supernatant was neutralized with 2 µl of 2.5 M KHCO₃. 20 µl of neutralized supernatant was injected onto the reversed-phase Prontosil 120-3-C18 AQ (200 × 4 mm id) 3 µm HPLC column (Bischoff) and eluted by 15 mM phosphate buffer (pH 6.8). Fluorescence intensities of the reaction product — isoxanthopterin — were monitored with excitation at 345 nm and emission at 410 nm. The substrate used for enzyme reaction — pterine — was purified from the isoxanthopterin, an impurity present in the standard, using Dowex 50 W cation exchange resin. For activity calculations, the concentration of isoxanthopterin in the blank sample was subtracted from the concentration produced by the enzyme reaction after 4 h of incubation.

2.5. SDS-PAGE (sodium dodecyl sulphate–polyacrylamide gel electrophoresis) and Western blotting of uromodulin

Whole urine was mixed with ultra-pure water and 6× SDS-PAGE loading buffer in 1.5 mL tubes, denatured at 100 °C/5 min and resolved on 4% stacking and 10% separating polyacrylamide gels at 75 V and 150 V, respectively, using a MightySmall II SE260 apparatus (Hoefler Inc.). Gels were prepared from 40% (w/v) acrylamide/bisacrylamide (29:1) solution (Sigma-Aldrich). Resolved proteins were transferred onto a methanol-activated polyvinylidene fluoride membrane in a semi-dry blotting apparatus PHERO-multiblot (Biotec-Fischer) at 0.6 mA/cm² for 70 min. The membrane was blocked in phosphate-buffered saline with 0.05% (v/v) Tween 20 (PBST) and 5% (w/v) bovine serum albumin. UMOD was detected using polyclonal anti-THP rabbit antibody (Biogenesis) diluted 1:10,000 in PBST with 0.1% (w/v) BSA followed by HRP-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Thermo Scientific) diluted 1:10,000 in the same solution. A SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate Kit (Thermo Scientific) was used according to manufacturer's instructions to produce a chemiluminescent signal recorded on CP-BU Medical X-ray blue film (Agfa), which was subsequently developed using a Fomadent solution set (Foma Bohemia).

2.6. PCR amplification and sequence analysis of XDH coding exons

The genomic DNA for PCR analysis was isolated from blood samples using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen). All exons were amplified using PCR and sequenced directly. The sequencing analysis covered the promoter region and 36 exons and intron–exon boundaries. The PCR primers for the amplification of XDH region are shown in Table 1. 50 ng of genomic DNA was amplified in 50 µl

reactions containing 2.5 U Taq-Purple DNA polymerase, 200 µM dNTPs and 0.15 µM primers. Amplification products were gel purified (1% agarose with 1× TAE buffer) using Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA). DNA sequencing was performed on an automated ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). The purified PCR product of exon 8 was cloned using a TOPO TA Cloning Kit for Sequencing (Invitrogen) and the resulting constructs were transformed into TOP10 E. coli cells (Invitrogen). Positive colonies were selected by PCR. Subsequently the plasmid DNA was isolated using a Purelink Quick Plasmid Mini-prep Kit (Invitrogen) and 10 positive clones were sequenced.

2.7. Haplotype analysis

16 autosomal short tandem repeat (STR) polymorphisms (CSF1PO, FGA, THO, TPOX, vWA, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S1338, D19S433, and SE33), including amelogenin locus, were scored using an AmpFISTR® Identifier® PCR Amplification Kit (Applied Biosystems) and 17 Y-STR polymorphisms (DYS456, DYS389I, DYS390, DYS389II, DYS458, DYS19, DYS385a/b, DYS393, DYS391, DYS439, DYS391, DYS439, DYS635, DYS392, Y GATA H4, DYS437, DYS438, and DYS448) were scored using a AmpFISTR® Yfiler® PCR Amplification Kit. The samples were analyzed using an automated ABI PISM® 3100-Avant Genetic Analyzer and genotypes were analyzed using GeneMapper® Software, version 3.5 (Applied Biosystems, USA).

Primer sequences for X chromosome polymorphic loci (DXS; HPR1B, DXS10011, DXS101, DXS6789, DXS7132, DXS8377, DXS9895, DXS7133, DXS6807, DXS8378, DXS7424, DXS6800, DXS9898, and

Table 1
Primer sequences (5'–3') and PCR conditions used for amplification of promoter and coding regions of the XDH gene. Primers have overhangs added — forward primers T7 sequence 5'-AAT ACG ACT CAC TAT AG-3', reverse primers RP sequence 5'-GAA ACA GCT ATG ACC ATG-3'.

Exon	Size of PCR product, bp	Primer sequences (forward)	Primer sequences (reverse)	Annealing temperature, °C
1	372	ATTTGCTGTGTGTGTTGTTG	AAGTAAGAGGGGACAGGAAAGA	66
2	320	TGAGATTAGAGGGGCGAGGT	CTCTTTCCTCCACCTCAAG	66
3	323	GTGTGGGAATGAATGGCTCT	CATAAAAACAGGGGCTCACA	60
4	279	AGCCTCACAAGTCTCCAG	AGTCTGCAACTTTGGCATGAG	60
5	379	GTGATTACTACCCCACTATCT	ATCTTAGTACCACCTTGTG	64
6	231	GTAAGAGAGCACCAACTTAGTT	CTCCCCACAGTGATTCTGAGT	64
7	210	GCTGGAGTGTCTGGATATTA	AGTCTCAGATTACCCCAAG	66
8	493	GAAGAGGAACCTACGGTGAGT	CACATAGCAGAGACTCAACTA	62
9	415	TGAACATATTACTTCCCCTTGC	GTCAGTGGGGCAGAGGATA	64
10	259	TATCCTGTGTGTAATGGTGAGAA	ATACCTGCCACCCACTTGTGA	64
11	386	TGATTGAGCCTTGCTCCAGTT	CTCCTCCAGGCACTCTAAG	64
12	297	GTGACTACAGTAGGCACAGGA	AATGACCTATCTGGTGAGACTTT	64
13	452	TTGTGCCAGTCATTGTCTCT	TCAGAGAGAAAATCATCAATGT	64
14	443	ACTGATGTGTGATGGTGTAT	TAGTAGCAGCAGTAGCAGTAGT	64
15	403	CTCTAAGTATCCAAGCCAAAT	CTCAGATGTCCAGAGGAGAG	64
16	353	ACTCAAAGCGGTATGAAGTGA	ACTGGGTATTTAGCCACAAGA	62
17	372	TTATTCTTACCCTTGGTGTCT	CTAGCAGGGTGAGAGAAGTCT	66
18	302	CAAGCCAATCAAAAATAAGAAC	ATCAGGAGTTTGGAGCAATGT	62
19	326	GATTGTGAGGGCAGGGACTTC	AATCCCTACTGTCTGCTCAA	62
20	285	CTCTTTCCTAATCAGAACCTA	GTCAGGAAATGTCCAGAAATC	66
21	315	CAGACCCTTGGCAGAGTATA	CACATCTCCCTTCTCTATT	66
22	459	AACTGCTTGCCTCTGGTTAA	TTCAAAGCAGGGGAAACTAA	66
23	272	GCTGTTTTTATTCTGAGACTTG	GATAGGCAAAAAGTAGGAGTG	66
24	290	TTATTCTCCAGGTGACATA	ACAGTAGCAAGCAGGGACTG	66
25	438	GAAAGGCAGGCAATGGATACA	GCAGGGCACAACCTAAAAGTGA	64
26	342	AACTTTAGGTTGTGCCCTGCC	GTTGGCAAACTCAGCAGTCTC	64
27	306	TTCTCATCTTGTGGGCAACC	CAGTAAGCCCTGTTACCAGTGA	66
28	348	CTGAGGTTTACATCCAAAATG	CTACAGGCACATAAGCAACAG	66
29	473	GACATCCCAGACAATGAGATT	CTTTGAGGGCAGTGATTATGA	66
30	296	ATTGCTTGGAGGTAGCCTTG	CAACTTCTCTCTGCTGTCTGA	66
31	324	GTATGGAAATGGGAGTCACTA	ATTAGGGAAAGTCTGTTGAAG	66
32	339	TAAAGATGTTTGGGTCAAG	GATGTTTGCCTATCTTAATG	66
33	274	ACTCTTGGTTGGCACTGTAG	TGAAGACAACCTTGGACAACAT	66
34	452	TAAGCAATAGAGGGCAGTTT	AAACCATCTCCCTCTCAA	66
35	440	CTTCTGCTGATTTGGTGTG	GTTAGGAGAGAGCCCAACACC	66
36	526	CTTGGAAATGATGTTGGCAGT	GGTTTGGGAATCCTCTTCA	66

DXS6809) were obtained from the Otto-von-Guericke University Magdeburg School of Medicine [20].

Mitochondrial DNA analysis of the hyper-variable regions HVR1, HVR2 and HVR3 was performed using the available FBI database of primer sequences [21]. PCR products were analyzed using an ABI PRISM® 3100-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Final data analysis was completed using a Sequence Scanner, version 1.1 (Applied Biosystems, USA). Each sequence was compared to the revised Cambridge Reference Sequence for human mitochondrial DNA [22].

3. Results

3.1. Biochemical evaluation

3.1.1. Proband 1

Ultrasound of the kidneys revealed bilateral nephrocalcinosis and renal cysts. Biochemical data showed significantly low concentrations of uric acid (15 µmol/L in serum and 0.04 mmol/L in urine, on five occasions under the detection limit) and urinary excretion of xanthine and hypoxanthine was 190 mmol/mol creatinine and 64 mmol/mol creatinine, respectively. The xanthine oxidase activity in plasma was 0.4 pmol/h/mL (reference ranges 3.2–9.2 pmol/h/mL). The concentration of oxypurinol in plasma after administration of allopurinol was 3 µmol/L. Her two sons were also examined and found to have normal biochemical findings and the xanthine oxidase activities within the normal range.

3.1.2. Proband 2

The concentration of uric acid in serum was not detected on two occasions, in the urine it was 0.03 mmol/L. Excretion of xanthine and hypoxanthine in urine was 170 mmol/mol creatinine and 89 mmol/mol creatinine, respectively. Xanthine oxidase activity in plasma was undetectable. The concentration of oxypurinol in plasma after administration of allopurinol was 19 µmol/L. Both of the proband's parents and his brother had normal biochemical findings and the xanthine oxidase activities within the normal range. The results are summarized in Table 2.

3.2. Urinary UMOD excretion

We employed SDS-PAGE and Western blotting methods to examine urinary UMOD excretion. First, we examined proband 1 and detected decreased excretion as well as abnormal UMOD processing, which we previously observed in Fabry disease patients [23]. We therefore obtained a new sample from proband 1 and analyzed it together with samples from proband 2 and members of both families. However, we were not able to demonstrate decreased or otherwise aberrant UMOD excretion in any examined person (data not shown).

3.3. Sequence analysis of XDH gene

DNA sequence variations found in exon regions of the XDH gene of the two probands are shown in Table 3, electrophoregrams in Fig. 1. The reference genomic sequence was defined as NCBI36:2:31410091:31491267:-1 based on the entry ENSG00000158125 [24] and the reference protein sequence was defined as P47989 [25]. A heterozygous deletion was found in proband 1 in exon 8 (p.P214QfsX4). We previously detected this mutation in a 78-year-old Caucasian woman with isolated XDH deficiency presenting as rheumatoid arthritis [26]. The second heterozygous sequence variant, an unpublished nonsense mutation, was found in exon 25 (p.R881X). A heterozygous deletion, p.P214QfsX4, was found in father and brother, the second heterozygous sequence variant, p.R881X, was found in the other son of proband 1.

In proband 2, we detected the same heterozygous deletion in exon 8 as in proband 1. A second heterozygous mutation, an unpublished nonsense mutation, was found in exon 23 (p.R825X). A heterozygous deletion, p.P214QfsX4, was found in father and brother, the second heterozygous sequence variant, p.R825X, was found in the mother.

3.4. Haplotype analysis

We have chosen five methods, presented below, for authentication of a blood relationship among three probands (proband 1, proband 2 and a previously reported patient [26]).

3.4.1. STR autosomal polymorphisms

We have detected only three affined alleles in the probands — allele 12 in polymorphic locus D13S317 with a frequency of 0.26725, allele 13 in polymorphic locus D19S433 with the frequency of 0.24375 and allele 18 in polymorphic vWA locus with a frequency of 0.22225.

3.4.2. Y-STR polymorphisms

Having examined Y-STR polymorphisms through the most recent common ancestor direct calculation in the son of proband 1, we detected that each of scanned individuals belonged to a different paternal line. The proband (see above) together with his brother and father belong to the R1A haplogroup, which represents approximately 40% of the Czech Republic population. One of the proband's 1 sons is a R1B haplogroup carrier (in the Czech Republic approximately 35%), while the second son is in the H haplogroup, which is very rare in the Czech Republic [27].

3.4.3. Mitochondria test

We identified a previously reported patient [26] to be a T haplogroup carrier. In this study, we found that proband 1 is a H haplogroup carrier (the most common haplogroup in Europe with an approximate frequency of 46%). Both have been separated from the super-haplogroup H. At HVR1 loci, we found the same mutation (16304C) in a previously reported Polish patient as well as in proband

Table 2
Values of biochemical markers and xanthine oxidase activity in patients with xanthine oxidase deficiency and their relatives as compared to reference ranges in controls.

ID, born	Uric acid serum, µmol/L	Uric acid urine, mmol/L	Xanthine urine, mmol/molCreat	Hypoxanthine urine, mmol/molCreat	Xanthine oxidase activity plasma, pmol/h/mL	Oxypurinol* plasma, µmol/L
Proband 1, 1970	15	0.04	190	64	0.37	3.0
Son II.1, 1989	346	1.67	8	6	Not performed	Not performed
Son II.2, 1996	175	3.78	21	30	Not performed	Not performed
Proband 2, 1984	not detected	0.03	170	89	0.00	19.1
Father I.1, 1965	268	2.20	18	10	3.35	Not performed
Mother I.2, 1965	182	2.20	14	12	8.38	Not performed
Brother II.2, 1991	439	4.70	8	9	Not performed	Not performed
Reference range	120–340 ^a , 120–416 ^a	0.40–4.70	≤25	≤30	3.2–9.2	—

*One hour after the administration of allopurinol (allopurinol loading test), ^achildren under 15 years and female, ^mmale.

Table 3

The sequence variations in exonic regions and intron–exon boundaries of XDH gene in patients with xanthinuria; variation source dbSNP 132, location source transcript ENST00000379416, chromosome 2: 31,557,187–31,637,581 reverse strand.

ID	Region	Variation ID	Position	Variation	Genotype	Mutation	Protein	
Proband 1	Exon 8	–	2:31610687	delC	C/–	Deletion	p.P214QfsX4	
	Intron 8	rs477626	2:31609448	T→G	GG			
	Exon 10	rs4407290	2:31606670	C→T	TC	Synonym	p.V279V	
	Intron 13	rs10187719	2:31600146	A→G	GG			
	Intron 14	rs2070294	2:31598485	A→G	GG	Synonym	p.I737I	
	Intron 20	rs761926	2:31590785	G→C	CC			
	Exon 21	rs2295475	2:31589847	C→T	TT	Synonym	p.I737I	
	Intron 23	rs2365842	2:31588288	A→T	TT			
	Exon 25	–	2:31573080	C→T	CT	Nonsense	p.R881X	
	Exon 27	rs1884725	2:31571786	T→C	TC			
	Intron 27	rs13415401	2:31571241	C→G	CG	Synonym	p.F1010F	
	Intron 28	rs4952084	2:31570631	T→C	TC			
	Intron 28	rs4952083	2:31570626	G→A	GA	Synonym	p.I737I	
	Intron 29	rs1366813	2:31570376	A→G	AG			
	Intron 30	rs207454	2:31567632	A→C	AC	Synonym	p.F1010F	
	Intron 1	–	2:31628906	A→C	AC			
	Proband 2	Exon 8	–	2:31610687	delC	C/–	Deletion	p.P214QfsX4
		Intron 8	rs477626	2:31609448	T→G	GG		
		Intron 13	rs10187719	2:31600146	A→G	AG	Synonym	p.I737I
		Intron 14	rs2070294	2:31598485	A→G	AG		
Exon 21		rs2295475	2:31589847	C→T	TC	Synonym	p.I737I	
Exon 23		–	2:31588394	C→T	TC			
Intron 23		rs2365842	2:31588288	A→T	AT	Nonsense	p.R825X	
Intron 24		–	2:31586961	G→A	GA			

2, his mother and his brother. Yet, this kind of mutation is not considered rare — instead it is referred to as relatively common [28], thus we cannot utilize it for any statistical blood relationship verification. Likewise, we have found an identical occurrence of mutation 263G at the HVR2 loci. Unfortunately, we have to state the same conclusion for this kind of mutations as in the previous section — the statistical significance is low because of its common occurrence [29].

3.4.4. X-STR polymorphism

In the method using the X-STR polymorphisms examination, only two probands are of interest. We detected that they match in 7 out of 14 polymorphisms. Unfortunately, matching alleles are very common in the Czech population, so we could not delineate the relatedness.

4. Discussion

Here, we report two patients with xanthinuria type I. The disorder was demonstrated by low concentrations of uric acid in serum and high excretion of xanthine in the urine and subsequently by low (proband

1) or undetectable (proband 2) XO enzyme activity in plasma. The diagnosis of xanthinuria type 1 was confirmed by molecular genetic testing.

Due to the leakage of XO from dying liver cells, XO activity can be determined in plasma using sensitive methods. Undetectable XO activities were determined in biopsy specimens of the duodenal mucosa from a few patients with xanthinuria type 1 [18, 7, 30]. Decreased activity (5.7% of normal) was also described [12]. On the other hand, it was reported that the XO activity in the duodenal mucosa of two obligate heterozygous was about 50% of that in healthy subjects [31]. However, the DNA analysis of XDH/XO gene in this family with unusual symptoms (hyperuricemia and gout in heterozygotes) was not performed.

In this study, we showed that the determination of plasma XO activity may be used for the confirmation of enzyme deficiency, although attention should be paid to the underlying liver disease in the patients, which would result in higher liver enzymes activities in plasma due to increased tissue damage. The plasma XO activities in the heterozygote relatives harboring nonsense mutations were within the normal range, showing no utility of the assay to recognize heterozygotes.

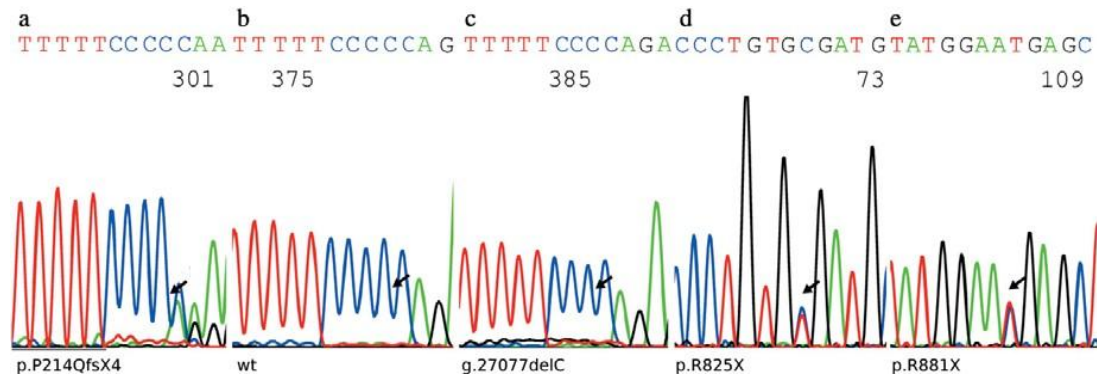


Fig. 1. Electropherograms of partial sequences of XDH showing a) heterozygous mutation p.P214QfsX4 in exon 8 (position 300), b and c) separated alleles of exon 8 (wt position 375, g.27077delC in position 388), d) heterozygous mutation p.R825X in exon 23 (position 69) and e) heterozygous mutation p.R881X in exon 25 (position 106).

Mutation analysis in XDH/XO gene has been performed in only a very few xanthinuria patients. In our patients, a heterozygous deletion p.P214QfsX4 was found. The first affected amino acid, Proline-214, is changed into Glutamine and the new reading frame ends by a stop codon at position 4, p.P214QfsX4. The putative mutant protein is composed of only 228 amino acids and probably comprises only the first small N-terminal domain (residue 3–164 amino acids) containing Fe-S cofactors and the incomplete adjacent FAD domain (192–527 amino acids). This sequence variant was previously detected by the authors in a 75-year-old Caucasian woman with rheumatoid arthritis [26]. Her second heterozygous mutation was p.T910M, also detected previously in a family with xanthinuria type I presenting with hypouricemia, hypouricosuria, high urinary excretion of hypoxanthine and xanthine, and xanthine stones [11]. The second and third heterozygous sequence variants found in our patients were previously unpublished nonsense mutations p.R825X and p.R881X. These variants are nonsense mutations resulting in a premature stop codons and putative mutant proteins with only 825 and 881 amino acids, respectively, probably comprising incomplete molybdopterin domains. However, rheumatoid arthritis was not observed, although proband 2 was examined in the outpatient department for complaints of mild back pain. The relationship between p.P214QfsX4 as a causal mutation and rheumatoid arthritis was not elucidated and the wide clinical heterogeneity of xanthinuria cannot be explained by observed genetic defect.

As xanthinuria is a very rare disease, we presumed a biological relationship among three probands sharing the same mutation p.P214QfsX4. However, the methods used were not able to confirm their consanguinity. Nevertheless, there could be an unconfirmed biological relationship or mutational hotspot.

Symptoms in xanthinuria type I are usually related to the stone formation. However, the clinical and biochemical signs leading to the diagnosis of xanthinuria are frequently not based on the xanthine stones analysis. The finding of profound hypouricemia is often discovered during screening test or during investigation of a presumably unrelated medical problem — the case in our two probands.

Hypouricemia can result from decreased uric acid production, but it is more commonly due to decreased renal tubular urate reabsorption. Differential diagnosis of hypouricemia includes disturbances in transport of uric acid in the proximal tubule as Fanconi syndrome and renal hypouricemia type 1 (RHUC1, OMIM 220150) [32] and type 2 (RHUC2, OMIM 612076) [33, 34]. Other secondary causes of hyperuricosuric hypouricemia are easily excluded during clinical and laboratory examinations. Xanthinuria type I is easily distinguished due to the finding of allopurinol oxidizing activity in the allopurinol loading test. Congenital absences of molybdenum cofactor with combined XDH/XO/sulfite oxidase deficiency is usually associated with severe neurological disorders such as neonatal period intractable seizures, dysmorphic features, mental retardation and coma and elevated concentrations of sulfocysteine in the urine [35].

Similarly low levels of serum uric acid ranging from 1 to 40 $\mu\text{mol/L}$, as observed in patients with xanthinuria, were reported in three families with homozygous loss-of-function mutations in SLC2A9 gene causing renal hypouricemia (RHUC) type 2 [33,34]. RHUC is a heterogeneous inherited disorder with an unknown pathogenesis characterized by impaired tubular uric acid transport, reabsorption insufficiency and/or acceleration of secretion with potentially severe complications, such as acute renal failure and nephrolithiasis. Most patients are clinically asymptomatic [11]. From nine patients with RHUC type 2, three presented with nephrolithiasis and three presented with ARF, three patients were without clinical history [33, 34]. On the other hand, none of the probands with xanthinuria had ARF in their medical history. It suggests that extremely low levels of serum uric acid (close to 0 $\mu\text{mol/L}$) alone probably cannot lead to renal failure in patients with xanthinuria.

The relevance of the study of the XDH/XO is not restricted to xanthinuria only. The role of the reaction product of xanthine dehydrogenase/oxidase, uric acid, in the body is not entirely clear. Serum uric acid levels in healthy humans (about 300 $\mu\text{mol/L}$ or 5 mg/dl) are considerably higher than those of ascorbate, making it one of the major antioxidants. However, the findings in patients with extremely low serum urate levels (without neurological symptoms, see above) suggest that the protective systems involving plasma uric acid [36] are not essential. It has been reported that an increase by one standard deviation in serum uric acid was associated with a 30% reduction in risk of Parkinson's disease [37]. Men in the higher quartile of serum uric acid levels had a 55% lower risk of Parkinson's disease compared with those with the lowest levels of uric acid [38]. Uric acid has shown beneficial effects in animal models of neurological disorders, including multiple sclerosis and spinal cord injury [39, 40]. Recently, there have been reported associations between higher uric acid levels and increased performance in memory-related tasks [41]. However, in a cohort of patients with extremely low serum uric acid levels (RHUC2, XDH deficiency), no neurological clinical history was observed [7, 12, 18, 33, 34]. However, the role of serum uric acid in protection from neurological disorders has not been completely elucidated yet.

Deterioration of renal functions other than nephrolithiasis is not a prominent feature of xanthinuria, hence the evaluation is not usually considered. However, in a recent report involving $Xdh^{-/-}$ mice, renal failure and death within several months was observed [42]. On the contrary, kidney function deterioration and/or histopathological findings and pathophysiological processes observed in these KO mice have never been observed and/or reported in xanthinuria patients.

5. Conclusions

In conclusion, we report novel sequence variants in the human XDH/XO gene responsible for the xanthinuria type I in two Czech patients with extremely low serum uric acid levels. Our detailed investigation of purine metabolism was based on (a) allopurinol loading test, (b) determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine in body fluids, (c) plasma activity assay of xanthine oxidase and (d) DNA analysis of XDH/XO gene. Following results of our detailed laboratory investigations of purine metabolisms confirmed the diagnosis of hereditary xanthinuria type I — (a) low or undetectable levels of uric acid in body fluids and elevated urinary xanthine and hypoxanthine concentrations, (b) decreased plasma activity of xanthine oxidase, (c) positive allopurinol loading test and (d) finding of three novel mutations in the XDH gene.

Hereditary xanthinuria is a rare metabolic disorder. Although the XDH/XO enzyme has long history of investigation, the physiological function in humans is not fully elucidated. Further detailed studies of the XDH/XO gene could hopefully clarify the molecular pathogenesis of xanthinuria and relationship between activity of XDH/XO and some pathological conditions as hypertension, cardiovascular disease and renal failure.

Authors' contributions

This paper reports the results of a multicenter study: clinical evaluation of patients has been performed by IS; biochemical investigations by JK and JB; urinary UMOD excretion by PV; haplotype analysis by EG, MK; contributions to conception and design, sequencing analysis by BS.

Acknowledgments

This study was supported by Research Projects MSM 0021620806 and 1M6837805002 from the Ministry of Education, Youth and

Sports, and by grant MZ0VFN2005 from the Ministry of Health of the Czech Republic.

References

- [1] Bradbury M, Henderson GM, Brocklebank J, Simmonds A. Acute renal failure due to xanthine stones. *Pediatr Nephrol* 1995;9:476–7.
- [2] XDH xanthine dehydrogenase [Homo sapiens] - Gene result. National Center for Biotechnology Information; November 2010. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/7498>. Accessed 2/20/2011.
- [3] Ichida K, Amaya Y, Noda K, et al. Cloning of the cDNA encoding human xanthine dehydrogenase (oxidase): structural analysis of the protein and chromosomal location of the gene. *Gene* 1993;133:279–84.
- [4] Nishino T. The conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase and the role of the enzyme in reperfusion injury. *J Biochem* 1994;116:1–6.
- [5] Amaya Y, Yamazaki K, Sato M, Noda K, Nishino T. Proteolytic conversion of xanthine dehydrogenase from the NAD-dependent type to the O₂-dependent type. Amino acid sequence of rat liver xanthine dehydrogenase and identification of the cleavage sites of the enzyme protein during irreversible conversion by trypsin. *J Biol Chem* 1990;265:14170–5.
- [6] HGMD® Professional 2011.2; October 2010. <https://portal.biobase-international.com/hgmd/pro/all.php>. Accessed 2/20/2011.
- [7] Sakamoto N, Yamamoto T, Moriwaki Y, et al. Identification of a new point mutation in the human xanthine dehydrogenase gene responsible for a case of classical type I xanthinuria. *Hum Genet* 2001;108:279–83.
- [8] Ichida K, Amaya Y, Kamatani N, Nishino T, Hosoya T, Sakai O. Identification of two mutations in human xanthine dehydrogenase gene responsible for classical type I xanthinuria. *J Clin Invest* 1997;99:2391–7.
- [9] Gok F, Ichida K, Topaloglu R. Mutational analysis of the xanthine dehydrogenase gene in a Turkish family with autosomal recessive classical xanthinuria. *Nephrol Dial Transplant* 2003;18:2278–83.
- [10] Kudo M, Moteki T, Sasaki T, et al. Functional characterization of human xanthine oxidase allelic variants. *Pharmacogenet Genomics* 2008;18:243–51.
- [11] Arikyants N, Sarkissian A, Hesse A, Eggermann T, Leumann E, Steinmann B. Xanthinuria type I: a rare cause of urolithiasis. *Pediatr Nephrol* 2007;22:310–4.
- [12] Levartovsky D, Lagziel A, Sperling O, et al. XDH gene mutation is the underlying cause of classical xanthinuria: a second report. *Kidney Int* 2000;57:2215–20.
- [13] Yang J, Kamide K, Kokubo Y, et al. Associations of hypertension and its complications with variations in the xanthine dehydrogenase gene. *Hypertens Res* 2008;31:931–40.
- [14] Vyletal P, Bleyer AJ, Kmoch S. Uromodulin biology and pathophysiology — an update. *Kidney Blood Press Res* 2010;33:456–75.
- [15] Fossati P, Prencipe L, Berti G. Use of 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid/4-aminophenazone chromogenic system in direct enzymic assay of uric acid in serum and urine. *Clin Chem* 1980;26:227–31.
- [16] Bowers LD, Wong ET. Kinetic serum creatinine assays. II. A critical evaluation and review. *Clin Chem* 1980;26:555–61.
- [17] Jurecka A, Zikanova M, Tytki-Szymanska A, et al. Clinical, biochemical and molecular findings in seven Polish patients with adenylosuccinate lyase deficiency. *Mol Genet Metab* 2008;94:435–42.
- [18] Ichida K, Yoshida M, Sakuma R, Hosoya T. Two siblings with classical xanthinuria type I: significance of allopurinol loading test. *Intern Med* 1998;37:77–82.
- [19] Yamamoto T, Moriwaki Y, Takahashi S, et al. Determination of human plasma xanthine oxidase activity by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1996;681:395–400.
- [20] Primer sequences localisation table for X chromosome polymorphic loci. The Forensic CHR Research Group; 2009. http://www.med.uni-magdeburg.de/chrx/linkage_tabelle.htm. Accessed 02/14.
- [21] Guidelines for Mitochondrial DNA (mtDNA) Nucleotide Sequence Interpretation. FBI Federal Bureau of Investigation; April 2003. <http://www.fbi.gov/about-us/lab/forensic-science-communications/fsc/april2003/swgdammitodna.htm>. Accessed 02/14/2009.
- [22] Homo sapiens mitochondrion, complete genome (Sequence for human mitochondrial DNA). National Center for Biotechnology Information; June 2008. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_012920. Accessed 02/14/2009.
- [23] Vyletal P, Hulkova H, Zivna M, et al. Abnormal expression and processing of uromodulin in Fabry disease reflects tubular cell storage alteration and is reversible by enzyme replacement therapy. *J Inher Metab Dis* 2008;31:508–17.
- [24] Ensembl genome browser 63: Homo sapiens - Gene summary - Gene XDH; February 2011. http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000158125;r=2:31557187-31637581;t=ENST00000379416. Accessed 2/20/2011.
- [25] Xanthine dehydrogenase/oxidase. Protein Knowledgebase. Available from. <http://www.uniprot.org/uniprot/P47989>. February 2011. Accessed 2/26/2011.
- [26] Jurecka A, Stiburkova B, Krijt J, Gradowska W, Tytki-Szymanska A. Xanthine dehydrogenase deficiency with novel sequence variations presenting as rheumatoid arthritis in a 78-year-old patient. *J Inher Metab Dis* 2010. doi:10.1007/s10545-009-9011-z.
- [27] Luca F, Di Giacomo F, Benincasa T, et al. Y-chromosomal variation in the Czech Republic. *Am J Phys Anthropol* 2007;132:132–9.
- [28] Coble MD, Just RS, O'Callaghan JE, et al. Single nucleotide polymorphisms over the entire mtDNA genome that increase the power of forensic testing in Caucasians. *Int J Legal Med* 2004;118:137–46.
- [29] Richards MB, Macaulay VA, Bandelt HJ, Sykes BC. Phylogeography of mitochondrial DNA in Western Europe. *Ann Hum Genet* 1998;62:241–60.
- [30] Yamamoto T, Moriwaki Y, Shibutani Y, et al. Human xanthine dehydrogenase cDNA sequence and protein in an atypical case of type I xanthinuria in comparison with normal subjects. *Clin Chim Acta* 2001;304:153–8.
- [31] Kawachi M, Kono N, Mineo I, Yamada Y, Tarui S. Decreased xanthine oxidase activities and increased urinary oxypurines in heterozygotes for hereditary xanthinuria. *Clin Chim Acta* 1990;188:137–46.
- [32] Enomoto A, Kimura H, Chairoungdua A, et al. Molecular identification of a renal urate anion exchanger that regulates blood urate levels. *Nature* 2002;417:447–52.
- [33] Dinour D, Gray NK, Campbell S, et al. Homozygous SLC2A9 mutations cause severe renal hypouricemia. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:64–72.
- [34] Stiburkova B, Ichida K, Sebesta I. Novel homozygous insertion in SLC2A9 gene caused renal hypouricemia. *Mol Genet Metab* 2011;102:430–5.
- [35] Johnson JL, Coyne KE, Rajagopalan KV, et al. Molybdopterins synthase mutations in a mild case of molybdenum cofactor deficiency. *Am J Med Genet* 2001;104:169–73.
- [36] Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:6858–62.
- [37] de Lau LM, Koudstaal PJ, Hofman A, Breteler MM. Serum uric acid levels and the risk of Parkinson disease. *Ann Neurol* 2005;58:797–800.
- [38] Weisskopf MG, O'Reilly E, Chen H, Schwarzschild MA, Ascherio A. Plasma urate and risk of Parkinson's disease. *Am J Epidemiol* 2007;166:561–7.
- [39] Hooper DC, Bagasra O, Marini JC, et al. Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by targeting nitric oxide and peroxynitrite: implications for the treatment of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:2528–33.
- [40] Scott GS, Cuzzocrea S, Genovese T, Koprowski H, Hooper DC. Uric acid protects against secondary damage after spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:3483–8.
- [41] Houlihan LM, Wyatt ND, Harris SE, et al. Variation in the uric acid transporter gene (SLC2A9) and memory performance. *Hum Mol Genet* 2010;19:2321–30.
- [42] Ohtsubo T, Matsumura K, Sakagami K, et al. Xanthine oxidoreductase depletion induces renal interstitial fibrosis through aberrant lipid and purine accumulation in renal tubules. *Hypertension* 2009;54:868–76.

Příloha II

Simultaneous determination of cystathionine, total homocysteine, and methionine in dried blood spots by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its utility for the management of patients with homocystinuria.

Bártl J., Chrastina P., Krijt J., Hodík J., Pešková K., Kožich V.

Clin Chim Acta 2014 (v recenzním řízení).

Simultaneous determination of cystathionine, total homocysteine, and methionine in dried blood spots by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its utility for the management of patients with homocystinuria.

Josef Bártl, Petr Chrastina, Jakub Krijt, Jakub Hodík, Karolína Pešková and Viktor Kožich*

Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Czech Republic

*Correspondence to: Dr. Viktor Kožich, Institute of Inherited Metabolic Disorders, First Faculty of Medicine, Charles University in Prague and General University Hospital in Prague, Ke Karlovu 2, 128 53 Prague 2, Czech Republic.

Email: Viktor.Kozich@vfn.cz

Phone: +420-224967679

Fax: +420-224967168

Abbreviations:

Hcy, homocysteine; Cysta, cystathionine; Met, methionine; tHcy, total homocysteine; DBS, dried blood spots; LC-MS/MS, liquid chromatography-tandem mass spectrometry; MRM, multiple reaction monitoring; RM, remethylation; CBS, cystathionine beta-synthase; Hcy-Hcy, homocystine; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediaminetetraacetic acid; CV, coefficient of variation; TCEP, tris-(2-carboxyethyl)phosphine; LOD, limit of detection; and LOQ, limit of quantification.

Abstract

BACKGROUND

Disorders of homocysteine and B-vitamin metabolism represent a significant problem in clinical practice. Establishing the diagnosis requires specialized tests with demanding preanalytical requirements. To advance the detection of patients with these disorders, we developed a method for the simultaneous determination of cystathionine (Cysta), methionine (Met) and total homocysteine (tHcy) in dried blood spots (DBS).

METHODS

A punch from a DBS sample was mixed with a solution of isotopically labeled internal standards, and analytes were extracted using methanol/0.1% formic acid/0.5 mol/L dithiothreitol. The extract was injected into an LC-MS/MS system operating in MRM mode.

RESULTS

The analytical performance of the method employing DBS is adequate for its purpose and the type of sample. Compared with Cysta, tHcy and Met plasma levels, our method exhibited a negative bias between -6.4% and -42.2% due to the lower concentrations of these analytes in erythrocytes. The tHcy level and the Met/Cysta ratio in DBS enabled the clear detection of 12 patients with disorders of transsulfuration and with genetic and nutritional remethylation defects.

CONCLUSIONS

The ease of collecting and transporting DBS samples may advance diagnostic procedures in patients with neuropsychiatric disorders and thromboembolism. Consequently, this approach may facilitate detection and simplify the monitoring of patients with homocystinuria.

Key words: cystathionine, homocysteine, methionine, dried blood spots, LC-MS/MS, newborn screening, therapy monitoring

1. Introduction

Homocystinuria represents a group of rare genetic disorders characterized by markedly elevated plasma levels of total homocysteine (tHcy) and its increased excretion in the urine. Currently, 8 distinct enzyme deficiencies caused by mutations in the respective genes are recognized as causes of homocystinuria. In homocystinuria, the plasma tHcy concentrations typically range between 50 and 400 $\mu\text{mol/L}$ compared to physiological levels of 5-15 $\mu\text{mol/L}$. Two types of homocystinuria can be distinguished based on the location of the enzyme defect and the resulting changes in methionine (Met) and cystathionine (Cysta) concentrations. Defects in the remethylation (RM) pathway, such as methylene tetrahydrofolate reductase deficiency, and intracellular methylcobalamin synthesis defects of complementation groups cblC, cblD (including cblD variants), cblE, cblF, cblG and cblJ are characterized by low-normal to decreased plasma Met levels and high-normal to elevated Cysta levels. In contrast, the hallmark of cystathionine beta-synthase (CBS) deficiency, which affects the transsulfuration pathway of homocysteine (Hcy), is plasma with elevated Met level and low-normal to decreased Cysta levels. Thus, the ratio of Met/Cysta may be a suitable marker for differentiating these two types of homocystinuria [1]. Homocysteine metabolism depends not only on the intact function of the genes described above but also on the nutritional supply of B vitamins (i.e., folates, riboflavin, cobalamin and pyridoxine) and their transport and intracellular metabolism. Thus, markedly elevated plasma total homocysteine concentration between 30 and 100 or greater than 100 $\mu\text{mol/L}$ (i.e., moderate or severe hyperhomocysteinemia, respectively) is a general sign of genetic or severe nutritional disturbances in the transsulfuration and RM pathways.

Most patients with disorders of Hcy and B-vitamin metabolism are ascertained in pediatric, hematological and neurological practice after presenting symptoms. Newborns with homocystinurias are also diagnosed in the presymptomatic phase in some neonatal screening programs worldwide. The prevalence of all homocystinurias as a group remains unknown; published CBS deficiency studies revealed prevalence rates between 1:1,800 in Qatar and 1:900,000 in Japan [2]. Homocystinurias are clinically heterogeneous, although they share a high risk of thromboembolism, which is attributed to grossly elevated levels of tHcy [3]. Some patients with CBS deficiency may also suffer from connective tissue abnormalities and/or developmental delay, cognitive impairment and epilepsy. Patients with RM defects do not exhibit connective tissue abnormalities, but their neurological and psychiatric complications are usually more

severe, exhibiting, e.g., white matter abnormalities and occasionally impairment in hematopoiesis, leading to megaloblastic anemia [4]. The diagnostic work-up for all these conditions requires plasma tHcy determination with specific preanalytical conditions (time limit for centrifugation, cooling of samples after collection and during transportation) and the availability of special assays for serum/plasma B-vitamins, Met and Cysta.

It has been shown that early detection and timely dietary and/or pharmacological treatment can prevent many clinical complications associated with homocystinuria and can substantially improve the quality of life of patients; as a result, these diseases have become a widely recognized target for routine neonatal screening [5, 6]. The primary screening markers assessed in routine newborn screening programs for homocystinuria are the Met level and the Met/phenylalanine ratio; however, these markers suffer from low sensitivity and specificity [7, 8]. The use of tHcy as a primary marker in dried blood spots (DBS) substantially increases the specificity and sensitivity of homocystinuria screening, although this method is used only in Qatar due to its high cost and lengthy analysis [9]. Consequently, a number of screening programs for homocystinuria have combined the measurement of Met as a primary marker with a second-tier analysis of tHcy in DBS samples that exhibit abnormal Met concentrations [10].

DBS have been used for decades to screen newborns for a predefined set of disorders of amino acid metabolism, such as phenylketonuria, as well as to monitor dietary treatment. More recently, the DBS method has become instrumental in screening high-risk populations for inborn errors of metabolism, such as fatty acid oxidation defects, biotinidase deficiency and lysosomal storage disorders (e.g., considerably increasing the detection of Fabry disease [11]). Considering the simplicity of collecting and transporting DBS samples, LC-MS/MS analysis may potentially also be used as the first step in screening clinically symptomatic high-risk populations for the two types of homocystinuria and severe B-vitamin deficiencies.

A number of methods for measuring tHcy and/or Met in DBS have been reported [12-16], although no analysis of Cysta in DBS has yet been published. Thus, we aimed to develop a simple LC-MS/MS method for the simultaneous measurement of Cysta, tHcy and Met. This method was optimized to detect not only marked elevations of tHcy in DBS but also to provisionally and simultaneously differentiate transsulfuration and remethylation defects. The presented method may be utilized a/as a

second-tier method in neonatal screening, b/for screening high-risk patients with putative genetic defects or severe B-vitamin deficiencies, and c/for monitoring therapy in patients with homocystinuria.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals and reagents

Cysta, Hcy, homocystine (Hcy-Hcy), Met, methionine-d₃ (d₃-Met) and dithiothreitol (DTT) were purchased from Sigma-Aldrich. Cystathionine-d₄ (d₄-Cysta) was obtained from CDN Isotopes and homocystine-d₈ (d₈-Hcy-Hcy) from Cambridge Isotope Laboratories. All the solutions and solvents were of the highest available purity and were suitable for LC-MS analysis. All stock solutions were stored at -20°C.

2.2. Calibrators and samples

To prepare DBS calibrators, blood samples from healthy anonymous donors without any hematological diseases were collected in EDTA tubes and enriched with 2.5, 5, 25, 50, 100, 150 and 200 µmol/L of Hcy-Hcy; 5, 10, 50, 100, 200, 300, 400, 500 and 600 µmol/L of Met; and 0.50, 1.00, 5.00 and 10.00 µmol/L of Cysta. These spiked blood samples were spotted onto filter cards (Whatman 903, GE Healthcare Life Sciences, USA), dried overnight at room temperature and stored at -20°C.

To determine the reference ranges for the comparative study and to assess the recovery and stability of the analytes, we used anonymous control plasma samples and/or DBS. To determine the reference ranges in newborns, we used random DBS samples from routine newborn screenings; for the remainder of the studies, we employed aliquots of EDTA plasma and/or DBS samples remaining after negative routine biochemical genetic screening for inborn errors of metabolism. Samples were collected from patients with homocystinuria after informed consent was obtained; we had access to twelve archived DBS samples collected at the time of diagnosis and sixty EDTA plasma and DBS samples collected from 21 patients during routine clinical visits (hematocrit values were within appropriate age-related reference ranges). All DBS samples were stored at room temperature prior to analysis, and the plasma samples were stored at -20°C.

This study was approved by the Ethics Committee of the General University Hospital in Prague, No. 30/10/IGA MZ ČR VFN.

2.3. DBS sample preparation

A single 3.2 mm (1/8 in.) disc was punched from each DBS and placed into a flat polypropylene 96-well microtiter plate (Chromsystems, Germany). A 20 μL mixture of isotopically labeled internal standards dissolved in water, which contained 2.5 $\mu\text{mol/L}$ $\text{d}_8\text{-Hcy-Hcy}$, 5 $\mu\text{mol/L}$ $\text{d}_3\text{-Met}$ and 1.5 $\mu\text{mol/L}$ $\text{d}_4\text{-Cysta}$, was added, followed by 20 μL of DTT (500 mmol/L in water) and 150 μL of methanol containing 0.1% formic acid. The extraction was performed by gentle laminar shaking at room temperature for 30 min. The extract was then transferred into polypropylene 96-well microtiter plates containing filter membranes (AcroPrep, 0.45 μm PTFE, 350 μL , Chromsystems) and filtered into another polypropylene 96-well microtiter plate by centrifugation (at 4,000 U/min for 5 min). The plate was sealed and analyzed using LC-MS/MS.

2.4. LC-MS/MS instrumentation and conditions

The LC-MS/MS system consisted of an Agilent 1200 HPLC (Agilent Technologies, USA) and a triple-quadrupole MS/MS API 4000 system (AB SCIEX, Framingham, USA). LC separation was performed on a Waters C8 column (SunFire; 3.5 μm , 4.6 x 100 mm) by isocratic elution using a mobile phase consisting of 40% methanol and 0.1% formic acid in water. The flow rate was 350 $\mu\text{L}/\text{min}$, and the injection sample volume was 5 μL . Tandem mass spectrometry was performed using a turbo ion spray source operated in positive mode, and the multiple reaction monitoring (MRM) mode was used for the selected analytes and their internal standards. The mass calibration of both quadrupoles was optimized using a polypropylene glycol solution with an infusion pump. The following electrospray settings were used: voltage 5000 V, temperature 400°C, nebulizer gas 40 (GS1), heater gas 30 (GS2) and curtain gas (CUR) 25 psi. The MRM transitions for all the compounds were optimized by the infusion of 10 $\mu\text{mol/L}$ aqueous solution.

The LC-MS/MS parameters are shown in Table 1. Quantitative results were obtained by dividing the peak area of each analyte by the peak area of the corresponding isotopically labeled standard, and the ratios were converted to concentrations by applying factors derived from the calibration curve. The concentrations were calculated from the calibration curves using Analyst 1.5.2 software (AB SCIEX).

2.5. Routine methods for the measurement of plasma tHcy, Met and Cysta

For plasma tHcy determination, we used the HOMOCYSTEIN 2R FHET 100 commercial enzymatic Hcy kit (Axis-Shield, Scotland) and the Hitachi 902 automatic analyzer (Roche, Switzerland) with CVs lower than 7%. The plasma Met level was analyzed using ion exchange chromatography with ninhydrin detection in an AAA 400 automatic amino acid analyzer (INGOS, Czech Republic) with analytical CVs lower than 10% [17]. The plasma Cysta level was analyzed using LC-MS/MS with a commercially available amino acid analysis kit (EZ:faast, Phenomenex, Torrance, USA). The samples were prepared according to the manufacturer's instructions, which included a solid-phase extraction step, derivatization with propyl chloroformate and extraction into an organic solvent prior to LC-MS/MS analysis with analytical CVs lower than 7% [18].

2.6. Comparative study

Sixty samples from patients with homocystinuria and 40 control samples were included in this study. The concentrations of tHcy, Met and Cysta in plasma and simultaneously collected DBS samples were determined using the three above-mentioned routine techniques and the novel LC-MS/MS approach, respectively. A second comparative study was conducted using only the plasma samples to evaluate the correlation between the routine techniques and a modification of the newly developed method (the procedure described in the “DBS sample preparation” section was modified by analyzing 10 μ L of plasma instead of using DBS punches). Comparisons were performed using Bland-Altman plots created using MedCalc[®] (MedCalc Software, Belgium), and regression analyses were performed using Microsoft Excel.

3. Results

3.1. Optimal conditions for DBS extraction

To optimize the DBS sample extraction procedure prior to LC-MS/MS, four parameters were evaluated: type of extraction solvent, influence of sonication, extraction time and type of reducing agent. After the mixture of isotopically labeled internal standards and DTT were added to the DBS punch, the analytes were extracted by shaking for 30 min at room temperature using five different solvents. The extracts were clear and colorless, except for the slightly red-colored water extract. The experiments were performed in duplicate, and Fig. 1 shows the averages. Extraction with methanol containing 0.1%

formic acid resulted in the highest yields for all three analytes, and this technique was compatible with the mobile phase for LC; thus, this solvent was subsequently used throughout the study. To evaluate the penetration of this solvent into DBS during the extraction step, a punch was completely destroyed and homogenized using a sonication needle (20 kHz, 5 min), and the concentration of each analyte in the filtered mixture was compared to the concentration produced by the routine shaking process; sonication did not further increase the yield. Similarly, extending the extraction time beyond 30 min (i.e., up to 60 min) did not increase the recovery. We also compared the efficacy of two reducing agents by adding 500 mmol/L of DTT or tris-(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP). The addition of TCEP adversely affected both the extraction step (due to the release of the particulate fraction into solution) and the chromatographic separation, resulting in abnormally shaped analyte peaks. In contrast, the addition of DTT did not impair the sample preparation procedure or the LC-MS/MS analysis and was thus used throughout the study.

3.2. Linearity

The linear correlation between the concentration and the signal ratio (analyte/internal standard) within a clinically relevant range was tested by analyzing DBS calibrators containing added metabolites with concentrations ranging from 5 to 400 $\mu\text{mol/L}$ for tHcy, from 5 to 600 $\mu\text{mol/L}$ for Met and from 0.50 to 10.0 $\mu\text{mol/L}$ for Cysta. The data were collected over a period of 5 days. The calibration curves were created using the following equations: $y=0.022(\pm 0.006)x+0.095$ (± 0.045) for tHcy, $y=0.033(\pm 0.005)x+0.801(\pm 0.053)$ for Met and $y=0.286(\pm 0.06)x+0.0581$ (± 0.04) for Cysta; the endogenous background of each analyte was corrected in the Analyst software by calculating the non-spiked signal. To assess the linearity of the calibration curve for low Cysta concentrations, the calibration points of 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.50, 1.00, 5.00 and 10.00 $\mu\text{mol/L}$ Cysta were tested in a separate experiment and produced a calibration curve with an equation: $y=0.292x+0.047$. As the slopes of the two calibration curves for Cysta were not significantly different, we used the 0.5-10.0 $\mu\text{mol/L}$ range for calibration throughout the study. The coefficients of determination (R^2) were greater than 0.993 for all analytes, and the linearity was confirmed by Mandel's fitting test, indicating that the responses were linear within the clinically relevant concentration ranges.

3.3. Imprecision and limits of detection and quantification

We assessed the method imprecision by analyzing samples from 9 patients with homocystinuria who exhibited varying concentrations of tHcy, Met and Cysta (for details, see Table 2). The intra-assay imprecision, which was determined using ten replicates from a single patient sample, ranged from 5.8 to 13.4%. The inter-assay imprecision, which was determined by analyzing the same nine samples over a period of 20 days, ranged from 8.8 to 14.6%. The limits of detection (LOD), which were determined by evaluating the noise signal in blank filter paper and employing a signal-to-noise ratio of 3:1, ranged from 0.03 to 0.25 $\mu\text{mol/L}$. The limits of quantification (LOQ), which were calculated as the lowest concentration of each analyte with an intra-assay imprecision CV of less than 20%, ranged from 0.05 to 0.70 $\mu\text{mol/L}$.

3.4. Recovery

Recovery was calculated by comparing the extraction yield before and after the standard addition of the compounds (Met, Cysta and Hcy) into the control blood samples (before spotting onto filter cards) at two clinically relevant concentration levels. The data were collected on three separate days, and Table 2 shows the averages of these 3 measurements, which ranged from 74.4 to 108.9%.

3.5. Chromatography and matrix effects

Fig. 2 shows the MRM chromatograms obtained for each target analyte and its internal standards. In all analyses, we observed only one interference: an unknown peak with the d_3 -Met MRM transition at a retention time of 1.8 min. However, this peak was chromatographically well separated from the analytes of interest eluting between 2.5 and 3.3 min and therefore did not cause any interference. No carryover peaks (i.e., signal below LOD) were observed in the blank samples after the high calibrator was injected. The ion suppression effects were analyzed in post-column infusion experiments by directly infusing analytes dissolved in the mobile phase while the DBS extract was simultaneously injected via the autosampler [19]. There was no significant ion suppression (i.e., lower than 10%) of the analytes of interest, although a 90% decrease in signal was observed for the unknown peak at a retention time of 1.8 min. In summary, the ion suppression of tHcy, Met and Cysta was negligible, and any potential

small effect on quantitation was eliminated by using stable isotope internal standards for each analyte.

3.6. Stability study

To evaluate the applicability of this method to routine clinical practice, we evaluated the stability of the metabolites of interest in DBS over a 2-week period, which represents sufficient time for transporting a sample from the patient to the laboratory. The stability was tested by analyzing DBS samples with Met, Cysta and tHcy concentrations of 55.3 $\mu\text{mol/L}$, 1.62 $\mu\text{mol/L}$ and 59.4 $\mu\text{mol/L}$, respectively. All the specimens were stored at 25°C, and the observed decreases in tHcy, Met and Cysta concentrations were only 5.6%, 8.1% and 2.8%, respectively, after 14 days of storage. Because these decreases in the analyte concentrations were lower than the inter-assay variability, they did not appear to be significant.

3.7. Method comparison

We compared three routine methods for determining sulfur amino acids in plasma against the newly developed method for evaluating DBS. The tHcy, Met and Cysta concentrations in the DBS samples correlated very well with the concentrations obtained from plasma (Fig. 3 shows coefficients of 0.986, 0.996 and 0.989 for tHcy, Met and Cysta, respectively). However, a Bland-Altman analysis indicated bias values of -40.6%, -42.2% and -6.4% for the new method employing DBS compared with the routine methods for determining the plasma concentrations of tHcy, Met and Cysta, respectively.

To explore whether the above-mentioned biases originated from the use of different matrices (i.e., blood in DBS versus plasma) or different analytical approaches, we compared the concentrations of analytes obtained from plasma to the concentrations obtained using the three routine techniques and a modification of the new method. The regression plots demonstrated very good linear correlations between these methods for tHcy (n=36 patients; $R^2 = 0.989$, range 10.7–392.8 $\mu\text{mol/L}$), Met (n=36 patients; $R^2 = 0.983$, range 14.1–587.1 $\mu\text{mol/L}$) and Cysta (n=30 patients; $R^2 = 0.978$, range 0.05–4.07 $\mu\text{mol/L}$). The bias values of the modified LC-MS/MS method for plasma samples were -8.4% (95% confidence interval from -10.4% to -6.3%), -6.9% (95% confidence interval from -10.3% to -3.4%) and 19.1% (95% confidence interval from 11.1% to 27.1%) compared with the routine methods used to measure tHcy, Met and Cysta,

respectively. These data suggest that the negative bias of the new method employing DBS compared with plasma samples was most likely due to the use of different matrices.

3.8. Assessment of clinical utility of the new method

The first step in assessing the clinical utility of the method was to establish the reference ranges. Age- and gestation-specific reference ranges for all 3 analytes, as well as the Met/Cysta ratio, were obtained from 350 controls (for details, see Table 3). The concentrations of Met and tHcy varied only slightly among the age/gestation groups and were similar to the concentrations reported elsewhere [20, 21]. In contrast, the concentrations of Cysta were highest in low-birth-weight newborns and decreased with maturity and aging, which has also been observed in other studies involving Cysta determination in serum or plasma [22, 23]. Congruently, the Met/Cysta ratio increased with maturation and aging.

Next, we examined whether the proposed method could be used as a simple and rapid tool to screen for homocystinurias and severe nutritional B-vitamin deficiencies and to simultaneously differentiate between RMD and transsulfuration disorders among patients with neuropsychiatric disorders or thromboembolism. An analysis of archived DBS samples collected at diagnosis from 11 patients with homocystinuria and from 1 patient with a vitamin B₁₂ deficiency clearly distinguished the patients from the controls (see Table 3). In all cases, we observed grossly elevated concentrations of tHcy and abnormal Met/Cysta ratios, which reflected the altered flux between the transsulfuration and RMD pathways. Among all the evaluated markers, only the Met/Cysta ratio enabled differentiation between RMD and transsulfuration disorders. The data obtained in this etiologically heterogeneous group of samples indicated the potential clinical utility of our new method for detecting both homocystinurias and severe B-vitamin deficiencies.

4. Discussion

In this report, we describe a simple and rapid method for the simultaneous measurement of three clinically relevant sulfur amino acids in DBS. The novelty of our method lies in the use of DBS for the determination of an important marker of the transsulfuration pathway – Cysta – while simultaneously analyzing tHcy and Met. The diagnostic utility of this method as a rapid screening procedure for detecting patients with severe hyperhomocysteinemia was demonstrated by its successful application to clinical

samples. Using the DBS method, we distinguished controls from patients with primary enzyme deficiencies and from one patient with a severe nutritional vitamin B₁₂ deficiency. Moreover, the proposed method simultaneously enabled us to clearly distinguish between defects in the RMD and transsulfuration of Hcy by assessing the flux of Hcy through these metabolic pathways and by using the previously proposed Met/Cysta ratio [1].

A number of studies have described methods to detect these three analytes, individually or in various combinations, in liquid plasma or DBS [13-16, 24-27]. The analytical performance of our method, i.e., its linearity, recovery and reproducibility, is similar to the performance previously described in other studies employing DBS, indicating the suitability of our method for routine use [13, 15]. However, the reproducibility of our method is slightly lower than the reproducibility of routine methods employing liquid plasma or serum due to the inherent non-homogeneity of DBS. In the newly developed method, the LOQs of tHcy and Met are one to two orders of magnitude lower than their physiological concentrations, whereas the LOQ of Cysta is only slightly below the lower limit of the reference range. The limited sensitivity of our method may therefore cause problems in determining Cysta at the lower limit of the reference range in blood. Moreover, variation in sampling DBS or severe alterations of the hematocrit may also influence the concentration of analytes and should be considered. Despite these limitations, the method is suitable for the purpose for which it was developed, i.e., for identifying patients with moderate to severe hyperhomocysteinemia that has to be followed by further diagnostic workup.

Our novel method of analyzing DBS exhibited a negative bias in determining the concentrations of Met and tHcy compared with routine methods using plasma samples. This observation is congruent with other reports that the levels of tHcy and Met in DBS are approximately 40% lower than in plasma due to the lower concentration of these two amino acids in erythrocytes compared with plasma [14, 28, 29]. The bias for the measurement of Cysta in DBS versus plasma was negligible, and comparison to other studies was not possible due to the absence of reports on Cysta levels in DBS. Thus, it is conceivable that the presented method may be utilized to monitor the treatment of homocystinuria patients, although it is important to keep in mind that the Met and tHcy concentrations in DBS are lower than in plasma.

The utility of DBS, which is easy to collect and ship, in common clinical situations has been instrumental in increasing the detection of several rare genetic

disorders [30, 31]. Moreover, various studies have shown that moderate and severe hyperhomocysteinemia is quite common in clinical practice, especially among individuals with thrombosis, megaloblastic anemia or neuropsychiatric disorders. However, the intricacies of establishing the correct diagnosis in such patients include complicated sampling and transportation precautions and the limited availability of special assays for measuring plasma Hcy, Met and Cysta levels. Thus, the ease of DBS collection and sample transportation, and avoidance of the centrifugation step make the described method suitable for routine clinical practice, including the self-collection of capillary blood by patients. To summarize, we propose that the method presented herein may improve the detection of patients with defects in Hcy metabolism in routine clinical pediatric, hematology and neurology practices.

Acknowledgments

This study was supported by the grant NT/12213–3 from the Grant Agency of the Ministry of Health of the Czech Republic.

References

- [1] Janosik M, Sokolova J, Janosikova B, Krijt J, Klatovska V, Kozich V. Birth prevalence of homocystinuria in central europe: frequency and pathogenicity of mutation c.1105C>T (p.R369C) in the cystathionine beta-synthase gene. *J Pediatr* 2009;154:431-7.
- [2] Naughten ER, Yap S, Mayne PD. Newborn screening for homocystinuria: Irish and world experience. *Eur J Pediatr* 1998;157:84-7.
- [3] Mudd SH, Levy HL, Kraus JP. Disorders of transsulfuration. In: Scriver ChR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D. *The metabolic and molecular bases of inherited disease*, New York: McGraw-Hill; 2001, p. 2007-57.
- [4] Schiff M, Benoist JF, Tilea B, Royer N, Giraudier S, Ogier de Baulny H. Isolated remethylation disorders: Do our treatments benefit patients? *J Inherit Metab Dis* 2011;34:137-45.
- [5] Yap S, Boers GH, Wilcken B, et al. Vascular outcome in patients with homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency treated chronically: a multicenter observational study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:2080-5.
- [6] Yap S, Rushe H, Howard PM, Naughten ER. The intellectual abilities of early-treated individuals with pyridoxine-nonresponsive homocystinuria due to cystathionine beta-synthase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2001;24:437-47.
- [7] Peterschmitt MJ, Simmons JR, Levy HL. Reduction of false negative results in screening of newborns for homocystinuria. *N Engl J Med* 1999;341:1572-6.
- [8] ten Hoedt AE, van Kempen AA, Boelen A, et al. High incidence of hypermethioninaemia in a single neonatal intensive care unit detected by a newly introduced neonatal screening programme. *J Inherit Metab Dis* 2007;30:978.
- [9] Gan-Schreier H, Kebbewar M, Fang-Hoffmann J, et al. Newborn population screening for classic homocystinuria by determination of total homocysteine from Guthrie cards. *J Pediatr* 2010;156:427-32.
- [10] Matern D, Tortorelli S, Oglesbee D, Gavrillov D, Rinaldo P. Reduction of the false-positive rate in newborn screening by implementation of MS/MS-based second-tier tests: the Mayo Clinic experience (2004-2007). *J Inherit Metab Dis* 2007;30:585-92.

- [11] Chamoles NA, Blanco MB, Gaggioli D, Casentini C. Hurler-like phenotype: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clin Chem* 2001;47:2098-102.
- [12] Chace DH, Hillman SL, Millington DS, Kahler SG, Adam BW, Levy HL. Rapid diagnosis of homocystinuria and other hypermethioninemias from newborns' blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 1996;42:349-55.
- [13] Gempel K, Gerbitz KD, Casetta B, Bauer MF. Rapid determination of total homocysteine in blood spots by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2000;46:122-3.
- [14] McCann SJ, Gillingwater S, Keevil BG, Cooper DP, Morris MR. Measurement of total homocysteine in plasma and blood spots using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: comparison with the plasma Abbott IMx method. *Ann Clin Biochem* 2003;40:161-5.
- [15] Turgeon CT, Magera MJ, Cuthbert CD, et al. Determination of total homocysteine, methylmalonic acid, and 2-methylcitric acid in dried blood spots by tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2010;56:1686-95.
- [16] Alodaib AN, Carpenter K, Wiley V, Wotton T, Christodoulou J, Wilcken B. Homocysteine measurement in dried blood spot for neonatal detection of homocystinurias. *JIMD Rep* 2012;5:1-6.
- [17] Hyaneek J. Dědičné metabolické poruchy. Praha: Avicenum; 1991.
- [18] Krijt J, Kopecka J, Hnizda A, Moat S, Kluijtmans LA, Mayne P, Kozich V. Determination of cystathionine beta-synthase activity in human plasma by LC-MS/MS: potential use in diagnosis of CBS deficiency. *J Inherit Metab Dis* 2011;34:49-55.
- [19] Annesley TM. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem* 2003;49:1041-4.
- [20] Lepage N, McDonald N, Dallaire L, Lambert M. Age-specific distribution of plasma amino acid concentrations in a healthy pediatric population. *Clin Chem* 1997;43:2397-402.
- [21] Vilaseca MA, Moyano D, Ferrer I, Artuch R. Total homocysteine in pediatric patients. *Clin Chem* 1997;43:690-2.
- [22] Refsum H, Grindflek AW, Ueland PM, et al. Screening for serum total homocysteine in newborn children. *Clin Chem* 2004;50:1769-84.

- [23] Obeid R, Munz W, Jager M, Schmidt W, Herrmann W. Biochemical indexes of the B vitamins in cord serum are predicted by maternal B vitamin status. *Am J Clin Nutr* 2005;82:133-9.
- [24] Stabler SP, Lindenbaum J, Savage DG, Allen RH. Elevation of serum cystathionine levels in patients with cobalamin and folate deficiency. *Blood* 1993;81:3404-13.
- [25] Weaving G, Rocks BF, Iversen SA, Titheradge MA. Simultaneous quantitation of homocysteine, cysteine and methionine in plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ann Clin Biochem* 2006;43:474-80.
- [26] Rafii M, Elango R, House JD, Courtney-Martin G, Darling P, Fisher L, Pencharz PB. Measurement of homocysteine and related metabolites in human plasma and urine by liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009;877:3282-91.
- [27] Fu X, Xu YK, Chan P, Pattengale PK. Simple, fast, and simultaneous detection of plasma total homocysteine, methylmalonic acid, methionine, and 2-methylcitric acid using liquid chromatography and mass spectrometry (LC/MS/MS). *JIMD rep* 2013;10:69-78.
- [28] Proenza AM, Palou A, Roca P. Amino acid distribution in human blood. A significant pool of amino acids is adsorbed onto blood cell membranes. *Biochem Mol Biol Int* 1994;34:971-82.
- [29] Bowron A, Barton A, Scott J, Stansbie D. Blood spot homocysteine: a feasibility and stability study. *Clin Chem* 2005;51:257-8.
- [30] Scott CR, Elliot S, Buroker N, et al. Identification of infants at risk for developing Fabry, Pompe, or mucopolysaccharidosis-I from newborn blood spots by tandem mass spectrometry. *J Pediatr* 2013;163:498-503.
- [31] Castilhos CD, Mezzalira J, Goldim MP, et al. Determination of the lysosomal hydrolase activity in blood collected on filter paper, an alternative to screen high risk populations. *Gene* 2014;536:344-7.

Table 1. LC-MS/MS parameters for analytes and internal standards.

Compound	Time (min)	MRM transitions (m/z)	Dwell time (ms)	DP ^a (V)	CE ^b (V)
Cysta	2.51	222.9/133.9	100	30	20
d ₄ -Cysta	2.51	226.9/137.9	100	30	20
Hcy	2.90	136.0/90.1	100	35	17
d ₄ -Hcy	2.90	140.1/94.1	100	35	17
Met	3.25	150.0/104.1	100	21	14
d ₃ -Met	3.25	153.0/107.0	100	21	14

^aDeclustering potential, ^bCollision energy

Table 2. Analytical parameters for the LC-MS/MS method.

Compound	Concentration	Imprecision (CV %)		LOD	LOQ	Recovery
	($\mu\text{mol/L}$)	Intra-day	Inter-day (days 1–20)	(μmol/L)		%
tHcy	6.3	7.8	13.5	0.25	0.70	84.4 ^a
	15.2	5.8	8.8			89.3 ^b
	55.8	6.9	9.8			
Met	7.2	8.7	14.5	0.20	0.60	93.5 ^c
	46.5	7.3	11.1			94.8 ^d
	95.4	9.1	10.5			
Cysta	0.07	13.4	14.6	0.03	0.05	108.9 ^e
	0.36	7.4	11.8			74.4 ^f
	5.63	8.1	13.8			

Target concentrations: ^a12.2 $\mu\text{mol/L}$, ^b57.2 $\mu\text{mol/L}$, ^c20.0 $\mu\text{mol/L}$, ^d65.0 $\mu\text{mol/L}$, ^e0.55 $\mu\text{mol/L}$, and ^f5.25 $\mu\text{mol/L}$.

Table 3. The tHcy, Met and Cysta concentrations in dried blood spots from controls and patients with homocystinuria determined by LC-MS/MS methods.

Controls/Patients	Age	tHcy	Met	Cysta	Met/Cysta
		µmol/L blood			
Controls ^a	newborns < 2500 g (n=50)	6.1 (2.9 - 8.7)	15.9 (5.3 - 41.2)	1.50 (0.26 - 9.40)	22.8 (2.0 - 46.1)
	newborns > 2500 g (n=200)	6.6 (2.5 - 8.9)	12.8 (6.9 - 26.9)	0.30 (0.13 - 0.82)	43.4 (15.9 - 105.4)
	1 m-15 y (n=50)	7.3 (5.5 - 8.7)	12.7 (7.2 - 26.7)	0.14 (0.08 - 0.57)	90.7 (17.6 - 228.8)
	> 15 y (n=50)	10.1 (7.8 - 12.8)	15.8 (7.8 - 28.1)	0.13 (0.08 - 0.33)	114.4 (35.6 - 204.5)
	RM defect ^b	3 m	80.9	1.5	3.21
RM defect ^c	11 m	68.5	5.0	0.44	11.4
B12 deficiency	7 m	82.3	16.0	1.46	11.0
CBS deficiency ^d	3 d	85	75.4	0.06	1346
CBS deficiency	5 m	195.2	62.1	0.05	1321
CBS deficiency	1 y	195.0	72.0	0.11	642
CBS deficiency	2 y	198.0	68.5	0.07	978
CBS deficiency	24 y	87.0	60.0	0.07	909
CBS deficiency	48 y	213.0	30.0	0.12	260
CBS deficiency	52 y	131.3	242.0	0.07	3315
CBS deficiency	54 y	179.0	253.0	0.18	1429
CBS deficiency	74 y	280.0	82.1	0.13	646

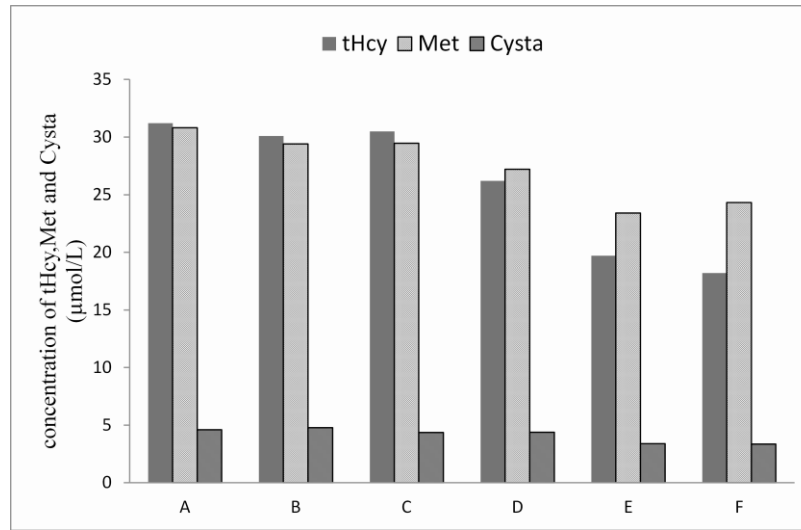
^a Analyte concentrations are represented as medians with 2.5th–97.5th percentiles

^b Patient with confirmed cblG defect

^c Patient with a biochemically confirmed block in remethylation pathway and a yet unresolved genetic defect

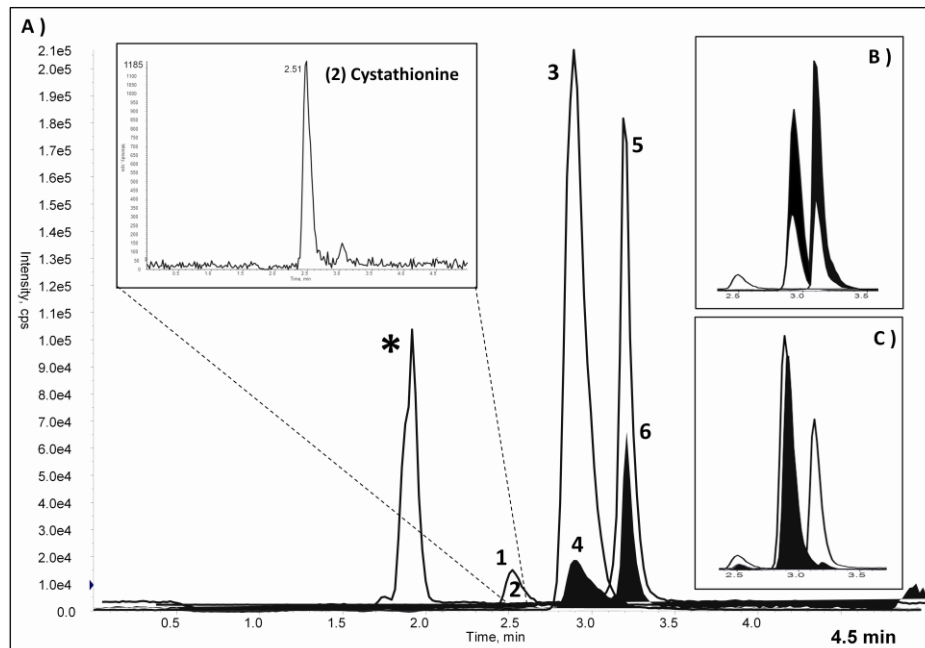
^d Patient ascertained via neonatal screening; birth weight 3,600 g

Figure 1. Extraction yields of tHcy, Met and Cysta using different extraction solvents.



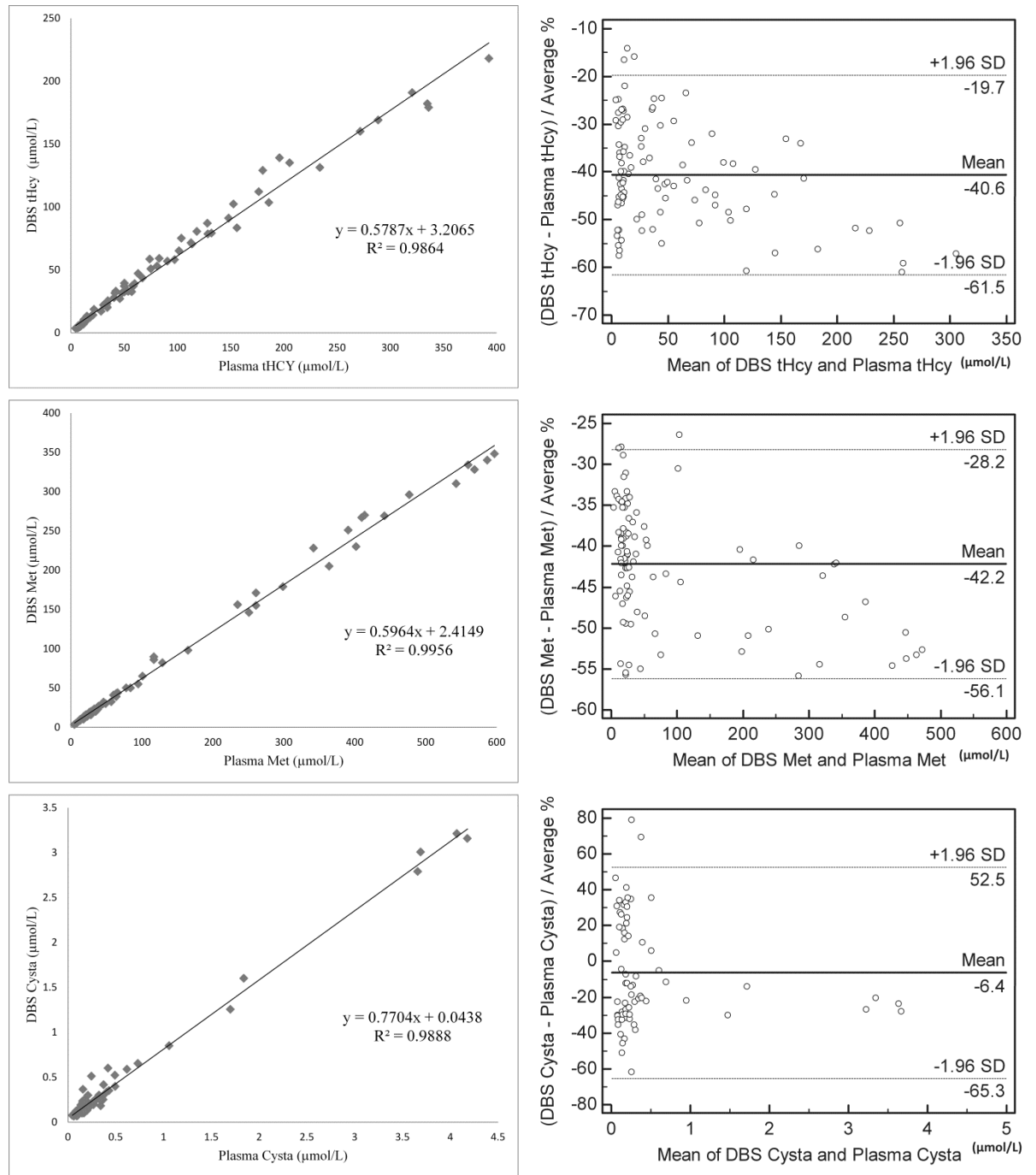
A punch of DBS was mixed with internal standards and DTT, and the analytes were extracted using: (A) MeOH+0.1% formic acid, (B) MeOH, (C) MeOH+0.1% formic acid with sonication, (D) acetonitrile, (E) acetone:acetonitrile (50:50), and (F) water

Figure 2. LC-MS/MS chromatograms of eluents from a healthy control subject (A), a patient with CBS deficiency (B) and a patient with RMD (C).



(1) d4-Cysta; (2) Cysta; (3) d4-Homocysteine; (4) tHcy; (5) d3-Met; (6) Met; *unknown peak

Figure 3. Comparison of DBS samples and plasma samples using regression analyses (left panels) and Bland-Altman plots (right panels).



tHcy (n=100), Met (n=100) and Cysta (n=70)

Příloha III

Seznam publikací a posterových prezentací

A) Seznam publikací

1. Nesměrák K, Doležal R, Hudská V, **Bártl J**, Štícha M, Waisser K. Quantitative structure-electrochemistry relationship of 1-phenyl-5-benzyl-sulphonyltetrazoles and their electrooxidation as a metabolic model. *Electroanalysis*. 2010; 22:17–18,2117–2122. (IF 2.721)
2. Stibůrková B, Krijt J, Vyleťal P, **Bártl J**, Gerhatová E, Kořínek M, Šebesta I. Novel mutations in xanthine dehydrogenase/oxidase cause severe hypouricemia: Biochemical and molecular genetic analysis in two Czech families with xanthinuria type I. *Clinica Chimica Acta* 2012;413:93-9. (IF 2.850)
3. Šebesta I, Stibůrková B, **Bártl J**, Ichida K, Hosoyamada M, Taylor J, Marinak A. Diagnostic tests for primary renal hypouricemia. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* 2011;30:1112-6. (IF 0.899)

V recenzním řízení:

4. **Bártl J**, Chrastina P, Krijt J, Hodík J, Pešková K, Kožich V. Simultaneous determination of cystathionine, total homocysteine, and methionine in dried blood spots by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its utility for the management of patients with homocystinuria. *Clinica Chimica Acta* (IF 2.669)
5. Mráz M, Olha H, **Bártl J**, Dolezel Z, Marinaki A, Fairbanks L, Stiburkova B. Modern diagnostic approach to Hereditary Xanthinuria. *Clinica Chimica Acta* (IF 2.669)

B) Seznam posterů

1. **Bártl J.**, Chrastina P., Šťastná S., Košařová M., Elleder M., Zeman J.: Tandem mass spectrometry in newborn screening of inherited metabolic disorders, 17th International Mass Spectrometry Conference, Praha, Česká republika (2006)
2. **Bártl J.**, Dvořáková H., Pospíšilová E., Chrastina P., Šťastná S.: Kvantitativní stanovení guanidinoacetátu, kreatinu a kreatininu v moči metodou tandemové hmotnostní spektrometrie, 21. dní Dedičné Metabolické Poruchy, Sliač, Slovensko (2006)
3. **Bártl J.**, Martincová O., Krijt J., Zeman J., Šebesta I.: Diagnostic approach to adenosine deaminase deficiency, Annual Symposium of the Society of Inborn Errors of Metabolism, Hamburg, Německo (2007)
4. **Bártl J.**, Šebesta I., Stibůrková B., Šťastná S., Krijt J.: Diagnostický postup pro dědičnou xanthinurii, 23. dní Dedičné Metabolické Poruchy, Senec, Slovensko (2008)
5. **Bártl J.**, Chrastina P., Zvoníčková J., Košťálová E., Šťastná S., Behúlová D., Šalingová A., Kolníková M.: Laboratory diagnosis of guanidinoacetate methyltransferase deficiency by tandem mass spectrometry, 18th International Mass Spectrometry Conference, Brémy, Německo (2009)
6. **Bártl J.**, Chrastina P., Horník P., Pinkasová R., Hladíková J., Koubíková H., Šťastná S., Kožich V.: Expanded neonatal screening of inherited metabolic disorders by tandem mass spectrometry in the Czech Republic: Results of 6 months period in one center, Annual Symposium of the Society of Inborn Errors of Metabolism, Istanbul, Turecko (2010)

7. **Bártl J.**, Hornik P., Krijt J., Šebesta I.: Laboratory diagnostics of adenosindeaminase (ADA) deficiency by HPLC, 36th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Budapešť, Maďarsko (2011)

Příloha IV

Potvrzení účasti

1. Nesměrák K, Doležal R, Hudská V, **Bártl J**, Štícha M, Waisser K. Quantitative structure-electrochemistry relationship of 1-phenyl-5-benzyl-sulphanyltetrazoles and their electrooxidation as a metabolic model. *Electroanalysis*. 2010; 22:17–18,2117–2122. (IF 2.721) ~ **30%**
2. Stibůrková B, Krijt J, Vyleťal P, **Bártl J**, Gerhatová E, Kořínek M, Šebesta I. Novel mutations in xanthine dehydrogenase/oxidase cause severe hypouricemia: Biochemical and molecular genetic analysis in two Czech families with xanthinuria type I. *Clinica Chimica Acta* 2012;413:93-9. (IF 2.850) ~ **50%**
3. Šebesta I, Stibůrková B, **Bártl J**, Ichida K, Hosoyamada M, Taylor J, Marinak A. Diagnostic tests for primary renal hypouricemia. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* 2011;30:1112-6. (IF 0.899) ~ **50%**
4. **Bártl J**, Chrastina P, Krijt J, Hodík J, Pešková K, Kožich V. Simultaneous determination of cystathionine, total homocysteine, and methionine in dried blood spots by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its utility for the management of patients with homocystinuria. *Clinica Chimica Acta* (IF 2.669) ~ **80%**
5. Mráz M, Olha H, **Bártl J**, Dolezel Z, Marinaki A, Fairbanks L, Stiburkova B. Modern diagnostic approach to Hereditary Xanthinuria. *Clinica Chimica Acta* (IF 2.669) ~ **50%**

Potvrzují, že procentuální účast Mgr. Josefa Bártla u výše zmíněných publikací odpovídá uvedeným hodnotám.

V Praze, 10.6. 2014

Ing. et Mgr. Blanka Stibůrková, Ph.D.