

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

**Katedra analytické chemie**

Studijní Program: Analytická chemie



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

Autoreferát disertační práce

Praha, 2014

Mgr. Josef Bárta

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

## 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 data o koncentracích cystathioninu v suché krevní kapce, která nebyla dosud publikována.

# Obsah

ABSTRAKT .....	3
Obsah.....	4
Seznam použitých zkratk a symbolů.....	5
1 Úvod .....	6
1.1 Dědičné metabolické poruchy.....	6
1.2 Laboratorní diagnostika.....	6
2 Cíl práce .....	8
3 Experimentální část .....	9
4 Výsledky a diskuse .....	10
4.1 Laboratorní diagnostika dědičné xanthinurie pomocí HPLC .....	10
4.1.1 Stanovení purinových metabolitů .....	10
4.1.2 Allopurinolový test .....	13
4.1.3 Stanovení aktivity xanthindehydrogenasy v plazmě .....	14
4.2 Stanovení markerů metabolismu homocysteinu metodou LC-MS/MS.....	16
4.2.1 Optimalizace a validace metody.....	16
4.2.2 Porovnání výsledků.....	18
4.2.3 Aplikace metody v praxi .....	18
5 Závěr .....	20
Použitá literatura .....	22
Příloha: Životopis.....	23

## Seznam použitých zkratek a symbolů

CBS	cystathionin beta-syntasa
CV	variační koeficient (Coefficient of Variation)
Cysta	cystathionin
DBS	suchá krevní kapka (Dried Blood Spot)
DDT	dithiotreitol
DMP	dědičné metabolické poruchy
GC	plynová chromatografie (Gas Chromatography)
Hcy	homocystein
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (High Performance Liquid Chromatography)
HPX	hypoxanthin
IXP	isoxanthopterin
LC	kapalinová chromatografie (Liquid Chromatography)
LC-MS/MS	kapalinová chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (Liquid Chromatography - Tandem Mass Spectrometry)
LOQ	limit kvantifikace (Limit of Quantitation)
Met	methionin
MRM	monitorování vybraných reakcí (Multiple Reaction Monitoring)
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie (Tandem Mass Spectrometry)
NS	novorozenecký screening (Newborn Screening)
tHcy	celkový homocystein (total Homocysteine)
TLC	tenkovrstvá chromatografie (Thin-Layer Chromatography)
UV	ultrafialová oblast spektra (ultraviolet)
XAN	xanthin
XDH	xanthindehydrogenasa
$\lambda$	vlnová délka

# 1 Úvod

## 1.1 Dědičné metabolické poruchy

Dědičné metabolické poruchy (DMP) jsou heterogenní soubor zhruba 800 vzácných onemocnění, vyskytující se v kumulativní incidenci 1:800 narozených dětí<sup>1</sup>. Jsou důsledkem vrozené genetické mutace, která vede k poruše funkce některého enzymu nebo strukturálního či transportního proteinu v organismu<sup>2</sup>. Následkem toho se v daném místě hromadí substrát daného enzymu či jeho patologický metabolit a produkt je naopak v koncentraci snižené. 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 dětí<sup>3</sup>. Včasná diagnostika těchto poruch je klíčová pro jejich léčbu a většinou rozhoduje o míře poškození pacienta. Studium patogenese 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.

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 se pro tyto účely využívá technologie tandemové hmotnostní spektrometrie (MS/MS)<sup>4</sup>. 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 kapky<sup>5</sup>.

## 2 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 vzorku suché krevní kapky nebo plazmy a přispěla tak k detekci pacientů s homocystinurií.



### 3 Experimentální část

Analýzy purinů a pyrimidinů byly realizovány na kapalinovém chromatografu firmy Waters (Alliance 2695) s detektorem diodového pole (2998) s použitým rozsahem vlnových délek od 235 – 305 nm. Data byla zpracována pomocí programu Empower (Waters, USA).

Pro stanovení pterinů byl použit kapalinový chromatograf společnosti Shimadzu (UFLC LC-20AD) s fluorimetrickým detektorem (RF-20Axs). Data byla zpracována s využitím programu LabSolutions (Shimadzu, Japonsko).

Pro analýzu homocysteinu, methioninu a cystathioninu byla použita kapalinová chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií na bázi trojitého kvadrupólu s ionizací elektrosprejem. Separační HPLC modul byl od firmy Agilent Technologies, USA (Infinity 1290) a hmotnostní spektrometr od firmy AB SCIEX, Framingham, USA (API 4000). Data byla sbírána a procesována v programu Analyst (AB Sciex).

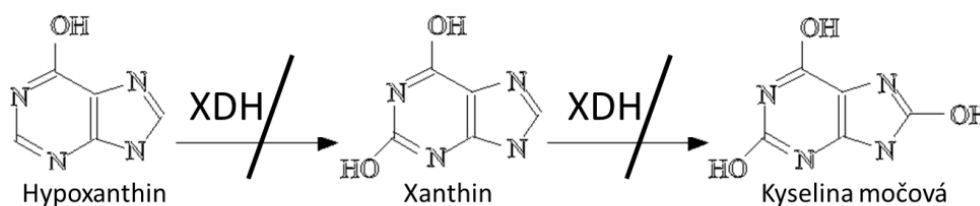
## 4 Výsledky a diskuse

### 4.1 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 disertační práci v příloze I.

#### 4.1.1 Stanovení purinových metabolitů

Prvním krokem v laboratorní diagnostice xanthinurie byla kvantifikace klíčových biomarkerů xantinu (XAN) a hypoxanthinu (HPX) v moči a plazmě. Tyto metabolity jsou u pacientů s xanthinurií vylučovány do krve a moči ve zvýšené koncentraci v důsledku špatné funkce enzymu xanthindehydrogenasy (XDH), pro který jsou substrátem (Obr.4.1).

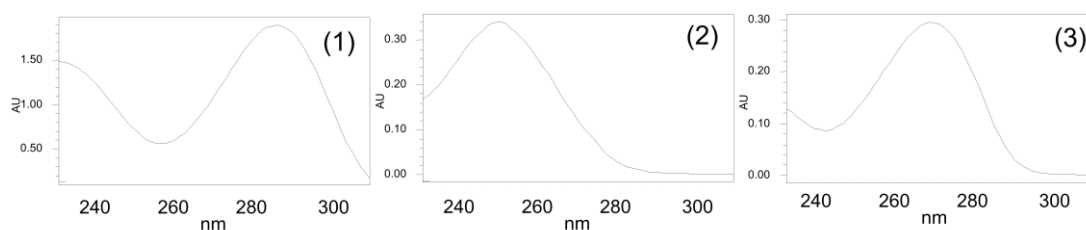


**Obr. 4.1** Metabolická přeměna HPX a XAN na kyselinu močovou za přítomnosti enzymu XDH.

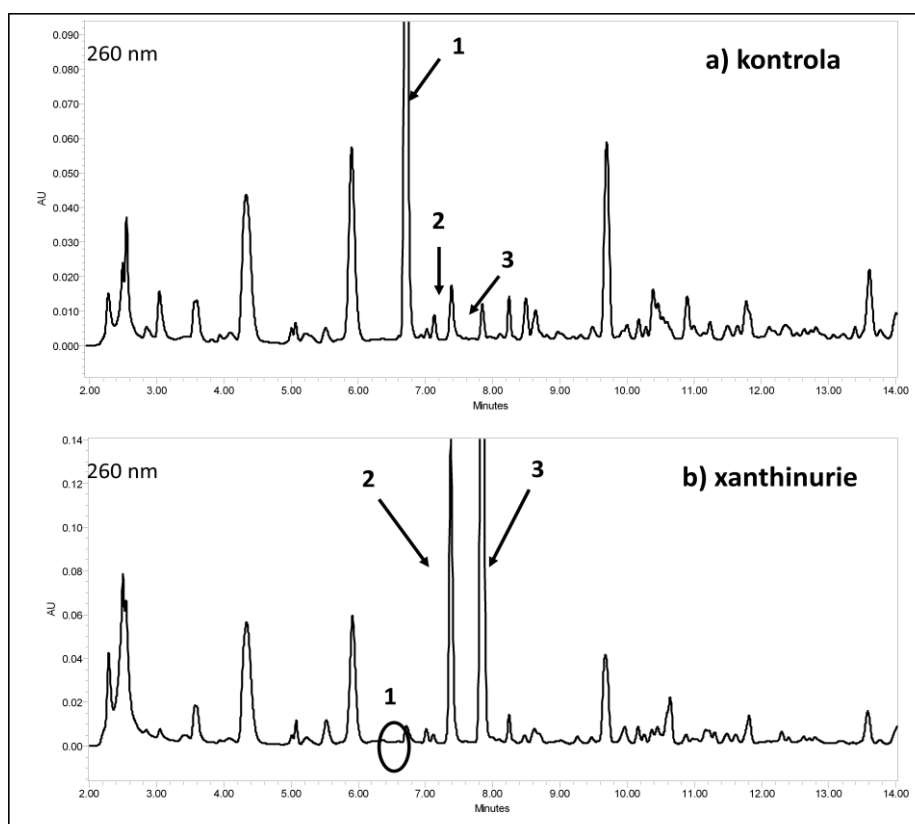
Stanovení bylo provedeno metodou HPLC s UV detekcí. Separace byla realizována na chromatografické koloně ProntoSIL 120-3-C18 AQ (200×4 mm, 5 μm, Biscoff) za použití gradientové eluce vodního roztoku octanu amonného a acetonitrilu při pH 4,8. Pro identifikaci analytů byla použita informace o jejich retenčním čase a zároveň byly s knihovnou standardů porovnány profily UV spekter získaných v rozmezí 235 – 305 nm (Obr.4.2). Kvantifikace byla provedena pomocí kalibrační křivky v rozsahu koncentrací od 1 do 200 μmol/l. V rámci validace metody byl stanoven limit kvantifikace (LOQ) pro oba analyty na 1 μmol/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 μmol/l a 100 μmol/l). Pro klinické účely bylo nadefinováno referenční rozmezí obou analytů v moči a plazmě. Bylo změřeno vylučování HPX a XAN u 100 vzorků močí

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 případě 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 charakteristická absence píku kyseliny močové (Obr.4.3).



**Obr. 4.2** 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. 4.3** Separace HPX a XAN v moči metodou HPLC s UV detekcí ( $\lambda = 260 \text{ nm}$ ) na koloně Prontosil 120-3-C18 AQ 200 $\times$ 4 mm, 5  $\mu\text{m}$  u fyziologické kontroly (a) a u pacienta s xanthinurií (b). Označení píku: (1) kyselina močová, (2) HPX, (3) XAN.

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.4.1).

**Tab. 4.1**

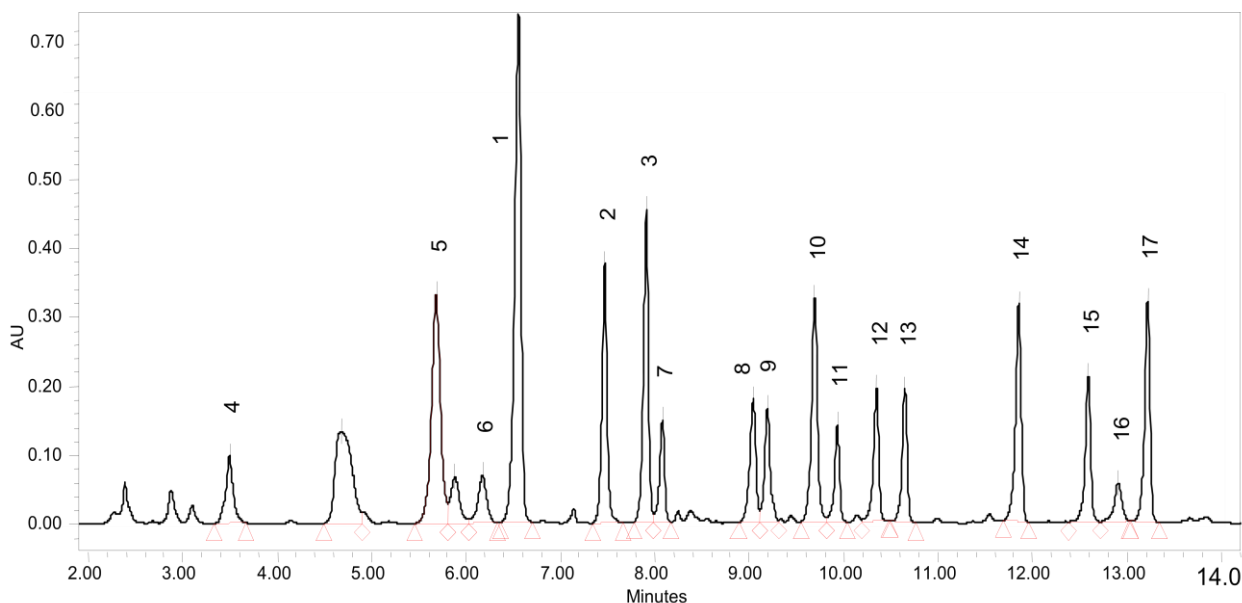
Enzymové defekty spojené s metabolismem purinových a pyrimidinových derivátů s diagnosticky významnými metabolity.

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 piků či dokonce záměna elučního pořadí. Pro některé analýzy je vhodné zvolit pH tak, aby došlo k separaci analytů od interferujících látek. Na základě retenčního času a charakteristického profilu UV spektra bylo

možné píky identifikovat a při kvantifikaci odečítat jejich plochy v absorpčních maximech ( $\lambda_{max}$ ) (Obr.4.4).



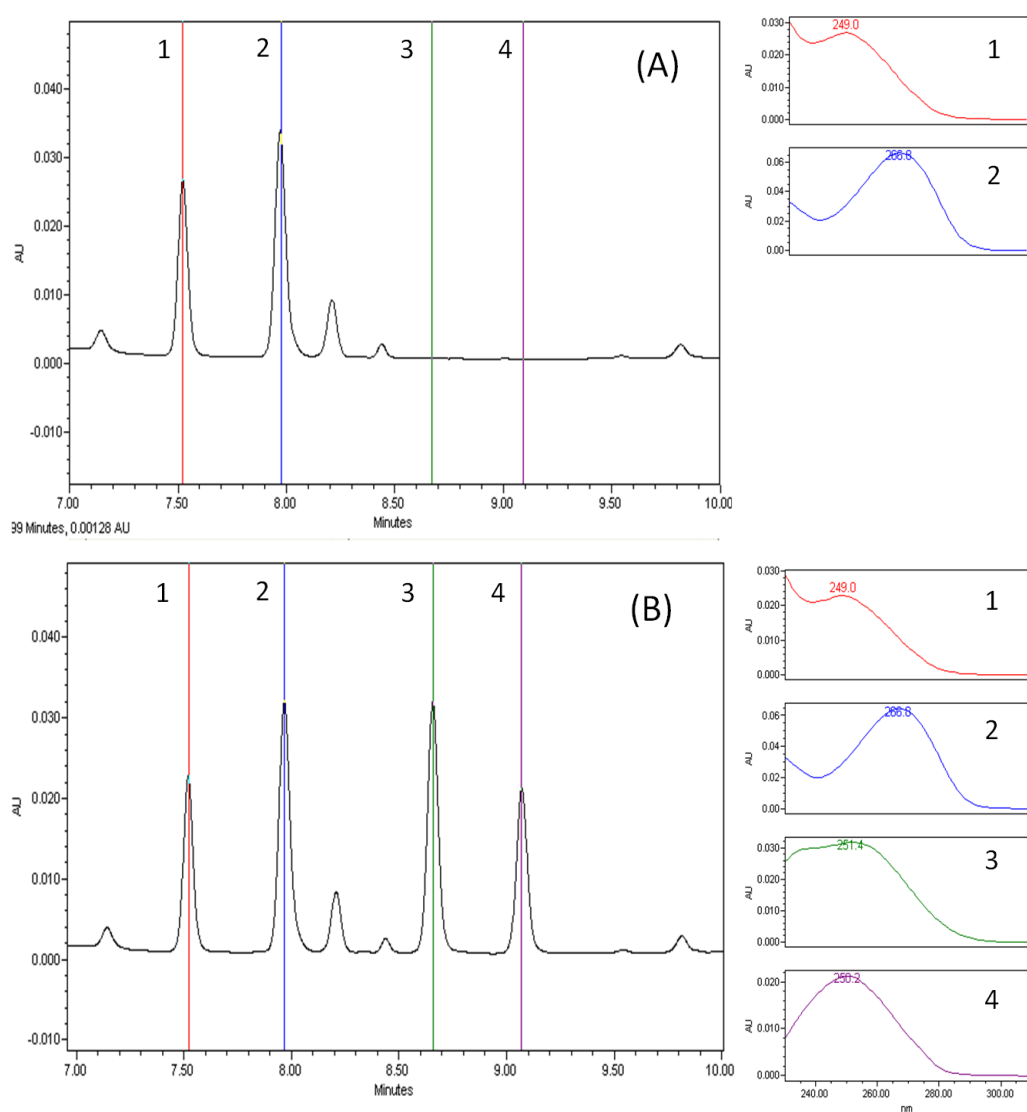
**Obr. 4.4** Separace směsi standardů purinových a pyrimidinových analytů v moči na koloně ProntoSil 120-3-C18 AQ 200×4 mm, 5  $\mu$ m. Složení mobilní fáze: (A) 40 mM octan amonný (pH 4,8); (B) Acetonitril; lineární gradient 0-30% (B) v 15 minutách; průtok 0,7 ml/min;  $\lambda = 260$  nm; označení píků: (1) kyselina močová, (2) HPX, (3) XAN, (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.

#### 4.1.2 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 4.1.1. Kvantifikace byla realizována jednobodovou kalibrací na externí standard oxypurinolu o koncentraci 20  $\mu\text{mol/l}$ .



**Obr. 4.5** HPLC analýza plazmy před podáním (A) a po podání (B) allopurinolu ( $\lambda = 250 \text{ nm}$ ); označení píku: (1) HPX, (2) XAN, (3) oxypurinol,  $\lambda_{\text{max}} = 251,4 \text{ nm}$  (4) allopurinol,  $\lambda_{\text{max}} = 250,2 \text{ nm}$ .

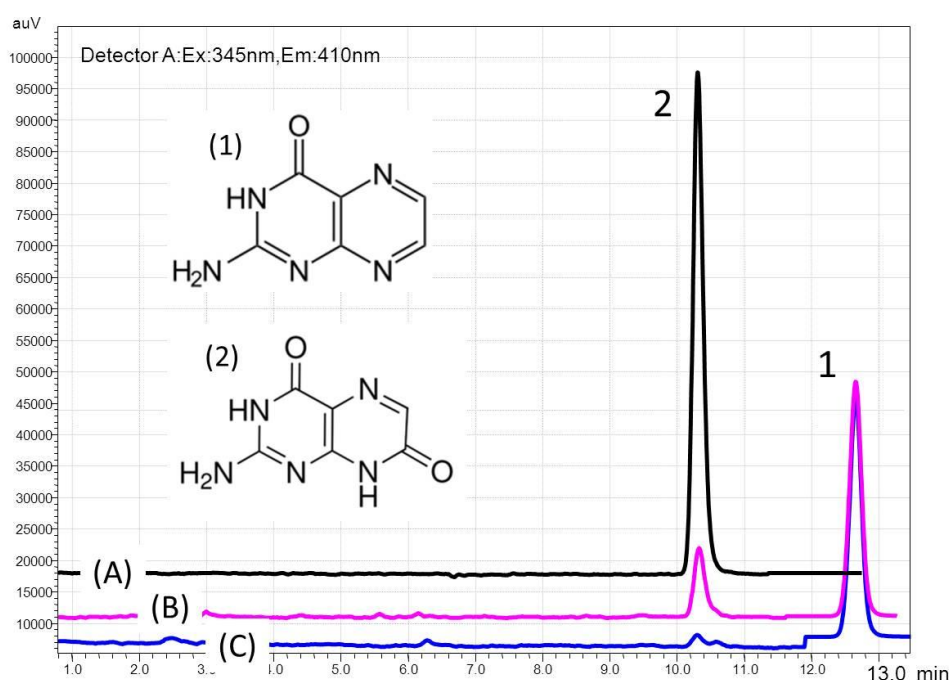
Prokázána přítomnost oxypurinolu v plazmě po podání allopurinolu (3 respektive 19  $\mu\text{mol/l}$ ) byla u obou pacientů důkazem správné enzymatické funkce aldehydoxidasu a klasifikovala poruchu jako xanthinurii typ I.

#### 4.1.3 Stanovení aktivity xanthindehydrogenasy v plazmě

Vyšetření na enzymatické 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 °C) kvantifikován IXP a na základě vzniklého množství produktu se dala posoudit případná insuficience enzymu. Analýza 20 µl produktu probíhala na HPLC za použití fluorimetrického detektoru 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).

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.4.6.



**Obr. 4.6** 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.

## 4.2 Stanovení markerů metabolismu homocysteinu metodou LC-MS/MS

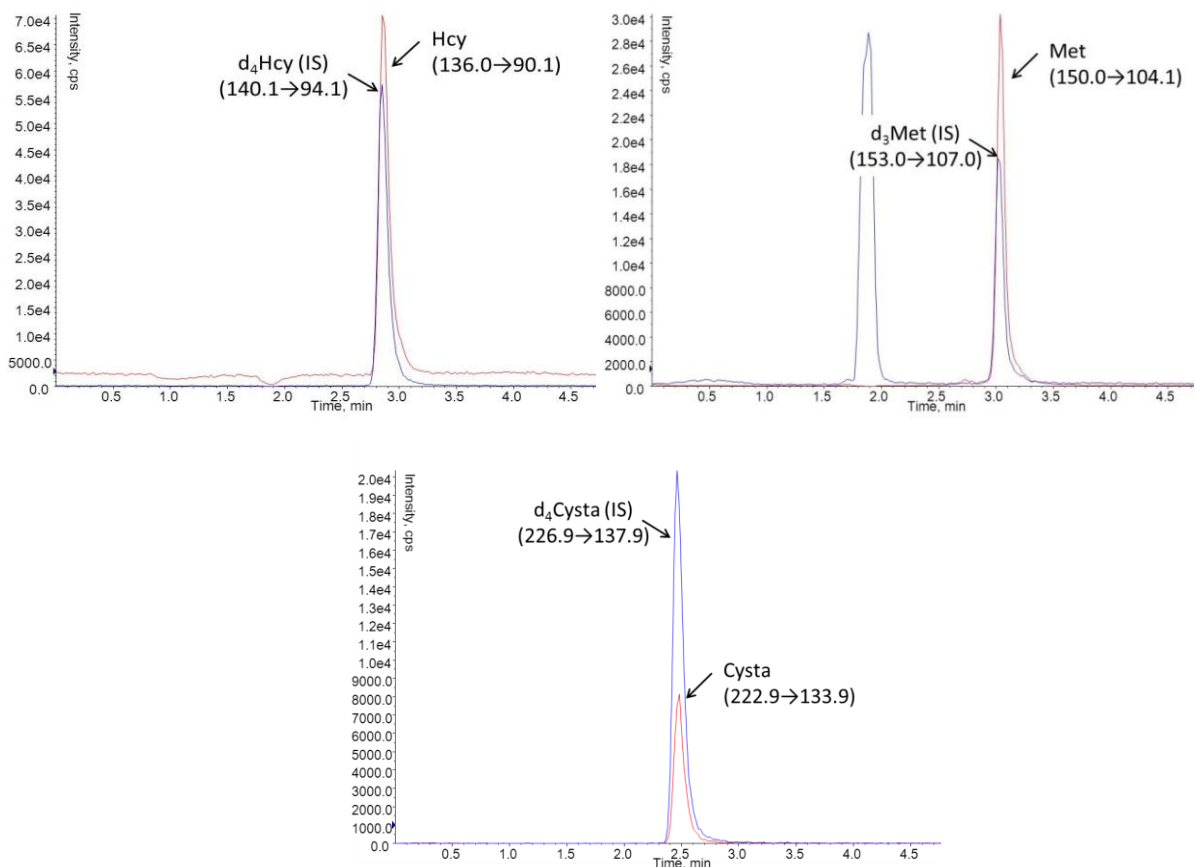
Tato část disertační práce se zabývá vývojem LC-MS/MS metody pro kvantifikaci klíčových markerů poruch metabolismu homocysteinu. Cílem bylo na základě koncentračního zastoupení celkového homocysteinu (tHcy), methioninu (Met) a cystathioninu (Cysta) v suché krevní kapce (DBS) diagnostikovat pacienty s 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 disertační práci v příloze II.

### 4.2.1 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-d<sub>8</sub>, Met-d<sub>3</sub> a Cysta-d<sub>4</sub> s redukcí pomocí 500 mmol/l DTT.

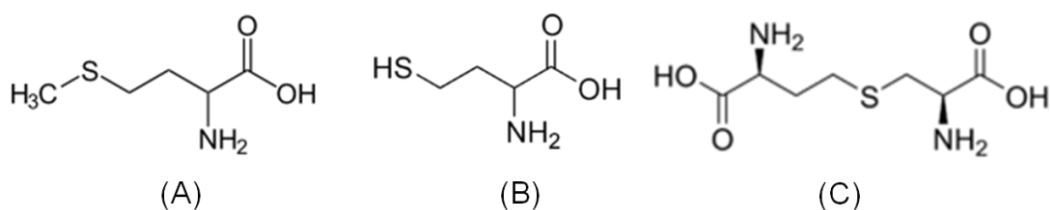
Analýza byla realizována pomocí HPLC (Agilent 1290) ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (AB Sciex, API 4000) s ionizací elektrosprejem v pozitivním modu. Chromatografická separace probíhala na koloně SunFire C8 3,5 μm, 4,6 x 100 mm (Waters) při laboratorní teplotě za použití izokratické 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.4.7.





**Obr. 4.7** Extrahované MRM chromatogramy Hcy, Met a Cysta a jejich interních značených standardů (vzorek DBS – tHcy 80  $\mu\text{mol}$ /, Met 120  $\mu\text{mol}$ /, a Cysta 10  $\mu\text{mol}$ /).

Separční podmínky: kolona SunFire C8 3,5  $\mu\text{m}$ , 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  $\mu\text{l}$ .



**Obr. 4.8** 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. 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 případě Cysta se jedná o unikátní data, která nebyla doposud publikována.

#### 4.2.2 Porovnání výsledků

Výsledky koncentrací jednotlivých metabolitů v DBS byly porovnány se vzorky plazmy odebranými ve stejný čas a měřeními třemi různými konvenčními metodami. Komparativní studie zahrnovala několik desítek vzorků s širokou škálou koncentrací. 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 erythrocytech 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  $\mu\text{l}$  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.

#### 4.2.3 Aplikace metody v praxi

Nově vyvinutá a zvalidovaná metoda byla aplikována ve třech oblastech klinické praxe: 1) Jako konfirmační druhostupňový test koncentrace tHCY (tzv. „second-tier testing“) pro NS monitorující poruchy metabolismu methioninu. V rámci pilotní fáze rozšíření NS v České Republice (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 transsulfurační (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.

## 5 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 remetylační 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.

## Použitá 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.

## **Příloha: Životopis**

### Osobní údaje

Jméno	Josef Bártl
Datum narození	15.5.1981
Místo narození	Vlašim
Adresa	Na Chmelnici 1255, Benešov
Email	josef.bartl@email.cz

### Vzdělání

1995-1999

Masarykova střední škola chemická

2000-2005

Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, obor: Klinická a toxikologická analýza

Od roku 2006

Kombinovaná forma postgraduálního studia na Přírodovědecké fakultě Univerzity Karlovy v Praze, obor: Analytická chemie, téma disertační práce: „Využití HPLC a LC-MS/MS metod v diagnostice dědičných metabolických poruch“

### Zaměstnání

Od roku 2005

Ústav dědičných metabolických poruch, Všeobecná fakultní nemocnice a 1. LF UK v Praze, Ke Karlovu 2, Praha 4.

### Vědecké zaměření

Diagnostika dědičných metabolických poruch na úrovni metabolitů a enzymů z různých biologických materiálů se zaměřením na metabolismus purinů a aminokyselin.

Vývoj, validace a aplikace chromatografických technik. Specializace na HPLC a LC-MS/MS systémy.

## Řešené granty

Interní grantová agentura (IGA) Ministerstva zdravotnictví ČR s názvem: „Optimalizace novorozeneckého screeningu dědičných metabolických poruch“. Pozice: Vývojový analytik - vývoj, validace a aplikace FIA-MS/MS a LC-MS/MS metod pro optimalizaci a rozšíření novorozeneckého screeningu v ČR. Doba řešení: 2011-2013

## Zahraniční pobyt

14denní pobyt v Biochemical Genetics Laboratory, Mayo Clinic, Rochester (MN) USA, zpracování biologických vzorků, jejich analýza pomocí LC-MS/MS systémů a interpretace výsledků.

## Kurzy

9. ročník Školy hmotnostní spektrometrie, 22.-26. 9. 2008, Seč, ČR

Kurz pro mladé vědce v oblasti laboratorní diagnostiky dědičných metabolických poruch, Society for the Study of Inborn Errors of Metabolism Academy, 3.- 6.10.2010, Manchester, UK (přednáška: „Combined Adenine Phosphoribosyltransferase (APRT) and N-acetylgalactosamine-6-sulfate Sulfatase Deficiency (MPS IVA): laboratory diagnostics“)

12. ročník Školy hmotnostní spektrometrie, 12.-16. 9. 2011, Srní, ČR

Region4Genetics Training Program, Newborn Screening by MS/MS, 7.-11.5.2012, Biochemical Genetics Laboratory, Mayo Clinic, Rochester (MN) USA

Training for AB Sciex LC-MS/MS systems, 14.-16.5.2013, Darmstadt, Německo

## Publikace

1. Nesměrák K, Doležal R, Hudská V, **Bártl J**, Štícha M, Waisser K. Quantitative structure-electrochemistry relationship of 1-phenyl-5-benzyl-sulphonyltetrazaoles 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)

### Postery

1. **Bártl J**, Chrastina P., Šťastná S., Košařová M., Elleder M., Zeman J.: Tandem mass spectrometry in newborn screening of inherited metabolic disorders, 17<sup>th</sup> 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 spektrometry, 18<sup>th</sup> International Mass Spectrometry Conference, Brémy, Německo (2009)

6. **Bártl J.**, Chrastina P., Hornik 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, 36<sup>th</sup> International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques, Budapešť, Maďarsko (2011)

### Učební texty

Sborník odborných a studijních textů

Šťastná Sylvie et al.

Přehled vyšetření metabolitů pro diagnostiku dědičných metabolických poruch. 1. vydání. Praha: Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha, 2008. 92 stran.

ISBN 978-80-904219-0-5

Kapitoly:

Kapalinová chromatografie (**Bártl J.**, Krijt J.); Guanidinoacetát, kreatin a kreatinin (Košťálová E., **Bártl J.**, Šťastná S.); Homocystein celkový (**Bártl J.**, Kožich V.); Kyselina orotová (Košťálová E., **Bártl J.**, Šťastná S., Chrastina P.); Mukopolysacharidy (Šťastná S., Chrastina P., **Bártl J.**, Košťálová E.); Purina a pyrimidiny (**Bártl J.**, Košťálová E., Šťastná S., Chrastina P.); Siřičitany (**Bártl J.**, Košťálová E., Šťastná S.); Thiosířany (**Bártl J.**, Košťálová E., Šťastná S.)