

Vanillaktična kiselina i vanilmandelična kiselina - novi biomarkeri u dijagnostici manjka aktivnosti dekarboksilaze aromatskih L-aminokiselina

Polić, Monika

Master's thesis / Diplomski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:649496>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-11**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Monika Polić

**Vanillaktična kiselina i vanilmandelična kiselina -
novi biomarkeri u dijagnostici manjka aktivnosti
dekarboksilaze aromatskih L-aminokiselina**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2023.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u KBC Zagreb na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije pod stručnim vodstvom prof. dr. sc. Ksenije Fumić spec. medicinske biokemije i laboratorijske medicine.

Zahvaljujem dragoj mentorici, prof. dr. sc. Kseniji Fumić na pruženoj prilici, korisnim savjetima, poticaju te svom uloženom vremenu.

Zahvaljujem Ivi Bilandžiji Kuš, spec. medicinske biokemije i laboratorijske medicine na pomoći i savjetima u svladavanju svih nedoumica tijekom izvođenja ovoga rada.

Hvala mojoj obitelji, mami, tati i bratu te svim dragim prijateljima i prijateljicama na pruženoj podršci i ljubavi jer bez vas ovo ne bi bilo moguće. Hvala vam za sve.

SADRŽAJ

1. UVOD	3
1.1. NASLJEDNI METABOLIČKI POREMEĆAJI	3
1.1.1. Laboratorijska dijagnostika nasljednih metaboličkih poremećaja	4
1.1.1.1. Sustavno traganje (novorođenački probir)	4
1.1.1.2. Selektivno traganje	5
1.1.2. Organske kiseline i dijagnostika organskih kiselina	5
1.2. DEKARBOKSILAZA AROMATSKIH L-AMINOKISELINA	6
1.2.1. Struktura i mehanizam dekarboksilaze aromatskih L-aminokiselina (AADC)	6
1.2.2. Regulacija enzima AADC	8
1.3. MANJAK AKTIVNOSTI DEKARBOKSILAZE AROMATSKIH L-AMINOKISELINA (AADC)	9
1.3.1. Klinička slika	9
1.3.2. Dijagnostika	10
1.3.3. Nasljeđivanje	12
1.3.4. Liječenje	13
1.4. PLINSKA KROMATOGRAFIJA – SPEKTROMETRIJA MASA (GC-MS)	13
1.4.1. Plinski kromatograf	14
1.4.2. Spektrometar masa	15
1.4.2.1. Ionski izvor	16
1.4.2.2. Analizator masa	17
1.4.2.3. Snimanje spektra i praćenje odabranih iona	18
1.4.3. Vakuum sustav	18
2. CILJ RADA	19
3. MATERIJALI I METODE	20
3.1. NAČELO POSTUPKA	20
3.1.1. Primarni uzorak	20

3.2. ODREĐIVANJE ORGANSKIH KISELINA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM-SPEKTROMETRIJOM MASA	20
3.2.1. Reagensi	20
3.2.2. Otopine i supstance prikladne čistoće za kromatografiju	21
3.2.3. Priprema otopina	21
3.2.4. Faze postupka	22
3.2.4.1. Predanalitička faza	22
3.2.4.2. Analitička faza	22
3.2.4.3. Poslijeanalitička faza	24
3.3. Plinski kromatograf-spektrometar masa	24
3.3.1. Načelo rada instrumenta	24
3.4. Statističke metode	24
4. REZULTATI	25
5. RASPRAVA	38
6. ZAKLJUČCI	40
7. POPIS KRATICA	41
8. POPIS LITERATURE	43
9. SAŽETAK	46
10. SUMMARY	47

1. UVOD

1.1. NASLJEDNI METABOLIČKI POREMEĆAJI

Nasljedni metabolički poremećaji odnose se na različite vrste medicinskih stanja uzrokovanih genetskim promjenama, najčešće naslijeđenima od oba roditelja, koji ometaju metabolizam organizma (www.mayoclinic.org). Kao pojam u medicinu ga je uveo Garrod 1909. godine opisujući klinički sliku alkaptonurije, albinizma, pentozurije i cistinurije. Prevalencija im je jednaka ili manja od 1:2000 ili 5:10000. Smatra se da 6-8% europske populacije boluje od nasljednih metaboličkih bolesti. Nasljedni metabolički poremećaji uzrokovani su mutacijama jednog gena (monogenske bolesti). Većinom se nasljeđuju prema Mendelovim zakonima, recesivno ili dominantno, autosomno ili X-vezano. Mali broj se nasljeđuje mitohondrijskim nasljeđivanjem. Do danas je poznato više od 6000 monogenskih nasljednih bolesti, njih više od 500 su nasljedne metaboličke bolesti kod kojih su poznati biokemijski mehanizmi nastanka koji mogu objasniti patogenezu. Posljedica mutacije je nedostatna sinteza ili sinteza nefunkcionalnog proteina, tj. enzima. Zbog toga dolazi do promjene metaboličkih puteva uzrokujući nakupljanje supstrata i aktiviranje sporednih metaboličkih mehanizama koji dovode do nakupljanja nastalih produkata. S obzirom da su mogućnosti mutacija na proteinima iznimno velika, postoje raznovrsne promjene funkcije proteina koje uzrokuju širok spektar promjena na biokemijskoj razini, a sve to uzrokuje veliku varijabilnost samih kliničkih slika.

Incidencija nasljednih metaboličkih poremećaja je razmjerno niska, najmanje 1% sve novorođene djece i mogu se pojaviti u bilo kojem životnom razdoblju. Kod nekih populacija izuzetno su česte, npr. Gaucherova bolest u Aškenazi Židova ima prosječnu učestalost od 1:1500, a u ostalim populacijama je inače 1:60000 živorođene djece.

U većini nasljednih metaboličkih poremećaja ne postoji korelacija između fenotipa i genotipa pa poznavanje pojedinih mutacija ne daje informaciju o očekivanom tijeku bolesti. Pravodobno kliničko prepoznavanje, kao i laboratorijska potvrda dijagnoze, preduvjet su uspješnog liječenja. Rano otkrivanje osigurano je za poremećaje koji su uvršteni u nacionalne programe novorođenačkog probira. U rijetkim slučajevima nasljednih metaboličkih bolesti liječnik može već iz anamneze i kliničke slike naslutiti dijagnozu, no moguće je da liječnika na dijagnozu upute i nalazi osnovnih laboratorijskih pretraga (povećanje ili manjak aktivnosti

određenih enzima, urata, kolesterola, triglicerida i slično). U najvećem broju nasljednih metaboličkih poremećaja, klinička slika nije dovoljna jer su simptomi i znakovi nespecifični. U identifikaciji dijagnoze pomažu i anamneza i obiteljski status. Simptomi nasljednih metaboličkih poremećaja variraju ovisno o stanju. Neki od simptoma mogu biti: kašnjenje u rastu i razvoju, gubitak tjelesne mase, poremećaj rasta, napadaji, nizak apetit i smanjena razina energije, neuobičajeni mirisi urina, znoja ili daha, bolovi u abdomenu te brojni drugi.

Za bolesti koje se očituju naglo i/ili metaboličkom krizom je vjerojatnije da se mogu pripisati poremećajima metabolizma malih molekula kao što su aminokiseline, organske kiseline ili monosaharidi. Također, isto vrijedi i za naglo pogoršanje kronične bolesti, uz moguće iznimke. Tijek bolesti u bolesnika s poremećajem metaboličkih puteva vezanih uz pojedine stanične organele mogu utjecati na bolesnikovo opće stanje ili funkciju određenog organa ili tkiva u toj mjeri da i neka infekcija može uzrokovati metaboličku krizu. Akutno pogoršanje nekog kroničnog poremećaja nije karakteristični pokazatelj da se radi o poremećaju metabolizma malih molekula.

Nakon postavljene kliničke sumnje potrebna je daljnja specifična klinička obrada bolesnika. Važne nalaze daju slikovne pretrage mozga, , oftalmološke pretrage i druge specijalističke pretrage. Usporedno se provodi i metabolička laboratorijska dijagnostika (Čvorišćec i sur., 2009).

1.1.1. Laboratorijska dijagnostika nasljednih metaboličkih poremećaja

Prema načinu organizacije i pristupu laboratorijskoj dijagnostici razlikuju se sustavno i selektivno traganje za nasljednim metaboličkim poremećajima.

1.1.1.1. Sustavno traganje (novorođenački probir)

Sustavno traganje podrazumijeva ispitivanje cjelokupne populacije novorođenčadi neke zemlje ili regije na nasljedne metaboličke poremećaje koje je moguće liječiti, a klinički se ne mogu prepoznati dovoljno rano. Bolesti uključene u programe novorođenačkog probira razlikuju se među zemljama. Laboratorijska dijagnostika najčešće je organizirana da jedan laboratorij pokriva područje neke regije ili države. Laboratorij prima uzorke suhe kapi krvi na filter-papiru iz svih rodilišta tog područja. U sustavno traganje mogu biti uključene

fenilketonurija, kongenitalna hipotireoza, galaktozemija, leucinoza, homocistinurija, cistična fibroza i dr. Da bi neka bolest ušla u nacionalni program novorođenačkog probira, mora zadovoljiti sljedeće uvjete: dovoljno visoka učestalost u populaciji, nemogućnost rane kliničke dijagnoze, mogućnost liječenja nakon ranog otkrivanja, postojanje odgovarajućeg testa ili pretrage i povoljan odnos troškova prema ekonomskoj koristi ranog otkrivanja (Čvorišćec i sur., 2009).

1.1.1.2. Selektivno traganje

Selektivno traganje za nasljednim metaboličkim poremećajima podrazumijeva laboratorijsku obradu simptomatskih bolesnika. Liječnici kao putokaz koriste karakteristične elemente anamneze, statusa i osnovnih laboratorijskih pretraga koje upućuju na postojanje nasljednog metaboličkog poremećaja. Poznavanje tih čimbenika nužno je i u metaboličkom laboratoriju, jer omogućuje racionalan odabir specijalističkih pretraga, kao i pravilnu interpretaciju dobivenih nalaza. Laboratoriji za selektivno traganje za nasljednim metaboličkim poremećajima trebaju biti u mogućnosti provoditi osnovne i specijalističke metaboličke pretrage. Velik broj laboratorijskih pretraga još nije standardiziran, nego se svaki laboratorij koristi svojom metodom, tzv. *in-house metode*. U laboratorijskoj dijagnostici nasljednih metaboličkih poremećaja za interpretaciju nalaza često je presudno poznavanje predanalitičkih čimbenika (vrijeme uzimanja uzorka, prehrana bolesnika, terapija koju bolesnik uzima u vrijeme uzorkovanja i dr.). Većina metaboličkih testova i pretraga je kvantitativna i njihova se medicinska procjena temelji na odstupanju od referentnih intervala. Pritom se mora paziti na to da interpretacija metaboličkih nalaza bude u skladu s drugom dijagnostičkom obradom i kliničkom slikom (Čvorišćec i sur., 2009).

1.1.2. Organske kiseline i dijagnostika organskih kiselina

Organske kiseline su spojevi s jednom ili više karboksilnih ili kiselih fenolnih skupina koje ne sadržavaju bazične amino-skupine, ne reagiraju s ninhidrinom i dobro su topljive u vodi. Mogu sadržavati različite funkcionalne skupine – hidroksilne, keto, amidne, aromatske, tiolne i nezasićene alifatske.

Poremećaji organskih kiselina mogu nastati u intermedijarnom metabolizmu aminokiselina, neurotransmitora, kolesterola, masnih kiselina i dr. Većinom su uzrokovani nasljednim manjkom enzima, no mogu biti i stečeni. Spojevi koji se izlučuju mogu biti normalni intermedijari metabolizma čija se prisutnost ne može dokazati u mokraći zdrave osobe (ili se izlučuje u tragovima) ili su to metaboliti nastali alternativnim metaboličkim putevima zbog bloka u glavnom metaboličkom putu. Do sada je u mokraći poznato više od 250 organskih kiselina i konjugata glicina. Njihovi su poremećaji bitni za dijagnostiku više od 65 nasljednih metaboličkih poremećaja. Analizom organskih kiselina, ponajprije u mokraći, dobiva se uvid u fiziološki i patofiziološki status različitih metaboličkih puteva, kao i njihove međudnose.

Metode za analizu organskih kiselina razlikuju se među laboratorijima s obzirom na postupke izolacije, identifikacije i osjetljivosti. Metoda izbora za mjerenje organskih kiselina je plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (engl. *gas chromatography - mass spectrometry*, GC-MS) (Čvorišćec i sur., 2009).

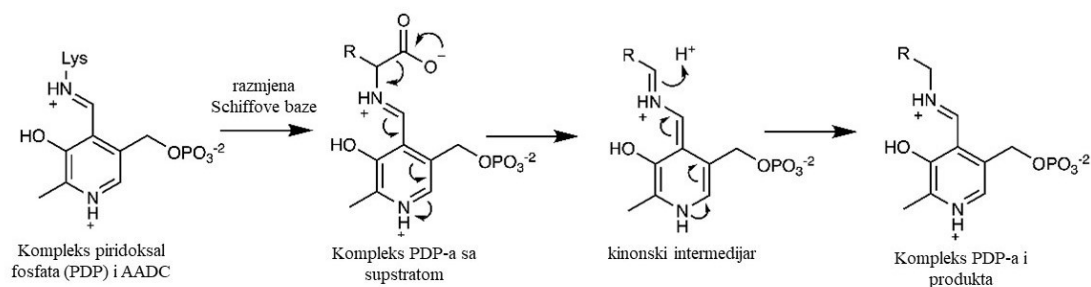
1.2. DEKARBOKSILAZA AROMATSKIH L-AMINOKISELINA

1.2.1. Struktura i mehanizam dekarboksilaze aromatskih L-aminokiselina (AADC)

Decarboksilaza aromatskih L-aminokiselina (engl. *aromatic L-amino acid decarboxylase*, AADC) je enzim koji opskrbljuje organizam esencijalnim neurotransmiterima. Iako ima malu specifičnost prema supstratima, glavna mu je uloga u kontroli razina aromatskih aminokiselina. AADC katalizira pretvorbu 5-hidroksitriptofana (5-HTP) i L-3,4-dihidroksifenilalanina (L-DOPA) u serotonin i dopamin (Allen, 2010).

AADC pripada obitelji alfa-aminotransferaza, točnije u subgrupu II alfa-dekarboksilaza. Mehanizam reakcije se temelji na kemijskim osobinama koenzima – piridoksil 5'-fosfata (PLP). AADC ima 480 aminokiselina u svojoj strukturi te je aktivna kao homodimer (Mr=54 kDa). Prije adicije piridoksil fosfatnog kofaktora, apoenzim postoji u otvorenoj konformaciji. Prilikom vezanja kofaktora, podjedinice se približavaju i zatvaraju aktivno mjesto. Ove konformacijske promjene rezultiraju aktivnim, zatvorenim holoenzimom (Bertoldi, 2014).

Glavna reakcija katalizirana AADC-om je dekarboksilacija aromatskih L-aminokiselina koja je shematski prikazana na Slici 1. Pirodoksal-5'-fosfat je ključan u mehanizmu dekarboksilacije AADC-om. U aktivnom enzimu, PLP je vezan na lizin-303 (engl. *lysine*, Lys) kao Schiffova baza. Prilikom vezanja supstrata, Lys-303 je istisnut supstratnim aminom. To pozicionira karboksilat supstrata unutar aktivnog mjesta te se on prvo dekarboksilira. Dekarboksilacijom supstrata nastaje kinonski intermedijar, koji se naknadno protonira kako bi nastala Schiffova baza PLP-a i dekarboksilirani produkt. Lys-303 onda može regenerirati početnu Schiffovu bazu, otpuštajući produkt dok zadržava kofaktor PLP. PLP je visoko reaktivan te može posredovati reakcijama kao što su oksidativna deaminacija, transaminacija, racemizacija i eliminacija, ali to sve u manjoj mjeri od dekarboksilacije. (Allen, 2010).



Slika 1. Mehanizam dekarboksilaze aromatskih L-aminokiselina (AADC) (preuzeto i prilagođeno s <https://www.wikimedia.org>)

AADC unutar mozga je lokalizirana unutar serotonergičkih i kateholaminergičkih neurona. Također je lokalizirana u centralnim noradrenergičkim neuronima kojima je potreban serotonin i dopamin. Periferna AADC ima djelovanje u bubrezima, jetri, plućima, gastrointestinalnom traktu (GIT) i plazmi. AADC smještena u enterokromafinskim stanicama gastrointestinalnog trakta odgovorna je za proizvodnju većine perifernog serotonina. Serotonin u GIT-u uključen je u kontroli peristaltike i sekrecije te poremećaj ove funkcije može uzrokovati neke od intestinalnih komplikacija primijećenih u pacijenata s manjkom aktivnosti AADC. Enterokromafinske stanice također otpuštaju serotonin u cirkulaciju gdje se skladišti u trombocitima te sudjeluje u trombocitnoj agregaciji i kontroli vaskularnog tonusa.

U bubrezima se AADC nalazi u proksimalnim tubulima nefrona i pretvara cirkuliranu ili filtriranu L-DOPA-u u dopamin. Renalni dopamin djeluje tako da inhibira transport Na^+ što dovodi do povećanja izlučivanja Na^+ (Allen, 2010).

AADC dekarboksilira sve aromatske L-aminokiseline uključujući L-triptofan, L-*p*-tirozin i L-fenilalanin. S obzirom na to da je AADC jedini enzim potreban za metabolizam većine amina u tragovima, vjerojatno je da su pri manjoj aktivnosti AADC amini u tragovima također učinkoviti, iako ta mogućnost nije istražena. Budući da je poznato da amini u tragovima pojačavaju neurotransmisiju dopamina i serotonina, moguće je da manjak amina u tragovima može imati sekundarni negativni učinak na signalizaciju monoamina (Allen, 2010).

1.2.2. Regulacija enzima AADC

AADC ima nekoliko konzerviranih mjesta za prepoznavanje protein kinaze A (PKA) i protein kinaze G (PKG), s ostacima S200, S336, S359 i još nekolicinom kao potencijalnim akceptorima fosfata. *In vitro* studije su potvrdile kako PKA i PKG mogu fosforilirati AADC uzrokujući porast aktivnosti enzima. Osim toga, antagonisti dopaminskih receptora povećavaju aktivnost AADC u modelima glodavaca, dok aktivacija nekih dopaminskih receptora potiskuje aktivnost AADC. Takva regulacija posredovana receptorima je dvofazna, s početnom kratkoročnom aktivacijom nakon koje slijedi dugotrajna aktivacija. Smatra se da se kratkoročna aktivacija nastavlja aktivacijom kinaze i naknadnom fosforilacijom AADC-a, dok osjetljivost dugoročne aktivacije na inhibitore prevođenja proteina sugerira regulaciju transkripcije mRNA.

Renalna AADC djelomično je regulirana dostupnošću L-DOPA-e te se tako može objasniti hiperdopaminurija u nekoliko pacijenata oboljelih od manjka aktivnosti AADC. S obzirom da se velika količina L-DOPA-e ne metabolizira zbog manjka aktivnosti AADC, izlučuje se bubregom u obliku dopamina i uzrokuje hiperdopaminuriju (Allen, 2010).

1.3. MANJAK AKTIVNOSTI DEKARBOKSILAZE AROMATSKIH L-AMINOKISELINA (AADC)

Manjak aktivnosti AADC je rijedak autosomno-recesivni poremećaj koji dovodi do teškog deficita serotonina i dopamina, kao i akumulacije 5-HTP i L-DOPA-e. To je primarni defekt neurotransmitera u biosintezi kateholamina i serotonina. Fenotip se sastoji od različitih stupnjeva neuroloških oštećenja, uključujući motoričke i neuromotoričke simptome. Pravovremeno postavljanje dijagnoze i početak terapije neophodni su za ishod liječenja, stoga su potrebni pouzdani dijagnostički biljezi. Povećane koncentracije vanilaktične kiseline (VLA) u analizi organskih kiselina u urinu mogu biti posljedica manjka aktivnosti AADC. Međutim, koncentracija VLA u pacijenata s manjkom aktivnosti AADC može biti granično povećana ili na gornjoj granici referentnog intervala što bitno otežava tumačenje nalaza organskih kiselina u urinu i postavljanje sumnje na manjak aktivnosti AADC-a. (Brennenstuhl i sur., 2020).

1.3.1. Klinička slika

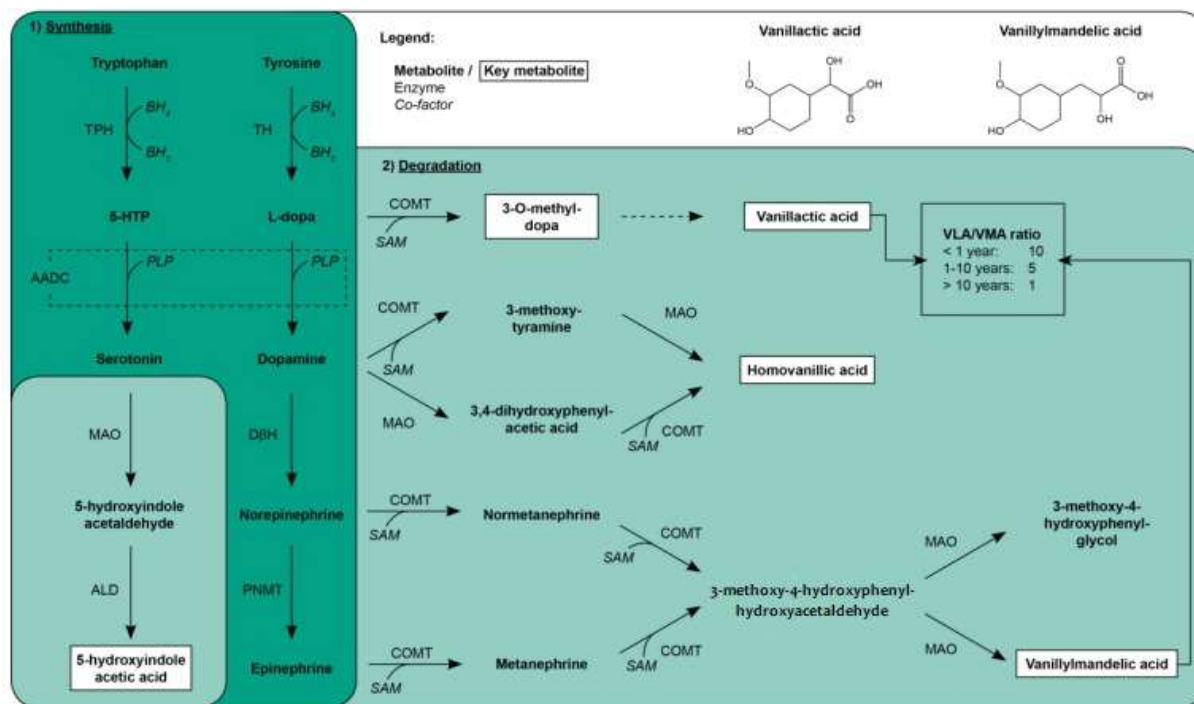
Manjak aktivnosti AADC dovodi do širokog raspona simptoma, uključujući teški poremećaj karakteriziran parkinsonovskom distonijom, zaostajanjem u neurorazvoju, okulogiričnim krizama i autonomnom deregulacijom. Međutim, klinička slika je vrlo heterogena.

Prvi dijagnosticirani pacijenti s manjkom aktivnosti AADC bili su muški monozigotni blizanci starosti 2 mjeseca. Simptomi su uključivali hipotoniju, zaostatak u razvoju, okulošku krizu i koreoatetoidne pokrete udova. Do sada je zabilježen 81 slučaj manjka aktivnosti AADC u cijelom svijetu (JAKE Search (biopku.org), pristupljeno 14.7.2022.). Okuloška kriza i hipotonija su dva najčešće zabilježena simptoma manjka aktivnosti AADC. Drugi simptomi uključuju kašnjenje u razvoju, hipokinezu, distoniju, hipertoniju udova, insomniju, iritabilnost, poteškoće u govoru i hranjenju. Mogući su i problemi sa spavanjem. Autonomni simptomi su također uobičajeni. Oni uključuju nazalnu kongestiju, prekomjerno znojenje, hipersalivaciju, stridor, ptozu, miozu i nestabilnost tjelesne temperature. Zabilježena je i hipotenzija koja može rezultirati sinkopom. Mogući su i problemi gastrointestinalnog sustava, uključujući dijareju ili tešku konstipaciju. U nekim slučajevima zabilježena je hipoglikemija, hipofleksija ili hiperfleksija. Također, povremeno se u kliničkoj slici mogu

javiti poremećaji pokreta kao što su koreja i distonija. Ti spastični pokreti mogu nalikovati napadajima te se često zamjenjuju s epileptičkim napadajima.

1.3.2. Dijagnostika

Trenutni dijagnostički algoritam uključuje kvantifikaciju prekursora dopamina i serotonina (L-DOPA, 5-HTP) i produkata razgradnje (homovanilnske kiseline (HVA), 5-hidroksiindoloctene kiseline (5-HIAA)) u cerebrospinalnoj tekućini. 3-O-metildopa (3-OMD), koji nastaje metilacijom L-DOPA-e, pokazala se kao potencijalni dijagnostički biljeg za nedostatak AADC, može se mjeriti u suhoj kapi krvi i može biti dio programa novorođenačkog probira. 3-OMD se razgrađuje do vanillaktata (VLA), organske kiseline koja se može naći u urinu pacijenata s nedostatkom AADC. Vanilpirugroždana kiselina (engl. *vanilpyruvic acid*, VPA) se reducira u vanillaktat reduktazom aromatskih α -ketokiselina. Navedenu reakciju može katalizirati i laktat dehidrogenaza, a obje reakcije zahtijevaju nikotinamid adenin dinukleotid (NADH) kao donor elektrona. Reduktaza α -ketokiselina otkrivena je u ljudskoj jetri, srcu, bubrezima i mozgu. VLA se izlučuje urinom te se često nalazi u visokim razinama u urinu pacijenata s manjkom aktivnosti AADC-a.



Slika 2. Prikaz enzimske disfunkcije i produkata katabolizma uslijed manjka aktivnosti AADC. Enzimska funkcija AADC neophodna je za sintezu dopamina i serotonina. Metilacija L-DOPA-e dovodi do nakupljanja stabilne 3-O-metildope koja se razgrađuje do VLA. Isprekidanom strelicom označen je enzimatski proces u više koraka pretvorbe 3-O-metildope (3-OMD) do vanillaktata (VLA) (preuzeto i prilagođeno iz Brennenstuhl i sur., 2020).

Jednom kada se posumnja na manjak aktivnosti AADC, za potvrdu dijagnoze potrebne su biokemijske pretrage likvora, mjerenje aktivnosti enzima AADC u plazmi i molekularna dijagnostika. Na abnormalnosti u metabolizmu serotonina i dopamina može se posumnjati mjerenjem koncentracija HVA, glavnog metabolita dopamina, 5-HIAA kao glavnog metabolita serotonina te 3-O-metildopa (glavni metabolit L-DOPA-e) koristeći metode tekućinske kromatografije (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC). Zbog deficita dopamina i serotonina, koncentracije HVA i 5-HIAA su snižene u likvoru pacijenata. 3-O-metildopa je uobičajeno povišena zbog metaboličkog bloka AADC-a. Ovakav nalaz metabolita je indikacija za manjak aktivnosti AADC no sličan uzorak postoji u nekoliko pacijenata s manjkom aktivnosti piridoksin 5'fosfat oksidaze (engl. *pyridoxine 5'-phosphate oxidase*, PNPO). Dijagnoza se potvrđuje mjerenjem aktivnosti enzima AADC u plazmi. Plazma se inkubira uzastopno s PLP-om i L-DOPA, a količina proizvedenog dopamina kvantificirana je HPLC-om s elektrokemijskom detekcijom (engl. *high-performance liquid*

chromatography with electrochemical detection, HPLC–ECD). U pacijenata s manjkom aktivnosti AADC, aktivnost AADC enzima u plazmi je iznimno niska (raspon kod pacijenata: < 1-5 pmol/min/mL; RI: 36 - 129 pmol/min/mL). Konačno, molekularna analiza AADC gena se provodi kako bi se odredile patogene mutacije. (Allen, 2010).

Opisano je povećano izlučivanje VLA u mokraći bolesnika s manjkom aktivnosti AADC. Međutim, koncentracija VLA u mokraći može biti neznatno povišena pa čak i normalna zbog čega VLA nema dovoljnu dijagnostičku osjetljivost za postavljanje sumnje na manjak aktivnosti AADC-a. Također, koncentracija produkata razgradnje kateholamina, vanilmandelična kiselina (VMA) u urinu bolesnika s AADC-om može biti smanjena, normalna ili povećana (Brennenstuhl, 2020).

1.3.3. Nasljeđivanje

Slijedeći smjernice međunarodnog konsenzusa, dijagnoza bi se trebala potvrditi sekvenciranjem DDC gena (7p12.2-p12.1, kromosom 7 [hg19]:50,526,134-50,633,154) i/ili mjerenjem aktivnosti AADC u plazmi.

Manjak aktivnosti AADC enzima slijedi autosomno-recesivni uzorak nasljeđivanja te su oboljele osobe uglavnom homozigoti ili složeni heterozigoti. Ljudski DDC gen je složen od 15 egzona i 14 introna te mu je lokus na p12.1-p12.3 kromosoma 7. DDC gen kodira 480 aminokiselinskih peptida. Mutacije su heterogene, a identificiran je i velik broj novih mutacija. Mutacije su identificirane u većini egzona, s nakupinama mutacija centriranih na egzonomima 2, 3 i 14. Najčešća je mutacija intronska mutacija ISV6+4A>T koja se uglavnom nalazi u populaciji osoba s Tajlanda i podrijetlom iz Kine. Također, najveći broj slučajeva manjka aktivnosti AADC zabilježen je u Tajvanu gdje je otkriveno 12 pacijenata. Kod njih je mutacija uzrokovala sintezu skraćenog proteina te su svi slučajevi imali teški fenotip. Ista mutacija je zabilježena kod braće bolesnika koji su bili složeni heterozigoti i imali blagu prezentaciju bolesti. To ukazuje da u tim slučajevima ozbiljnost stanja može izravno ovisiti o temeljnim genetičkim promjenama. Kod heterozigotnih rođaka djece s manjkom aktivnosti AADC s drugim mutacijama zabilježeno je da su razine aktivnosti AADC čak ispod 87% referentnog raspona. (Allen, 2010).

1.3.4. Liječenje

Mogućnosti liječenja su ograničene, uključuju korištenje piridoksina, agonista dopamina i inhibitora monoamino oksidaze.

Prva dva zabilježena slučaja manjka aktivnosti AADC dobro su odgovorila na terapiju inhibitorom monoamin oksidaze (engl. *monoamine oxidase inhibitor*, MAOI) tranilciprominom, agonistom dopamina bromokriptinom i piridoksinom – prekursor PLP-a. Nakon 6 mjeseci terapije, oba blizanca mogla su izvoditi voljne pokrete, učila su govoriti, bili su manje iritabilni te su okulološke krize prestale. Osnovna terapija manjka aktivnosti AADC je ostala ista kao i kod tog prvog slučaja, MAO inhibitor, agonist dopamina i piridoksin. No u istraživanju u kojem je sudjelovalo 78 pacijenata, samo kod njih 19% bio je pozitivan odgovor na terapiju. Dopaminski agonisti primijenjeni su u terapiji manjka aktivnosti AADC u pokušaju stimulacije dopaminskih receptora i da tako zamijene neurotransmisiju dopamina. Primijenjeni su bromokriptin, peroglid, pramipeksol i ropinirol, svaki različitog afiniteta za dopaminske receptore. Međutim, svi imaju veći afinitet prema receptoru sličnom dopaminskom receptoru D2, nego prema dopaminskom receptoru D1. U pacijenata koji su reagirali na terapiju agonistom dopamina glavna poboljšanja su vezana uz voljne kretnje. MAOI daju se za sprječavanje razgradnje ograničenih količina dopamina i serotonina koje proizvodi pacijent. Primijenjeni piridoksin se fosforilira piridoksal kinazom, a zatim ga PNPO pretvara u PLP. Cilj ovog tretmana je osigurati višak PLP-a, koenzima za AADC, koji zauzvrat može poboljšati ostatnu aktivnost AADC enzima. Liječenje piridoksinom pokazalo je poboljšanje biokemijske slike pacijenata, no promjene u kliničkom fenotipu primijećene su u malom broju pacijenata. (Allen, 2010).

1.4. PLINSKA KROMATOGRAFIJA – SPEKTROMETRIJA MASA (GC-MS)

Analiza organskih kiselina u urinu dobro je uspostavljeni dijagnostički alat za prepoznavanje velikog broja nasljednih metaboličkih poremećaja otkrivanjem patogenih ili abnormalnih koncentracija metabolita. Vodeća metoda za analizu organskih kiselina je plinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa (GC-MS).

Plinska kromatografija-spektrometrija masa je analitička tehnika koja kombinira moć razdvajanja plinske kromatografije i izvanrednu specifičnost i osjetljivost spektrometra masa.

U spektrometru masa fragmentacijom molekula nastaju ioni koje spektrometar analizira prema molekularnoj masi, odnosno prema omjeru mase i naboja (m/z). Nefragmentirani ioni analizirane molekule nazivaju se molekularni ioni, a najzastupljeniji ion u spektru osnovnim vrškom (Kapić, 2017).

1.4.1. Plinski kromatograf

Plinsko-tekućinska kromatografija omogućuje razdvajanje tvari između pokretne plinovite i nepokretne tekuće faze. Ona se provodi tako da se analizirani spojevi prevedeni u plinoviti oblik eluiraju pomoću plina kao pokretne faze uzduž kolone. Pokretna faza je plin nosač i ne dolazi u interakcije s analitom.

Kod plinske kromatografije odjeljivanje se temelji na adsorpcijsko-desorpcijskom procesu između plinovite i čvrste faze pri čemu tipične nepokretne faze čine anorganski adsorbensi kao npr. Al-silikat, silika gel, porozni polimeri, aktivni ugljen ili teflon.

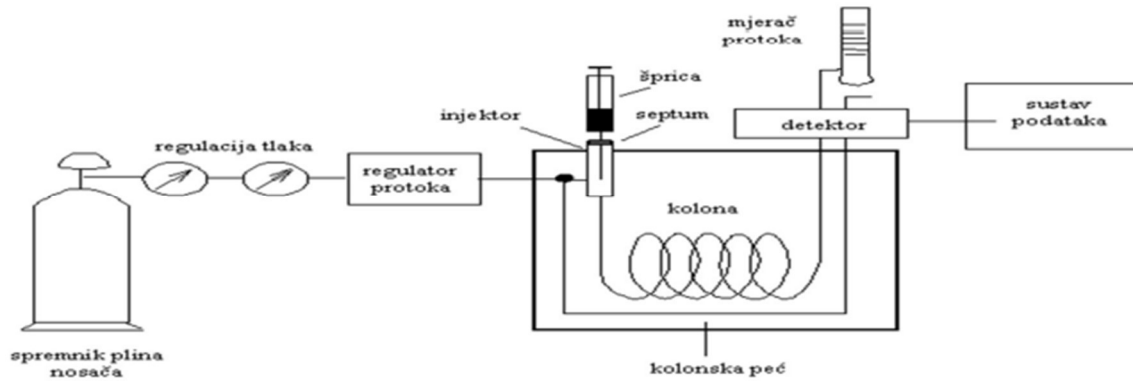
Plinski kromatografski sustavi razlikuju se po tipu plina nosača, sustavu injektiranja, kolonama i detektorima. Kao plinoviti nosač mogu poslužiti He, Ar, N₂, CO₂, H₂.

Protok plina kao mobilne faze mora biti konstantan zbog reproducibilnosti samih mjerenja. Spojevi koji se analiziraju, otopina ili plin, unose se preko injektora u struju plina nosača. Temperaturu je potrebno kontrolirati pri čemu je temperatura samog sustava 50 °C iznad vrelišta najteže isparljive sastavnice smjese (Kapić, 2017).

Kolona je obično uska cijev dužine 1 do 100 metara, različitog sastava i sadržaja stacionarne faze. Kolone mogu biti punjene ili kapilarne pri čemu je kod punjenja kolona nepokretna faza imobilizirana na granuliranoj površini dok kod kapilarnih kolona stjenka kapilare je presvučena izravno ili preko tankog sloja poroznog čvrstog nosača tankim filmom nepokretne faze. Prilikom odabira kolona potrebno je voditi računa o određenim parametrima: vrsti stacionarne faze, duljini kolone, debljini filma stacionarne faze i unutrašnjem promjeru (engl. *inner diameter*, ID). Najčešće korištene vrste stacionarne faze su polisiloksani i polietilenglikoli (Kišić, 2016).

Detektori mogu omogućiti selektivno ili osjetljivo dokazivanje i najčešće su to plameno-ionizacijski detektor (engl. *flame ionisation detector*, FID), detektor termičke vodljivosti

(engl. *thermal conductivity detector*, TCD) i detektor zahvata elektrona (engl. *electron capture detector*, ECD) (Kapić, 2017).



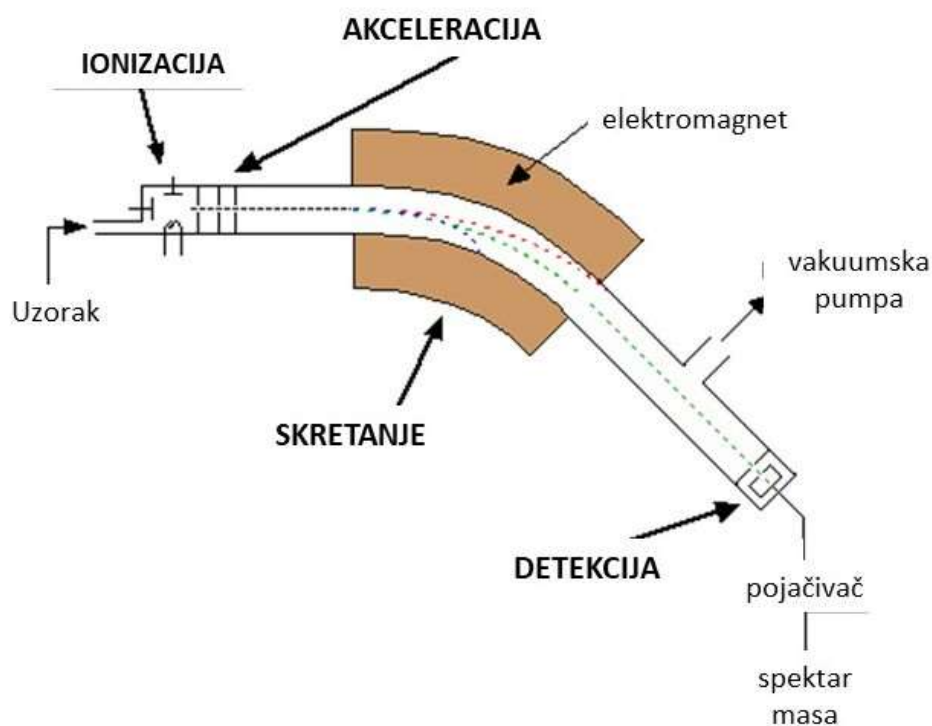
Slika 3. Shema plinskog kromatografa (preuzeto i prilagođeno iz Luterotti, 2011.).

1.4.2. Spektrometar masa

Analiza spektrometrijom masa se sastoji od 3 ključna koraka:

1. Ionizacija (stvaranje molekularnih iona)
2. Razdvajanje molekularnih iona na temelju omjera mase i naboja (m/z)
3. Mjerenje količine molekularnih iona za svaki omjer mase i naboja

Međusklop predstavlja vezu između plinskog kromatografa i spektrometra masa, tj. omogućuje ulazak razdvojenih sastavnica uzorka u plinovitoj fazi pri atmosferskom tlaku u spektrometar masa gdje je tlak $<1 \times 10^{-4}$ Torra. Sa spektrometrom masa mogu se koristiti kolone različitog promjera, ali protok plina ne smije biti veći od 2 mL/min kako se ne bi nadmašio kapacitet pumpe i zbog toga postoje ograničenja s obzirom na duljinu i promjer kolone. (Kapić, 2017)



Slika 4. Shematski prikaz spektrometra masa (preuzeto i prilagođeno s <https://www.chemguide.co.uk>)

1.4.2.1. Ionski izvor

U ionskom izvoru dolazi do razbijanja molekula i stvaranja iona u vakuumu ili kod atmosferskog tlaka. Ove tehnike koriste se uglavnom za učinkovitu ionizaciju polimera visoke molekularne mase ili proteina, tj. nehlapljivih, termolabilnih spojeva.

Najčešće ionizacijske tehnike u GC-MS sustavu su elektronska ionizacija (engl. *electron ionization*, EI) ili kemijska ionizacija (engl. *chemical ionization*, CI).

a) Elektronska ionizacija

Analizirana molekula nakon eluiranja s kolone u plinovitom obliku ulazi u ionski izvor gdje se sudara sa strujom elektrona (energije 70 eV) koje proizvodi filament termoelektronskom emisijom i pri tome nastaju molekularni ioni gotovo iste molekularne mase kao i osnovne mase.

Smatra se da je 20 eV dovoljno za nastanak molekularnog iona, a zatim slijedi daljnja fragmentacija dok se sama energija ne potroši. Pri elektronskoj ionizaciji rijetko je prisutan molekularni ion ili je on malog intenziteta, a dobiveni spektar masa odgovara "otisku prsta" (engl. *finger print*) same molekule.

Do fragmentacije dolazi u vakuumu pri čemu se nastali pozitivni ioni odbijaju ili električnim poljem bivaju povučeni iz izvora, ovisno o samoj konstrukciji ionskog izvora i sustavu leća elektronski se usmjeravaju i ubrzavaju u analizator masa dok s druge strane neutralni ili negativni fragmenti se uklanjaju vakuum sustavom.

b) Kemijska ionizacija

U kemijskoj ionizaciji molekule plina (najčešće je to metan, amonijak ili izobutan) dovode do fragmentacije one molekule s kojom se sudaraju.. Najprije se ionizira plin elektronima visoke energije, tako nastali ioni se sudaraju s novom molekulom plina a novonastala molekula ionizira ciljnu molekulu koju želimo fragmentirati.

Molekularni ioni koji nastaju su protonirani i nisu tako jako pobuđeni pa je manja fragmentacija nego što je to slučaj kod elektronske ionizacije. Zbog toga je kemijska ionizacija pogodnija za određivanje molekularne mase (Kapić, 2017).

1.4.2.2. Analizator masa

Analizatori masa imaju zadatak razdvajanje iona na temelju omjera mase i naboja, a neki od njih su:

- Razdvajanje molekula prema brzini kretanja – TOF (engl. *time of flight*)
- Kvadrupol filter masa
- Magnetski filter masa
- Ionska klopka (engl. *ion trap*)
- Orbitalna klopka (engl. *orbi trap*)

U svim analizatorima ioni putuju do detektora na temelju interakcije s magnetnim ili električnim poljem. Visoki vakuum je potreban kako bi se spriječilo sudaranje iona s drugim ionima ili molekulama kisika, dušika, vode ili ugljikovog dioksida što bi znatno utjecalo na putanju ispitivanih iona na unutrašnju površinu (Kapić, 2017).

1.4.2.3. Snimanje spektra i praćenje odabranih iona

Spektrometrija masa može na dva načina raditi analize: opetovano snimanje spektra (*scan mode*) i snimanje odabranih iona (*SIM mode*). Samo skeniranje je vrlo važno kod analize nepoznatih spojeva kako bi dobili podatke o molekularnoj masi i strukturi. Ovisno o brzini protoka mobilne faze i definiranim parametrima spektrometra masa, u jednoj sekundi, može se dobiti nekoliko spektara supstance koja se eluira. Zbroj intenziteta svih iona u jednom skeniranju daju ukupni ionski kromatogram (engl. *total ion chromatogram*, TIC). Iz ukupnog ionskog kromatograma mogu se izvući pojedini ioni, specifični za ispitivanu supstancu pa nastaje kromatogram odabranih iona (engl. *extracted ion chromatogram*, EIC).

Praćenje odabranih iona (*SIM mode*) koristi se kada je poznat spektar i vrijeme retencije analiziranog spoja jer je analizator masa usmjeren na ione koji su karakteristični za taj spoj. Na taj način značajno raste osjetljivost, i do 1000 puta, jer se dobiva više signala svakog odabranog m/z iona po jedinici vremena, odnosno povećan je omjer signala prema šumu bazne linije (Kapić, 2017).

1.4.3. Vakuum sustav

Za postizanje i održavanje konstantnog vakuuma potreban je sustav dviju pumpi, predpumpe ili primarne pumpe i pumpe koja održava visoki vakuum. Predpumpa je potrebna da bi snizila atmosferski tlak do razine na kojoj može djelovati pumpa koja održava visoki vakuum. Najčešće korištene su difuzijske pumpe, ali neki aparati imaju ugrađene turbomolekularne pumpe. Karakteristike pumpe određuju koji se promjer kolone može koristiti, tj. protok plina koji može nesmetano ulaziti u analizator, a da se sam vakuum sustav ne promjeni (Kapić, 2017).

2. CILJ RADA

Cilj ovog rada bio je odrediti koncentracije vanillaktata, vanilmandelične kiseline i izračunati njihov omjer u urinu bolesnika suspektnih na neurometaboličke poremećaje i izračunati referentne intervale po dobi, kako bi se navedeni biljezi mogli uključiti u selektivan probir na manjak aktivnosti AADC i pridonijeti pravovremenom postavljanju dijagnoze.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. NAČELO POSTUPKA

Organske kiseline se ekstrahiraju etilacetatom iz uzorka nakon stvaranja stabilnih oksima okso-kiselina i zakiseljavanja s H₂SO₄. Nakon centrifugiranja organski sloj se odvoji i upari pod strujom N₂. Dodatkom BSTFA + 1% TCMS (N,O-bis-(3-metilsilil)-3-fluoroacetamid s triklorsilanom) organske kiseline se prevode u trimetilsilil derivate. Nakon iniciranja alikvota uzorka, helij prenosi uzorak kroz kolonu pri čemu dolazi do selektivnog zadržavanja sastojaka na stacionarnoj fazi. Razdvojeni sastojci strujom plina napuštaju kolonu i ulaze u spektrometar masa. U ionskom izvoru spektrometra masa dolazi do ionizacije i fragmentacije u sudaru s ubrzanim elektronima energije 70 eV. Ovakav oblik ionizacije naziva se *electron impact*. Nastali ioni se izbacuju u kvadropolni filter masa koji u danom trenutku omogućuje prolaz odabranih iona, karakteriziranih određenim omjerom mase i naboja, m/z, do pojačala na izlazu gdje proporcionalno broju udaraca nastaju signali.

3.1.1. Primarni uzorak

Primarni uzorak je slučajni uzorak urina. Ukoliko se ne uzima odmah u postupak, uzorak se treba pohraniti na – 20 °C. Prije početka ekstrakcije potrebno je odrediti kreatinin u uzorku jer se u postupak uzima volumen urina koji sadrži 1 µmol kreatinina. Minimalno se u postupak uzima 50 µL urina. Ako je koncentracija kreatinina < 0,5 mmol/L, uzima se najviše 2 mL urina.

3.2. ODREĐIVANJE ORGANSKIH KISELINA PLINSKOM KROMATOGRAFIJOM-SPEKTROMETRIJOM MASA

3.2.1. Reagensi

- IS₁: 4-nitrofenol, (Cambridge Isotope Laboratories, SAD), 2.5 mmol/L
- IS₂: 2-oksokaproična kiselina, (Sigma, SAD), 5 mmol/L

- O-(2,3,4,5,6)-pentafluorobenzil-hidroksilamin hidroklorid. (PFBO), (Sigma-Aldrich, SAD)
- N,O-Bis (3-metilsilil) 3-fluoroacetamid s triklorsilan (BSTFA + TMCS, 1:99), (Sigma-Aldrich, SAD).

3.2.2. Otopine i supstance prikladne čistoće za kromatografiju

- amonij-klorid, (Merck, SAD)
- etil-acetat za spektroskopiju, (Merck, SAD)
- magnezij-sulfat, (Merck, SAD)
- etanol, (Merck, SAD)
- metanol, (Merck, SAD)
- heksan, (Merck, SAD)
- klorovodična kiselina, (Merck, SAD)
- sulfatna kiselina, (Merck, SAD)
- natrij-hidrogen karbonat, (Merck, SAD)

3.2.3. Priprema otopina

- Interni standard 4-nitrofenol (IS₁), 2,5 mmol/L (Mr= 143) – otopiti 0,009 g u 25 mL 20 mmol/L NaHCO₃, podijeliti u alikvote (1 mL), čuvati na – 20 °C.
- Interni standard 2-oksokaproična kiselina (IS₂), 5 mmol/L (Mr= 152,1) – otopiti 0,0190 g u 25 mL 20 mmol/L HCl, podijeliti u alikvote (1 mL), čuvati na – 20 °C (stabilnost do 3 mjeseca).
- Natrij-hidrogenkarbonat, 20 mmol/L – otopiti 0,68 g NaHCO₃ u 100 mL destilirane vode.
- Klorovodična kiselina, 20 mmol/L – dodati 0,168 µL 37% HCl u 100 mL destilirane vode.
- Sulfatna kiselina, 0,5 N H₂SO₄ – 1,39 mL 96% H₂SO₄ otopiti u 100 mL destilirane vode.
- PFBO 50 mg/mL (Mr=249,57) – otopiti 1 g u 20 mL vode, alikvotirati 1 mL, čuvati na – 20 °C.
- Magnezij sulfat osušiti prije svake uporabe, termostat na 100 °C.

- Smjesa alkana za podešavanje retencijskog indeksa organskih kiselina u datoj metodi (AART, program u Real Time Analysis).

3.2.4. Faze postupka

3.2.4.1. Predanalitička faza

Urine nakon odmrzavanja vorteksirati, izmjeriti kreatinin. Staviti magnezij sulfat u petrijevu zdjelicu i ostaviti u termostatu 1 sat na 100 °C.

3.2.4.2. Analitička faza

Za prvi dio analitičkog postupka potrebno je prirediti 3 niza obilježenih staklenih epruveta s navojem od 10 mL.

U prvi red epruveta:

- Pipetirati volumen urina koji sadrži 1 μmol kreatinina u epruvete
- Dodati 50 μL 2-okso-kaproične kiseline (IS_2),
- Dodati 50 μL 4-nitrofenola (IS_1),
- Dodati 50 μL otopine PFBO,
- Kod kvantifikacije dodati 50 μL odgovarajućeg IS organske kiseline koju kvantificiramo.
- Zakiseliti urin (pH na 2,0) dodatkom 200 μL 0,5 M H_2SO_4 .
- Zatvoriti epruvete čepom, dobro promiješati (vorteksirati) i ostaviti stajati na sobnoj temperaturi 1 sat da se stvore oksimi.

U drugom dijelu dodaje se 500 μL zasićene otopine NH_4Cl i vorteksira.

Prva ekstrakcija:

- Započeti ekstrakciju dodatkom 5 mL etil-acetata, zatvoriti epruvete s čepom.
- Svaku epruvetu dobro vorteksirati 1 min, u epruveti se treba stvoriti vrtlog.
- Sve uzorke centrifugirati 10 min na 3000 rpm.

- Nakon toga jedan po jedan uzorak: pažljivo jednokratnom pasterovom pipetom prenijeti gornji sloj, tj. ekstrakt u drugi red čistih epruveta s navojem u kojima se nalazi MgSO₄. Zatvoriti epruvete s čepom i kratko vorteksirati.

Druga ekstrakcija:

- Ponoviti postupak ekstrakcije s 5 mL etil-acetata još jednom u epruvete prvog niza dodati 5 mL etilacetata, ponovno vorteksirati 1 min, centrifugirati 10 min na 3000 rpm, prenijeti gornji sloj u drugi red epruveta s MgSO₄.
- Priređene ekstrakte s MgSO₄, vorteksirati i ostaviti na sobnoj temperaturi 1 sat. Epruvete trebaju biti začepljene.
- Centrifugirati 10 min na 3000 rpm.

Treći dio analitičkog postupka:

5 minuta prije započetog trećeg dijela analitičkog postupka, upaliti uparivač da se zagrije na 60 °C, provjeriti volumen plina N₂ (čistoće 5,0) u boci potrebnog za uparivanje organskih ekstrakata.

- Dekantiranjem odvojiti ekstrakt u treći red čistih obilježenih epruveta.
- Prenijeti odčepljene epruvete u uparivač te upariti ekstrakt do suha pod strujom N₂ pri temperaturi 60 °C. Tijek uparivanja treba kontrolirati. Čim je uzorak uparen, epruvetu treba izvaditi iz uparivača.
- Dodati 300 µL etanola, vorteksirati (upareni ostatak otopiti u 300 µL etanola) i ponovno uparivati svega par minuta do suha.
- Dodati 50 µL smjese za siliranje (BSTFA + 1% TMC (1 mL) i derivatizirati kuhanjem 1 sat na 60 °C, epruvete su začepljene.
- Pripremljeni uzorak se iz epruvete prenosi u bočice za automatski dodavač uzoraka (engl. *autosampler*) za GC-MS. U programu LabSolution® (Shimadzu, Japan) upisati sekvencu uzoraka i pokrenuti analizu (volumen injektiranja je 1 µL).

3.2.4.3. Poslijeanalitička faza

Kromatogrami se analiziraju u programu GC-MS *Solution*®(Shimadzu, Japan). Rezultati analiza se upisuju u Laboratorijski informacijski sustav (LIS). Nakon završene analize, uzorci se pohranjuju tijekom 2 mjeseca na – 20 °C.

3.3. Plinski kromatograf-spektrometar masa

Za postupak određivanja organskih kiselina koristi se plinsko-maseni kromatograf GCMS-QP20120 Ultram, (Shimadzu, Japan).

3.3.1. Načelo rada instrumenta

Plinska kromatografija je metoda razdvajanja sastojaka smjese hlapljivih spojeva. Zasniva se na različitoj raspodjeli sastojaka između dvije faze: stacionarne i mobilne. Inertni plin helij nosi kroz kolonu injektirani uzorak. Pri tome dolazi do selektivnog zadržavanja sastojaka smjese na stacionarnoj fazi, ovisno o distribucijskim koeficijentima. Razdvojeni sastojci napuštaju kolonu strujom plina u različitim vremenskim intervalima i ulaze u spektrometar masa gdje se u ionskom izvoru ioniziraju i fragmentiraju u sudaru s ubrzanim elektronima (*electron impact*). Nastali ioni se izbacuju u kvadrupolni filter masa koji omogućuje prolazak odabranih iona do pojačala na izlazu gdje se proporcionalno broju udaraca iona stvaraju signali.

3.4. Statističke metode

Podaci su prikazani i statistički obrađeni koristeći računalni program Microsoft® Excel® (Microsoft, USA) i statistički program MedCalc® Statistical Software version 20.110 (MedCalc Software Ltd, Belgija).

4. REZULTATI

Retrospektivnom analizom 219 uzoraka urina bolesnika suspektnih na neurometaboličke poremećaje u razdoblju od siječnja 2021. godine do srpnja 2021. godine, izmjerene su vrijednosti VLA, VMA i izračunati omjeri VLA/VMA. Ispitanici su podijeljeni u 3 dobne skupine: 0-1 godine, 1-10 godina i stariji od 10 godina. Uzorci su analizirani metodom ekstrakcije organskih kiselina na sustavu za plinsku kromatografiju s masenom spektrometrijom.

U kromatogramima organskih kiselina identificirani su vršci VLA i VMA prema omjeru mase i naboja (m/z) i retencijskom vremenu. Retencijsko vrijeme za VLA je oko 38. minute, za VMA oko 35. minute analize, a m/z ciljanog iona za VLA iznosi $m/z = 209$ (referentni ion $m/z = 338$), dok je za VMA ciljani ion $m/z = 297$ (referentni ion $m/z = 371$). Slikom 5. prikazan je kromatogram zdravog uzorka. Slika 6. prikazuje kromatogram uzorka bolesnika s dijagnozom AADC na kojem su označene površine ispod vrška vanillaktata i vrška vanilmandelične kiseline.

Podaci za ispitanike koji su mlađi od 1 godine prikazani su u Tablici 1, podaci za ispitanike starosti od 1 do 10 godina prikazani su u Tablici 2, a podaci za ispitanike koji su stariji od 10 godina u Tablici 3. Pomoću tih podataka izračunate su koncentracije VLA i VMA preko formule:

$$c(\text{VLA}(\text{mmol/L})) = \frac{(A(\text{VLA}) * c(\text{int. standard}(\text{mmol/L})) * V(\text{int. standard}/\mu\text{L}))}{(A(\text{int. standard})) * V(\text{uzorka}/\mu\text{L})}$$

$A(\text{VLA})$ – površina ispod krivulje VLA

$C(\text{int. standard})$ – koncentracija internog standarda

$V(\text{int. standard})$ – volumen internog standarda

$A(\text{int. standard})$ – površina ispod krivulje internog standarda

$V(\text{uzorak})$ – volumen uzorka urina uzetog u postupak

Tablica 1. Vrijednosti koncentracije VLA (mmol/mol kreatinina), VMA (mmol/mol kreatinina) te omjer koncentracija VLA/VMA ispitanike starosti do 1 godine, uključujući ispitanike starosti godinu dana.

Dob	VLA	VMA	VLA/VMA	Dob	VLA	VMA	VLA/VMA
< 1 mjesec	0,05	42,36	0,001	3 mjeseca	404,03	9888,55	0,041
< 1 mjesec	0,03	23,75	0,001	3 mjeseca	501,84	9789,02	0,051
< 1 mjesec	0,05	37,98	0,001	3 mjeseca	0,08	0,26	0,315
< 1 mjesec	0,06	58,17	0,001	4 mjeseca	0,04	49,96	0,001
< 1 mjesec	0,05	36,71	0,001	4 mjeseca	0,03	43,19	0,001
< 1 mjesec	0,08	34,81	0,002	4 mjeseca	0,06	32,73	0,002
< 1 mjesec	0,06	31,27	0,002	5 mjeseci	0,06	85,68	0,001
< 1 mjesec	0,07	21,7	0,003	5 mjeseci	170,24	4920,69	0,035
< 1 mjesec	0,2	68,29	0,003	5 mjeseci	4,73	88,94	0,053
< 1 mjesec	0,2	63,76	0,003	7 mjeseci	0,14	67,03	0,002
< 1 mjesec	0,45	54,65	0,008	8 mjeseci	0,26	30,44	0,009
< 1 mjesec	5,66	75,09	0,075	8 mjeseci	67,39	5217,16	0,013
< 1 mjesec	9,8	100,34	0,098	8 mjeseci	13,29	291,48	0,046
< 1 mjesec	464,02	4400	0,105	9 mjeseci	0,03	36,03	0,001
< 1 mjesec	330,9	3114,04	0,106	9 mjeseci	0,18	58,42	0,003
< 1 mjesec	8,39	50,89	0,165	9 mjeseci	0,31	29,14	0,011
< 1 mjesec	907,49	5122,82	0,177	9 mjeseci	69,03	4479,08	0,015
< 1 mjesec	539,66	1611,7	0,335	10 mjeseci	0,03	58,61	0,001
< 1 mjesec	24667,64	46524,22	0,53	10 mjeseci	0,18	58,97	0,003
1 mjesec	0,11	50,58	0,002	10 mjeseci	0,35	40,15	0,009
1 mjesec	0,04	23,59	0,002	10 mjeseci	873,4	15973,66	0,055
1 mjesec	217,39	2798,41	0,078	10 mjeseci	5,22	68,97	0,076
1 mjesec	9,58	77,57	0,124	11 mjeseci	125,29	6785,26	0,018
1 mjesec	494,88	3640,27	0,136	11 mjeseci	117,92	3202,72	0,037
2 mjesec	0,06	88,07	0,001	11 mjeseci	70,5	19,23	3,665
2 mjeseca	0,14	29,53	0,005	1 godina	2,28	4166,45	0,001
2 mjeseca	0,03	2,73	0,01	1 godina	0,22	66,28	0,003
2 mjeseca	503,02	6342,47	0,079	1 godina	0,2	49,12	0,004
3 mjeseca	0,04	63,9	0,001	1 godina	1,37	84,96	0,016
3 mjeseca	0,13	66,89	0,002	1 godina	1,34	76,98	0,017
3 mjeseca	0,04	2,45	0,015	1 godina	0,03	1,38	0,024

Tablica 2. Vrijednosti koncentracije VLA (mmol/mol kreatinina), VMA (mmol/mol kreatinina) te omjer koncentracija VLA/VMA ispitanika dobne skupine 1-10 godina, uključujući ispitanike starosti 10 godina.

Dob	VLA	VMA	VLA/VMA	Dob	VLA	VMA	VLA/VMA
2 godine	0,04	41,74	0,001	5 godina	0,04	30,47	0,001
2 godine	0,09	63,78	0,001	5 godina	0,05	58,66	0,001
2 godine	0,05	69,76	0,001	5 godina	0,05	55,87	0,001
2 godine	0,04	71,12	0,001	5 godina	0,05	28,59	0,002
2 godine	0,06	35,71	0,002	5 godina	0,07	16,55	0,004
2 godine	0,14	56,96	0,002	5 godina	0,06	15,73	0,004
2 godine	0,12	41,29	0,003	5 godina	0,21	50,75	0,004
2 godine	0,22	68,31	0,003	5 godina	0,55	46,04	0,012
2 godine	0,07	20,73	0,003	5 godina	1,63	70,96	0,023
2 godine	0,28	76,84	0,004	5 godina	10,14	382,4	0,027
2 godine	33,26	2439,11	0,014	5 godina	1,47	49,12	0,03
2 godine	1,47	80,37	0,018	5 godina	0,83	19,54	0,042
2 godine	14,55	789,55	0,018	6 godina	0,08	67,06	0,001
2 godine	0,88	47,45	0,019	6 godina	0,05	36,46	0,001
2 godine	2,17	95,42	0,023	6 godina	0,07	34,65	0,002
2 godine	1,21	52,56	0,023	6 godina	0,1	53,61	0,002
2 godine	27,37	1102,43	0,025	6 godina	0,03	16,44	0,002
2 godine	1,76	64,51	0,027	6 godina	0,1	41,04	0,002
2 godine	3,98	80,48	0,049	6 godina	0,03	16,64	0,002
2 godine	48,42	133,81	0,362	6 godina	0,07	30,64	0,002
2 godine	0,05	0,07	0,659	6 godina	0,06	19,57	0,003
2 godine	2,9	0,26	11,305	6 godina	0,44	127,94	0,003
3 godine	0,64	655,54	0,001	6 godina	0,07	14,82	0,005
3 godine	0,7	631,11	0,001	6 godina	3,98	365,44	0,011
3 godine	0,09	40,99	0,002	6 godina	0,81	72,69	0,011
3 godine	0,05	21,79	0,002	6 godina	148,29	12906,05	0,011
3 godine	0,05	19,77	0,002	6 godina	10,88	471,91	0,023
3 godine	0,06	14,95	0,004	6 godina	17,46	682,95	0,026
3 godine	0,07	14,7	0,004	7 godina	0,08	61,71	0,001
3 godine	0,33	73,49	0,005	7 godina	0,04	48,33	0,001
3 godine	0,7	66,89	0,01	7 godina	0,06	49,08	0,001
3 godine	15,76	1222,57	0,013	7 godina	0,05	24,8	0,002
3 godine	6,32	495,76	0,013	7 godina	0,04	22,42	0,002

3 godine	55,75	3530,42	0,016	7 godina	0,06	27,28	0,002
3 godine	1,23	75,4	0,016	7 godina	0,04	18,68	0,002
3 godine	1,3	75,01	0,017	7 godina	0,08	22,46	0,003
3 godine	1,45	78,09	0,019	7 godina	0,24	34,87	0,007
3 godine	14,35	700,28	0,02	7 godina	0,46	37,88	0,012
3 godine	32,79	1459,69	0,022	7 godina	0,3	20,6	0,014
3 godine	1,17	53,9	0,022	7 godina	0,13	7,56	0,018
3 godine	16,43	669,14	0,025	7 godina	1,52	70,05	0,022
3 godine	148,68	4894,05	0,03	7 godina	1,35	45,45	0,03
3 godine	0,9	30,11	0,03	7 godina	4,07	123,49	0,033
3 godine	0,44	13,76	0,032	8 godina	0,06	44,18	0,001
3 godine	136,95	3703,2	0,037	8 godina	0,12	17,17	0,007
3 godine	55,46	1475,6	0,038	8 godina	0,94	58,74	0,016
3 godine	312,55	8311,36	0,038	8 godina	1,13	61,07	0,019
3 godine	3,58	83,15	0,043	8 godina	148,83	318,59	0,467
4 godine	0,04	57,42	0,001	9 godina	0,06	40	0,001
4 godine	0,14	64,9	0,002	9 godina	0,06	33,75	0,002
4 godine	0,16	64,23	0,002	9 godina	0,18	75,77	0,002
4 godine	0,05	26,96	0,002	9 godina	0,11	37,26	0,003
4 godine	0,04	18,27	0,002	9 godina	0,05	10,83	0,004
4 godine	0,29	37,3	0,008	9 godina	5,83	203	0,029
4 godine	0,51	58	0,009	10 godina	0,1	65,24	0,002
4 godine	21,41	1711,73	0,013	10 godina	0,03	15,24	0,002
4 godine	1,4	79,02	0,018	10 godina	0,2	43,07	0,005
4 godine	1,04	40,49	0,026	10 godina	0,06	10,44	0,006
4 godine	0,76	22,5	0,034	10 godina	0,05	8,56	0,006
5 godina	0,08	71,26	0,001	10 godina	1,35	1,51	0,891
5 godina	0,04	29,23	0,001				

Tablica 3. Vrijednosti koncentracije VLA (mmol/mol kreatinina), VMA (mmol/kreatinina) te omjer koncentracija VLA/VMA ispitanika starijih od 10 godina.

Dob	VLA	VMA	VLA/VMA	Dob	VLA	VMA	VLA/VMA
11 godina	0,07	27,58	0,002	16 godina	0,98	72,47	0,014
11 godina	0,07	10,42	0,007	16 godina	0,09	5,98	0,015
11 godina	0,38	21,61	0,018	17 godina	0,07	24,86	0,003
11 godina	0,37	19,19	0,02	17 godina	0,06	24,21	0,003
12 godina	0,03	40,98	0,001	17 godina	0,08	30,63	0,003
12 godina	0,07	36,18	0,002	17 godina	0,04	8,62	0,004
12 godina	0,08	25,61	0,003	17 godina	0,03	6,72	0,005
12 godina	0,54	39,47	0,014	18 godina	0,04	75,53	0,001
12 godina	0,7	37,23	0,019	18 godina	0,06	17,22	0,004
12 godina	0,22	7,87	0,028	18 godina	0,11	17,83	0,006
13 godina	0,1	40,04	0,002	18 godina	0,53	50,75	0,01
13 godina	2,11	170,96	0,012	27 godina	0,33	77,21	0,004
14 godina	0,08	21,13	0,004	35 godina	0,04	4,5	0,009
14 godina	0,91	31,01	0,029	36 godina	0,06	8,16	0,007
15 godina	0,03	37,38	0,001	45 godina	0,26	13,06	0,02
15 godina	0,2	10,41	0,019	51 godina	0,33	27,04	0,012
16 godina	0,21	16,08	0,013	56 godina	0,08	10,54	0,007

Za svaku dobnu skupinu napravljena je statistička analiza podataka kako bi se ustanovilo postoji li normalnost raspodjele podataka. Zbog odbacivanja normalnosti, rezultati su prikazani u obliku medijana koncentracije i 95%-tnog intervala pouzdanosti.

Medijani koncentracije i 95% intervali pouzdanosti za VLA, VMA i VLA/VMA u 62 ispitanika starosti do 1 godine iznosili su 0,240 (0,136 - 4,82) mmol/mol kreatinina, 65,09 (50,83 - 78,95) mmol/mol kreatinina, 0,009 (0,003 - 0,019). U 121 ispitanika starosti od 1 do 10 godina medijani koncentracije VLA, VMA i VLA/VMA iznosili su 0,242 (0,111 do 0,686) mmol/mol kreatinina, 53,61 (42,06 - 64,12) mmol/mol kreatinina, 0,006 (0,003 - 0,012). U 34 ispitanika starijih od 10 godina medijani koncentracije VLA, VMA i VLA/VMA iznosili su 0,086 (0,070 - 0,228) mmol/mol kreatinina, 24,54 (17,02 - 31,91) mmol/mol kreatinina, 0,007 (0,004 - 0,012). Statistički podaci prikazani su Tablicom 4. za dobnu skupinu ispitanika

starosti 0-1 godine, Tablicom 5. za dobnu skupinu ispitanika starosti 1-10 godina te Tablicom 6. za dobnu skupinu ispitanika starijih od 10 godina.

Tablica 4. Statistički podaci obrade podataka koncentracije VLA, VMA i njihovog omjera VLA/VMA za dobnu skupinu ispitanika starosti 0-1 godine.

VARIJABLA	VLA	VMA	VLA/VMA
Veličina uzorka	62	62	62
Najniža vrijednost	0,03	0,26	0,0
Najviša vrijednost	24667,64	46524,22	3,67
Aritmetička sredina	493,39	2264,83	0,11
95% CI aritmetičke sredine	-300,83 do 1287,62	619,73 do 3909,93	-0,01 do 0,23
Medijan	0,24	65,09	0,01
95% CI medijana	0,14 do 4,82	50,83 do 78,95	0,0 do 0,02
Varijanca	9780908,9	41964239,76	0,22
Standardna devijacija	3127,44	6477,98	0,47
Relativna standardna devijacija	6,34 (633,86%)	2,86 (286,02%)	4,40 (440,01%)
Standardna pogreška	397,19	822,70	0,06
Koeficijent nakošenosti	7,82 (P<0,0001)	5,60 (P<0,0001)	7,43 (P<0,0001)
Koeficijent zaobljenosti	61,42 (P<0,0001)	36,71 (P<0,0001)	57,08 (P<0,0001)
Shapiro-Wilk test za normalnu distribuciju	W=0,14 odbaciti normalnost (P<0,0001)	W=0,37 odbaciti normalnost (P<0,0001)	W=0,21 odbaciti normalnost (P<0,0001)

CI = interval pouzdanosti

Tablica 5. Statistički podaci obrade podataka koncentracije VLA, VMA i njihovog omjera VLA/VMA za dobnu skupinu ispitanika starosti 1-10 godina.

VARIJABLA	VLA	VMA	VLA/VMA
Veličina uzorka	121	121	121
Najniža vrijednost	0,03	0,07	0,0
Najviša vrijednost	312,55	12906,05	11,31
Aritmetička sredina	11,06	442,69	0,12
95% CI aritmetičke sredine	4,06 do 18,06	166,78 do 718,61	-0,06 do 0,31
Medijan	0,24	53,61	0,01
95% CI medijana	0,11 do 0,69	42,06 do 64,12	0,0 do 0,01
Varijanca	1512,1	2349828,47	1,06
Standardna devijacija	388,86	1532,92	1,03
Relativna standardna devijacija	3,51 (351,59%)	3,46 (346,27%)	8,31 (830,82%)
Standardna pogreška	3,54	139,34	0,09
Koeficijent nakošenosti	5,38 (P<0,0001)	6,07 (P<0,0001)	10,81 (P<0,0001)
Koeficijent zaobljenosti	33,70 (P<0,0001)	42,27 (P<0,0001)	118,11 (P<0,0001)
Shapiro-Wilk test za normalnu distribuciju	W=0,31 odbaciti normalnost (P<0,0001)	W=0,29 odbaciti normalnost (P<0,0001)	W=0,09 odbaciti normalnost (P<0,0001)

CI = interval pouzdanosti

Tablica 6. Statistički podaci obrade podataka koncentracije VLA, VMA i njihovog omjera VLA/VMA za dobnu skupinu ispitanika starijih od 10 godina.

VARIJABLA	VLA	VMA	VLA/VMA
Veličina uzorka	34	34	34
Najniža vrijednost	0,03	4,50	0,0
Najviša vrijednost	2,11	170,96	0,03
Aritmetička sredina	0,28	31,43	0,01
95% CI aritmetičke sredine	0,13 do 0,42	20,51 do 42,34	0,01 do 0,02
Medijan	0,09	24,54	0,01
95% CI medijana	0,07 do 0,23	17,02 do 31,91	0,0 do 0,01
Varijanca	0,17	978,32	0,0
Standardna devijacija	0,41	31,28	0,01
Relativna standardna devijacija	1,49 (148,68%)	0,99 (99,53%)	0,83 (82,84%)
Standardna pogreška	0,07	5,36	0,0
Koeficijent nakošenosti	3,15 (P<0,0001)	2,99 (P<0,0001)	0,95 (P=0,0232)
Koeficijent zaobljenosti	12,06 (P<0,0001)	11,64 (P<0,0001)	0,10 (P=0,7141)
Shapiro-Wilk test za normalnu distribuciju	W=0,61 odbaciti normalnost (P<0,0001)	W=0,69 odbaciti normalnost (P<0,0001)	W=0,88 odbaciti normalnost (P=0,0016)

CI = interval pouzdanosti

Korištenjem podataka o medijanu koncentracija i 95%-tnom intervalu pouzdanosti prikazanih Tablicom 4., Tablicom 5. i Tablicom 6. definirani su referentni intervali za VLA u mmol/mol kreatinina te referentni intervali za VMA u mmol/mol kreatinina u urinu bolesnika podijeljenih u 3 dobne skupine te su prikazani u Tablici 7.

Također, za dobivanje referentnih intervala omjera VLA/VMA u urinu bolesnika po dobnim skupinama koristili su se podaci za medijan omjera VLA/VMA te 95%-tni interval pouzdanosti. U Tablici 8. prikazani su referentni intervali za omjer VLA/VMA i medijani omjera VLA/VMA prema dobnim skupinama: bolesnici mlađi od godinu dana, starosti 1-10 godina te stariji od 10 godina.

Tablica 7. Referentni intervali VLA i VMA u uzorcima urina prema dobnim skupinama dobiveni statističkom obradom podataka u KBC Zagreb.

Dobna skupina	Referentni interval VLA (mmol/mol kreatinina)	Referentni interval VMA (mmol/mol kreatinina)
0 - 1 godina	0,14 - 4,82	50,83 - 78,95
1 - 10 godina	0,11 - 0,69	42,06 - 64,12
> 10 godina	0,01 - 0,23	17,02 - 31,91

Tablica 8. Prikaz referentnih intervala omjera VLA/VMA prema dobnim skupinama (mlađi od 1 godine, starosti 1-10 godina, stariji od 10 godina) dobiven statističkom analizom podataka skupljenih u KZLD KBC-a Zagreb.

Dobna skupina	Referentni interval omjera VLA/VMA	n =	Medijan omjera VLA/VMA (SD)
0 - 1 godina	0,003 - 0,019	62	0,010 (0,469)
1 - 10 godina	0,003 - 0,012	121	0,006 (1,013)
> 10 godina	0,004 - 0,012	34	0,007 (0,008)

Tablica 9. Referentni intervali omjera VLA/VMA po dobnim skupinama iz literature (preuzeto i prilagođeno od Brennenstuhl i sur, 2020).

Dobna skupina	Referentni interval omjera VLA/VMA	Zdravi uzorci		Patološki uzorci manjka aktivnosti AADC enzima	
		n =	Medijan omjera VLA/VMA (SD)	n =	Medijan omjera VLA/VMA (SD)
0 - 1 godina	< 8	317 6	0,15 (0,64)	6	32,95 (17,72)
1 - 10 godina	< 6	554 9	0,03 (0,07)	4	27,79 (31,5)
> 10 godina	< 0,8	137 0	0,04 (0,019)	4	3,85 (5,02)

Medijani omjera dobiveni u ovom radu, prikazani Tablicom 8., slažu se s medijanima omjera VLA/VMA u istraživanju Brennenstuhl i suradnika koji su prikazani Tablicom 9., a čije je istraživanje služilo kao primjer pri izradi ovoga diplomskog rada.

Odjel za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir KZLD-a, sudjeluje u vanjskoj procjeni kontrole kvalitete rada. U tu svrhu dobivaju se uzorci urina nepoznate patologije od organizatora vanjske procjene kontrole kvalitete i analiziraju kao uzorci pacijenata. Dobiveni rezultati se šalju organizatoru, statistički obrađuju i uspoređuju s drugim laboratorijima. Jedan od uzoraka vanjske procjene kontrole kvalitete za analizu organskih kiselina bio je uzorak urina bolesnika oboljelog od manjka aktivnosti AADC-a. Ekstrakcijom organskih kiselina prema ranije opisanom postupku, dobiveni su sljedeći rezultati:

$A(\text{VLA}) = 51\,291\,260$; $A(\text{VMA}) = 0$; $c(\text{kreatinin}) = 0,0009 \text{ mol/L}$; $c(\text{interni standard}) = 2500 \text{ } \mu\text{mol/L}$; $V(\text{uzorak}) = 1111,11 \text{ } \mu\text{L}$; $c(\text{VLA}) = 103,11 \text{ mmol/mol kreatinina}$.

Površina ispod vrška za VMA bila je izrazito mala zbog čega nije bilo moguće izračunati koncentraciju VMA. Samim time nije bilo moguće izračunati omjer VLA/VMA, no moguće je zaključiti kako većom koncentracijom VLA, a manjom koncentracijom VMA u urinu omjer VLA/VMA bi bio izrazito visok.

5. RASPRAVA

Sumnja na manjak aktivnosti AADC postavlja se na temelju koncentracija HVA, 3-OMD i 5-HIAA u uzorku likvora te rezultatima dobivenima enzimskim testovima i genetskom analizom. Za dobivanje uzorka likvora koristi se postupak lumbalne punkcije, koji je prilično invazivan za bolesnika te se izvodi samo ako postoje čvrste kliničke indikacije za njegovu provedbu (Čvorišćec i sur., 2009).

Brennenstuhl i sur. (2020) u svom istraživanju su ispitali semikvantitativno određivanje koncentracija VLA, VMA i njihova omjera VLA/VMA u urinu kao pouzdanog dijagnostičkog biljega manjka aktivnosti dekarboksilaze aromatskih L-aminokiselina (Brennenstuhl i sur., 2020). Metodom plinske kromatografije s masenom spektrometrijom analizirali su organske kiseline u urinu 10 095 nasumično izabranih uzoraka bolesnika. Unutar tog broja ispitanika, nalazilo se i 14 uzoraka bolesnika s potvrđenom dijagnozom manjka aktivnosti AADC. U uzorku urina svakog bolesnika identificirano je 77 organskih kiselina pomoću kojih je moguće posumnjati na određeni broj nasljednih metaboličkih poremećaja. Kvantifikacija analita rađena je u odnosu na interni standard 4-nitrofenol ($m/z = 200$). Koncentracije metabolita izražene su u mmol/molu kreatinina. Ispitanici su bili podijeljeni u 3 dobne skupine: prva skupina obuhvaćala je ispitanike starosti do 1 godine, druga skupina obuhvaćala je ispitanike starosti godine dana do 10 godina te treća skupina ispitanika starijih od 10 godina. Obradom velikog broja uzoraka odabrana je 97,5-ta percentila kao gornja granica referentnog intervala, a uzorci bolesnika čiji profili organskih kiselina odgovaraju nekim od organskih acidemija ili aminoacidopatija nisu uključeni u izračun referentnih intervala. Rezultati su prikazani pomoću medijana, 95% intervala pouzdanosti, pozitivne prediktivne vrijednosti i negativne prediktivne vrijednosti. Prva dobna skupina obuhvaćala je 3 176 uzoraka te je medijan omjera VLA/VMA iznosio 0,15. Druga dobna skupina obuhvaćala je 5 549 uzoraka te je medijan omjera VLA/VMA za tu skupinu iznosio 0,03. Za treću dobnu skupinu od 1 370 uzoraka medijan omjera VLA/VMA iznosio je 0,04. Referentni intervali te medijani omjera VLA/VMA prikazani su Tablicom 9.

U navedenom radu, analizom podataka autori su uočili da bolesnici s manjkom aktivnosti AADC izlučuju više koncentracije VLA u urinu u odnosu na zdravu populaciju. Međutim, koncentracija VLA u urinu bolesnika s dijagnozom manjka aktivnosti AADC također može biti granična ili normalna. Unatoč sveukupno maloj grupi uzoraka bolesnika s potvrđenom dijagnozom manjka aktivnosti AADC-a, omjer VLA/VMA pokazuje visoku osjetljivost za

sve dobne skupine i prihvatljivu pozitivnu prediktivnu vrijednost. Nakon izmjerenog povišenog omjera VLA/VMA, potrebna je analiza enzimske aktivnosti AADC ili genetičko testiranje DDC gena.

Uzorom na istraživanje Brennenstuhl i suradnika, prilikom izrade ovog rada retrospektivnom analizom organskih kiselina u urinu obrađeno je 219 uzoraka urina bolesnika. U uzorcima bolesnika identificirani su vršci VLA i VMA te su izračunate koncentracije VLA i VMA po molu kreatinina. Iz dobivenih koncentracija VLA i VMA u mmol/mol kreatinina izračunat je omjer VLA/VMA za svakog bolesnika. Ispitanici su podijeljeni prema dobnim skupinama po primjeru istraživanja Brennenstuhl i suradnika (Brennenstuhl i sur., 2020).

Kao dodatni biljeg u bolesnika s visokim omjerom VLA/VMA, izračunata je koncentracija N-acetiltirozina (engl. *N-acetyl—tyrosine*, NAT). N-acetiltirozin nastaje acetilacijom tirozina kataliziranom acetilazom aromatskih aminokiselina (engl. *aromatic L-amino acetylase*). Povećanom razgradnjom tirozina, nastaju i veće količine N-acetiltirozina koji se najvećim dijelom izlučuje urinom. N-acetiltirozin ima veću topljivost od tirozina i lakše prolazi barijere. (Hoffer i sur. 2003.) Dio tirozina razgrađuje se do L-DOPA-e, a manji dio do N-acetiltirozina. Prilikom manjka aktivnosti AADC, L-DOPA se ne razgrađuje dovoljno, zbog čega se u urinu bolesnika s manjkom aktivnosti AADC mogu naći povećane koncentracije tirozina i njegovih derivata.

U tablici 7. prikazani su referentni intervali za VLA i VMA dobiveni statističkom obradom podataka ukupno 219 uzoraka urina. Usporedbom vrijednosti VLA između dobnih skupina može se zaključiti kako se izlučivanje VLA u urinu smanjuje s godinama. Koncentracije VMA u urinu obrađenih bolesnika imaju izrazito široke raspone. Međutim, VMA nije dijagnostički značajna za probir bolesnika na manjak aktivnosti AADC s obzirom da ona u urinu može biti snižena, normalna ili povišena te njena vrijednost ostaje približno jednaka s godinama (Brennenstuhl i sur., 2020). Zbog navedenog izračunavanje omjera VLA/VMA u bolesnika s visokim koncentracijama VLA u urinu može biti iznimno važno za razlikovanje bolesnika sa sumnjom na manjak aktivnosti AADC enzima od ostalih neurometaboličkih poremećaja.

6. ZAKLJUČCI

Semikvantitativno mjerenje koncentracije VLA u urinu nije dovoljno za postavljanje sumnje na manjak aktivnosti AADC jer, iako bolesnici s manjkom AADC najčešće izlučuju više koncentracije VLA u odnosu na zdravu populaciju, VLA u takvih bolesnika može biti normalna ili čak snižena.

Izračun omjera VLA/VMA u urinu u sklopu rutinske analize organskih kiselina trebao bi se izračunati i uzeti u obzir kod svakog bolesnika kod kojeg postoji visoka koncentracija VLA i/ili VMA te kod svakog bolesnika kod kojeg postoji sumnja na neurometaboličke poremećaje.

Omjer VLA/VMA u urinu može pomoći u diferencijalnoj dijagnostici neurometaboličkih bolesti, odnosno u razlikovanju manjka aktivnosti AADC od ostalih neurometaboličkih poremećaja.

Za izradu preciznijih referentnih intervala omjera VLA/VMA koji odgovaraju populaciji Hrvatske potrebno je napraviti analizu većeg broja uzoraka bolesnika suspektnih na neurometaboličke poremećaje i uzroke bolesnika s potvrđenom dijagnozom manjka aktivnosti AADC. Također, potrebno je prikupiti približno jednak broj ispitanika u svim dobnim skupinama.

Navedeni biomarkeri pridonose pravovremenom postavljanju dijagnoze i mogu biti dio selektivnog probira na neurometaboličke bolesti.

7. POPIS KRATICA

AADC	dekarboksilaza aromatskih L-aminokiselina (engl. <i>aromatic L-amino acid decarboxylase</i>)
BSTFA + TCMS	N,O-bis-(3-metilsilil)-3-fluoroacetamid s triklorsilanom
ECD	detektor zahvata elektrona
EI	elektronska ionizacija
EIC	kromatogram odabranih elektrona
FID	plameno-ionizacijski detektor
GC – MS	plinska kromatografija sa spektrometrijom masa (engl. <i>gas chromatography - mass spectrometry</i>)
GIT	gastro-intestinalni sustav
5-HIAA	5-hidroksiindol octena kiselina
HPLC	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. <i>high performance liquid chromatography</i>)
HPLC-ECD	tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s elektrokemijskom detekcijom
5-HTP	5-hidroksitriptofan
HVA	homovanilska kiselina
ID	unutarnji promjer
IS	interni standard
L-DOPA	L-3,4,-dihidroksifenilalanin
LIS	laboratorijski informacijski sustav
Lys	lizin
MAOI	inhibitor monoamin oksidaze
NADH	nikotin amid dinukleotid

NAT	N-acetiltirozin
3-OMD	3-O-metildopa
PFBO	O-(2,3,4,5,6)-pentafluorobenzil-hidroksilamin hidroklorid
PKA	protein kinaza A
PKG	protein kinaza G
PLP	pirodoksal-5'-fosfat
PNPO	piridokal 5'-fosfat oksidaza
RI	referentni interval
TCD	detektor termičke vodljivosti
TIC	ukupni ionski kromatogram
TOF	razdvajanje molekula prema brzini kretanja (engl. <i>time of flight</i>)
VLA	vanilaktična kiselina (engl. <i>vanillactic acid</i>)
VMA	vanilmandelična kiselina (engl. <i>vanilmandelic acid</i>)
VPA	vanilpirugroždana kiselina (engl. <i>vanilpyruvic acid</i>)

8. POPIS LITERATURE

AADC mechanism, 2021, <https://www.wikimedia.org>, pristupljeno 19. 8. 2022.

Abeling N.G.G.M., Abdenur J.E., Jorge L., Chamoles N. Novel diagnostic parameters for AADC deficiency in general metabolic urine screening, *Ned Tijdschr Klin Chem Labgeneesk*, vol. 30, no. 4, 2005, 278-279

Allen G.F.G. The neurochemical consequences of aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency, London, UCL Institute of Neurology, Department of Molecular Neuroscience, Doktorski rad, 2010, 38-50, 54-55

Aromatic L-amino acid decarboxylase, 2022, <https://www.wikipedia.org>, pristupljeno 21. 7. 2022.

Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase Deficiency, 2020, <https://www.rarediseases.org>, pristupljeno 21. 7. 2022.

Bertoldi M. Mammalian dopa decarboxylase: Structure, catalytic activity and inhibition, Verona, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2014, 2-4

Brennenstuhl H., Garbade S.F., Okun J.G., Peyh P., Hoffman G.F., Langhans C.D., Opladen T. Semi-quantitative detection of a vanillic acid/vanillylmandelic acid ratio in urine is a reliable diagnostic marker for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency, Heidelberg, *Molecular Genetics and Metabolism*, 2020, 5-7, 11-13, 15-18

Čvorišćec D., Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 534-538, 546-548, 558-567

Fusco C., Leuzzi V., Striano P., Battini R., Burlina A., Delphi panel experts, Spagnoli C. Aromatic L-amino Acid Decarboxylase (AADC) deficiency: results from an Italian modified Delphi consensus, Reggio Emilia, *Italian Journal of Pediatrics*, 2021, 1-2

Inherited metabolic disorders: Symptoms and causes, 2017. <https://www.mayoclinic.org>, pristupljeno 19. 8. 2022.

Kapić T. Kvantitativna analiza orotske kiseline i značaj u dijagnostici organskih acidurija i poremećajima urea ciklusa, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Diplomski rad, 2017, 28-35

Kišić P., Optimizacija i validacija HS-SPME/GC-MS metode za određivanje aldehida i ketona u uzorcima bezglutenskog kruha, Zagreb, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Diplomski rad, 2016, 5-6

Luterotti S. Uvod u kemijsku analizu, Zagreb, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, 2011. str. 189

Monteleone B., Hyland K. Case report: discovery of 2 gene variants for aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency in 2 African American siblings, Mineola, NY, *BMC Neurology*, 2020, 1, 3-4

Patient Stories: Childred diagnosed with AADC deficiency, 2021, <https://www.aboutaad.com>, pristupljeno 20. 8. 2022.

Pons R., Ford B., Chiriboga C.A., Clayton P.T., Hinton V., Hyland K., Sharma R., De Vivo D.C. Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency: Clinical features, treatment and prognosis, New York, *European Journal of Pediatric Neurology*, 2004, 2-3

Symptoms of AADC Deficiency, 2022, <https://www.aadcnews.com>, pristupljeno 20. 8. 2022.

The Mass Spectrometer: How it works, 2019, <https://chemguide.org>, pristupljeno 19. 8. 2022.

Wassenberg T., Molero-Luis M., Jeltsch K., Hoffmann G.F., Assmann B., Blau N., Garcia-Cazorla A., Artuch R., Pons R., Pearson T.S., Leuzzi V., Mastrangelo M., Pearl P.L., Tso Lee W., Kurian M.A., Heales S., Flint L., Verbeek M., Willemsen M., Opladen T. Consensus guideline for the diagnosis and treatment of aromatic l-amino acid decarboxylase (AADC) deficiency, Heidelberg, *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 2017, 2, 5, 7-10. 16-18

What is AADC deficiency?, 2020, <https://www.aadc.wearemethod.io>, pristupljeno 6. 1. 2022.

9. SAŽETAK

Manjak aktivnosti dekarboksilaze aromatskih L-aminokiselina rijedak je autosomno-recesivni poremećaj koji dovodi do teškog deficita kateholamina i serotonina. Klinička slika uključuje različite stupnjeve neuroloških oštećenja, uključujući motoričke i neuromotoričke simptome. Uspješnost liječenja ovisi o pravovremenom postavljanju dijagnoze i početku terapije.

Postavljanje dijagnoze manjka aktivnosti AADC temelji se na određivanju koncentracije neurotransmitera u likvoru i molekularnoj dijagnostici zbog čega se bolesnici izlažu invazivnom postupku uzimanja uzoraka za analizu. Vanillaktat (VLA), vanilmandelična kiselina (VMA) i njihov omjer VLA/VMA mogu se analizirati u sklopu rutinske analize organskih kiselina u urinu i smatraju se potencijalnim neinvazivnim biokemijskim biljezima u postavljanju dijagnoze AADC.

Cilj ovog diplomskog rada bio je odrediti referentne intervale za VLA, VMA i njihova omjera VLA/VMA u urinu retrospektivnom analizom organskih kiselina bolesnika suspektnih na neurometaboličke poremećaje. 219 obrađenih bolesnika podijeljeno je u tri dobne skupine, a uzorci su analizirani *in-house* metodom ekstrakcije organskih kiselina na sustavu za plinsku kromatografiju s masenom spektrometrijom. Kao dodatni marker korišten je N-acetiltirozin.

Određivanje referentnih intervala VLA, VMA i VLA/VMA u urinu u sklopu rutinske analize organskih kiselina može pomoći u diferencijalnoj dijagnostici neurometaboličkih bolesti. Za određivanje preciznijih referentnih intervala potrebno je obraditi veći broj uzoraka bolesnika sa sumnjom na neurometaboličke poremećaje i prikupiti približno jednak broj ispitanika u svim dobnim skupinama.

10. SUMMARY

Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency is rare autosomal recessive disorder that leads to severe deficit of catecholamine and serotonin. The clinical picture includes varying degree of neurological damage, including motor and neuromotor symptoms. Treatment outcomes depends on the timepoint when therapy started.

Key diagnostic test for AADC confirmation are measurement neurotransmitters in cerebrospinal fluid and genetic testing. However, to perform this testing, patients are exposed to intensive lumbar puncture procedure. Determination of vanillic acid (VLA), vanillylmandelic acid (VMA) and VLA/VMA ratio as part of organic acid analysis in urine is considered a reliable approach using non-invasive biomarkers in the diagnosis of AADC.

The aim of this thesis was to determine reference intervals of VLA, VMA and VLA/VMA ratio in urine. Retrospective analysis of urinary organic acids obtained from 219 patients suspected for neurometabolic disorders were included in this study. Patients were divided into groups depending on age. Organic acids in urine were measured using in-house method by gas-chromatography mass spectrometry. As additional biomarker, N-acetyltyrosine was used.

Determination of reference intervals of VLA, VMA and VLA/VMA ratio as a part of organic acids analysis in urine may help to differentiate neurometabolic patients with possible AADC deficiency from other neurometabolic disorders. To determine more precise reference intervals, a larger number of samples should be analysed.

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Medicinska biokemija
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

VANILAKTIČNA KISELINA I VANILMANDELIČNA KISELINA – NOVI BIOMARKERI U DIJAGNOSTICI MANJKA AKTIVNOSTI DEKARBOKSILAZE AROMATSKIH L-AMINOKISELINA

Monika Polić

SAŽETAK

Manjak aktivnosti dekarboksilaze aromatskih L-aminokiselina rijedak je autosomno-recesivni poremećaj koji dovodi do teškog deficita kateholamina i serotonina. Klinička slika uključuje različite stupnjeve neuroloških oštećenja, uključujući motoričke i neuromotoričke simptome. Uspješnost liječenja ovisi o pravovremenom postavljanju dijagnoze i početku terapije. Postavljanje dijagnoze manjka aktivnosti AADC temelji se na određivanju koncentracije neurotransmitera u likvoru i molekularnoj dijagnostici zbog čega se bolesnici izlažu invazivnom postupku uzimanja uzoraka za analizu. Vanillaktat (VLA), vanilmandelična kiselina (VMA) i njihov omjer VLA/VMA mogu se analizirati u sklopu rutinske analize organskih kiselina u urinu i smatraju se potencijalnim neinvazivnim biokemijskim biljezima u postavljanju dijagnoze AADC. Cilj ovog diplomskog rada bio je odrediti referentne intervale za VLA, VMA i njihova omjera VLA/VMA u urinu retrospektivnom analizom organskih kiselina bolesnika suspektnih na neurometaboličke poremećaje. 219 obrađenih bolesnika podijeljeno je u tri dobne skupine, a uzorci su analizirani *in-house* metodom ekstrakcije organskih kiselina na sustavu za plinsku kromatografiju s masenom spektrometrijom. Kao dodatni marker korišten je N-acetiltirozin. Određivanje referentnih intervala VLA, VMA i VLA/VMA u urinu u sklopu rutinske analize organskih kiselina može pomoći u diferencijalnoj dijagnostici neurometaboličkih bolesti.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 49 stranica, 6 grafičkih prikaza, 9 tablica i 20 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Dekarboksilaza aromatskih L-aminokiselina, AADC, vanilaktična kiselina, vanilmandelična kiselina, nasljedni metabolički poremećaj

Mentor: **Prof. dr. sc. Ksenija Fumić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Ocjenjivači: **Prof. dr. sc. Ksenija Fumić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Prof. dr. sc. Roberta Petlevski, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Doc. dr. sc. Zeljka Vogrinc, naslovni docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: siječanj 2023.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Medical Biochemistry
Department of Medical Biochemistry and Hematology
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

VANILLACTIC AND VANILMANDELIC ACID – NEW BIOMARKERS IN DIAGNOSTICS OF AROMATIC L-AMINO ACID DECARBOXYLASE DEFICIENCY

Monika Polić

SUMMARY

Aromatic L-amino acid decarboxylase deficiency is rare autosomal recessive disorder that leads to severe deficit of catecholamine and serotonin. The clinical picture includes varying degree of neurological damage, including motor and neuromotor symptoms. Treatment outcomes depends on the timepoint when therapy started. Key diagnostic test for AADC confirmation are measurement neurotransmitters in cerebrospinal fluid and genetic testing. However, to perform this testing, patients are exposed to intensive lumbar puncture procedure. Determination of vanillactic acid (VLA), vanillylmandelic acid (VMA) and VLA/VMA ratio as part of organic acid analysis in urine is considered a reliable approach using non-invasive biomarkers in the diagnosis of AADC. The aim of this thesis was to determine reference intervals of VLA, VMA and VLA/VMA ratio in urine. Retrospective analysis of urinary organic acids obtained from 219 patients suspected for neurometabolic disorders were included in this study. Patients were divided into groups depending on age. Organic acids in urine were measured using in-house method by gas-chromatography mass spectrometry. As additional biomarker, N-acetyltyrosine was used. Determination of reference intervals of VLA, VMA and VLA/VMA ratio as a part of organic acids analysis in urine may help to differentiate neurometabolic patients with possible AADC deficiency from other neurometabolic disorders.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 49 pages, 6 figures, 9 tables and 20 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC, vanillactic acid, vanilmandelic acid

Mentor: **Ksenija Fumić, Ph.D.** *Full Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ksenija Fumić, Ph.D.** *Full Professor* University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Robert Petlevski, Ph.D. *Full Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Željka Vogrinc, Ph.D. *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: January 2023.