

**Donatella Čagljević**

**Usporedba koncentracija fenilalanina, tirozina i njihovih omjera (Phe/Tyr) izmjerenih na dvama tandemskim spektrometrima masa u svrhu novorođenačkog probira i praćenja metaboličke kontrole pacijenata s fenilketonurijom**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ksenije Fumić.

*Zahvaljujem mentorici, izv. prof. dr. sc. Kseniji Fumić, na ukazanom povjerenju, strpljivosti i ljubaznosti te svom znanju prenesenom tijekom izrade ovog diplomskog rada.*

*Veliko hvala i Ani i Ivi na pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela rada, kao i na svim savjetima dodijeljenim tijekom pisanja.*

*Mateju, i svim dragim prijateljima, hvala za sve vesele trenutke i najljepše uspomene iz studentskih dana.*

*Hvala mojoj obitelji, na bezuvjetnoj podršci i tijekom cijelog školovanja, i dalje.*

# Sadržaj

1. UVOD .....	1
1.1 Novorođenački probir .....	1
1.1.1 Definicija i program novorođenačkog probira .....	1
1.1.2 Povijesni pregled i kriteriji za uvođenje poremećaja u program novorođenačkog probira .....	2
1.1.3 Primjena uzoraka suhe kapi krvi na filter papiru u novorođenačkom probiru .....	4
1.1.4 Novorođenački probir u Republici Hrvatskoj .....	5
1.2 Fenilketonurija .....	6
1.2.1 Genetska pozadina .....	7
1.2.2 Patofiziologija .....	7
1.2.3 Klinička slika .....	9
1.2.4 Dijagnoza i klasifikacija .....	9
1.2.5 Terapija i terapijski ciljevi .....	10
1.2.6 Suplementacija tetrahidrobiopterinom .....	12
1.3 Tehnologija tandemске spektrometrije masa i primjena u novorođenačkom probiru .....	13
1.3.1 Opis tehnologije .....	13
1.3.2 Tandemska spektrometrija masa u probiru na fenilketonuriju .....	17
2. OBRAZLOŽENJE TEME .....	19
3. MATERIJALI I METODE .....	21
3.1 Uzorci .....	21
3.2 Materijali .....	22
3.2.1 Kemikalije .....	22
3.2.2 Oprema .....	22
3.2.3 Instrumenti .....	23

3.3	Priprema uzoraka .....	23
3.4	Analiza.....	25
3.5	Statistička obrada.....	32
4.	REZULTATI.....	34
4.1	Usporedba koncentracija fenilalanina .....	38
4.1.1	Passing Bablok regresijska analiza .....	38
4.1.2	Bland Altman analiza .....	39
4.2	Usporedba koncentracija tirozina .....	40
4.2.1	Passing Bablok regresijska analiza .....	40
4.2.2	Bland Altman analiza .....	41
4.3	Usporedba koncentracijskih omjera fenilalanina i tirozina .....	42
4.3.1	Passing Bablok regresijska analiza .....	42
4.3.2	Bland Altman analiza .....	43
5.	RASPRAVA .....	44
6.	ZAKLJUČAK .....	48
7.	LITERATURA .....	49
8.	SAŽETAK .....	53
9.	SUMMARY .....	54

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/ BASIC DOCUMENTATION CARD

# 1. UVOD

## 1.1 Novorođenački probir

### 1.1.1 Definicija i program novorođenačkog probira

Novorođenački probir označava sustav organiziranog traganja za pojedinim prirođenim bolestima u cjelokupnoj novorođenačkoj populaciji. Svrha je novorođenačkog probira što ranije otkrivanje, početak liječenja te sprečavanje trajnih i nepopravljivih posljedica po život i zdravlje oboljelih od niza rijetkih nasljednih bolesti (Petković Ramadža i sur., 2013). Jedna od brojnih prednosti novorođenačkog probira je mogućnost pre-simptomatske dijagnoze; prije nego li je uveden u rutinsku primjenu teški nasljedni poremećaji mogli su se dijagnosticirati tek nakon što klinički simptomi postanu vidljivi, a oštećenja organizma često nepovratna. Početak novorođenačkog probira seže u 1962. godinu, kada je u SAD-u uvedeno organizirano pretraživanje novorođenačke populacije na fenilketonuriju, rijetki nasljedni poremećaj u metabolizmu aminokiselina. Danas je diljem svijeta programom novorođenačkog probira obuhvaćeno preko 50 različitih poremećaja, uključujući endokrinopatije (kongenitalni hipotireoidizam, kongenitalna adrenalna hiperplazija), hemoglobinopatije, infektivne bolest (HIV, toksoplazmoza), cističnu fibrozu kao i niz drugih nasljednih metaboličkih poremećaja (Sahai i Marsden, 2009).

Probir novorođenčadi na fenilketonuriju i kongenitalni hipotireoidizam obavezna je mjera zdravstvene zaštite novorođenčadi u većini zemalja te je njegova klinička značajnost univerzalno prihvaćena (Sweetman, 2001). U razvijenijim zemljama rutinski programi probira uključuju 20 ili više poremećaja, odnosno govorimo o tzv. proširenom novorođenačkom probiru. Temelj takvog proširenja bio je razvoj tandemske spektrometrije masa, tehnologije koja omogućuje brzu i osjetljivu istovremenu analizu metabolita karakterističnih za širok spektar nasljednih poremećaja koju danas smatramo standardom u njegovom provođenju (Poourfarzam i Zadhoush, 2013; Wilcken i sur., 2003; Sweetman, 2001).

Poremećaji obuhvaćeni programom novorođenačkog probira su individualno rijetki, no mogućnost proširenja programa na i do više desetaka poremećaja u velikoj mjeri doprinosi smanjenju smrtnosti, morbiditeta i poboljšanju kliničkog ishoda, te stoga predstavlja iznimnu vrijednost za oboljele i članove njihove obitelji. Općenito se novorođenački probir smatra jednim od najuspješnijih javnozdravstvenih programa u posljednjih 50-ak godina, čije je provođenje i ekonomski isplativo za cijelu zajednicu (Sahai i Marsden, 2009).

### 1.1.2 Povijesni pregled i kriteriji za uvođenje poremećaja u program novorođenačkog probira

Početak novorođenačkog probira vezemo uz fenilketonuriju, nasljednu aminoacidopatiju karakteriziranu hiperfenilalaninemijom, odnosno povišenim razinama aminokiseline fenilalanina u krvi. Nепрепозnavanje fenilketonurije u ranoj novorođenačkoj dobi te nemogućnost primjene adekvatne terapije zbog nepoznavanja patofizioloških mehanizama u prošlosti je kod oboljele djece redovito dovodilo do brojnih neuroloških defekata, uključujući i teško intelektualno zaostajanje (van Wegberg i sur., 2017; Blau i sur., 2010; Sahai i Marsden, 2009). 1930.-ih godina norveški je liječnik Asbjørn Følling u urinu osmero intelektualno zaostale djece izolirao fenilpiruvičnu kiselinu, metabolit fenilalanina, čime je otkrivena fenilketonurija, a ujedno i začeta ideja o povezanosti metaboličkih abnormalnosti i neuroloških učinaka. 1953. godine prvi je put zabilježena učinkovitost dijete siromašne fenilalaninom u snižavanju koncentracije fenilalanina u krvi te posljedični napredak u ponašanju djeteta s fenilketonurijom (van Wegberg i sur., 2017; Williams i sur., 2008). Nadalje, 1959. godine dr. Robert Guthrie osmislio je jednostavan inhibicijski test bakterijskog rasta (engl. *bacterial inhibition assay*, BIA) za otkrivanje fenilketonurije iz uzroka suhe kapi krvi novorođenčeta (Sahai i Marsden, 2009). Mogućnost rane detekcije i postojanje adekvatne terapije u obliku dijete siromašne fenilalaninom doprinijeli su prevenciji teških intelektualnih i drugih oštećenja, a fenilketonurija je postala prva bolest kod koje je prepoznat i realiziran izniman potencijal novorođenačkog probira (Pitt, 2010; Sahai i Marsden, 2009).

S vremenom je inhibicijski test bakterijskog rasta adaptiran za analizu drugih aminoacidopatija (MSUD, homocistinurija), a uzorci suhe kapi krvi upotrebljavani su u imunokemijskim te fluorometrijskim metodama za identifikaciju dodatnih metaboličkih poremećaja (kongenitalni hipotireoidizam, KAH) (Sahai i Marsden, 2009). 1968. godine Wilson i Junger zadali su ključne kriterije koje pojedina bolest mora zadovoljiti kako bi bila uvrštena u program novorođenačkog probira te su one dugi niz godina smatrane zlatnim standardom u njegovom provođenju. Sažetak navedenih kriterija obuhvaća sljedeće:

- poremećaj predstavlja ozbiljan zdravstveni problem, a rana dijagnoza doprinosi boljitku oboljelog djeteta
- dostupni su adekvatna terapija, centri za potvrdu dijagnoze, savjetovanje obitelji i liječenje, te prikladan probirni test za navedeni poremećaj

- prirodni tijek bolesti dobro je poznat te postoji mogućnost jasnog prepoznavanja latentne ili rane simptomatske faze bolesti
- trošak probira, potvrde i liječenja poremećaja razmotren je u odnosu na trošak neprovođenja probira (Poourfarzam i Zadhoush, 2013; Pitt, 2010; Andermann i sur, 2008).

Razvoj tandemске spektrometrije masa u novije je vrijeme omogućio ubrzano proširenje programa novorođenačkog probira na još veći broj aminoacidopatija, različitih poremećaja  $\beta$  – oksidacije masnih kiselina te organskih acidurija. Mogućnost istovremene analize velikog broja analita tandemskom spektrometrijom masa bio je veliki iskorak u procesu probira u odnosu na tradicionalne metode koje su zahtijevale prilagodbu izvedbenih značajki testa za svaki pojedinačni analit. Osim toga, do danas su brojna postignuća u području molekularne dijagnostike, uključujući upotrebu DNA mikročipova, otvorila mogućnost probira novorođenčadi na stotine potencijalno patogenih mutacija (Sahai i Marsden, 2009). Ipak, unatoč nedvojbenoj korisnosti takvih molekularnih i nemolekularnih tehnologija za proširenje mogućnosti novorođenačkog probira, njihovom se primjenom otvorio niz kontroverznih pitanja poput mogućnosti otkrivanja blažih oblika bolesti koje možda nikad neće izazvati kliničke simptome, povećanje udjela lažno pozitivnih rezultata i nepotrebni psihički stres za obitelj te otežana interpretacija rezultata uz produljenje vremena do konačne dijagnoze (Petković Ramadža i sur., 2013; Andermann i sur, 2008).

Mogućnost jednostavne i relativno isplative detekcije velikog broja mutacija koje se mogu, u većoj ili manjoj mjeri očitovati i fenotipski, rezultirala je brojnim polemikama o opravdanosti uključivanja velikog broja potencijalno teških poremećaja u programe novorođenačkog probira. Zbog svega navedenog tijekom posljednjih 50 godina predložene su brojne modifikacije tradicionalnih Wilsonovih i Jungerovih kriterija, koje do danas još uvijek nisu potpuno ujednačene (Pitt, 2010; Sahai i Marsden, 2009; Andermann i sur, 2008).

2005. godine *American College of Medical Genetics* (ACMG) izdvojilo je 29 nasljednih metaboličkih poremećaja primjerenih za uključivanje u program novorođenačkog probira zahvaljujući dobrom poznavanju njihovog prirodnog tijeka te postojanju adekvatnog probirnog testa, kao i mogućnosti učinkovite terapije. Do 2007. godine sve su savezne američke države u program novorođenačkog probira uključile svih 29 izdvojenih poremećaja, od kojih je njih 20 pogodno za detekciju tandemskom spektrometrijom masa (Petković Ramadža i sur., 2013; Poourfarzam i Zadhoush, 2013).

Potrebno je provesti daljnja istraživanja kako bi se postiglo ujednačenje kriterija na globalnoj razini, a s time, među ostalim, smanjio i značajan stres obitelji pojedinca kojemu je genetičkim probirom utvrđena mutacija s neizvjesnim ishodom, tj. nedovoljno definiranih fenotipskih obilježja (Sahai i Marsden, 2009).

### **1.1.3 Primjena uzoraka suhe kapi krvi na filter papiru u novorođenačkom probiru**

Upotreba uzorka suhe kapi krvi na filter papiru za potrebe novorođenačkog probira datira još od ranih 1960-ih godina i Guthrijevog otkrića inhibicijskog testa bakterijskog rasta za probir na fenilketonuriju (Sahai i Marsden, 2009). Test detekcije fenilalanina izvodi se tako da se mali disk točno određenog promjera dobiven izrezivanjem iz originalnog uzorka krvi na filter papiru položi na površinu agaroznog medija sa sporama *B. subtilis* i B2-tienilalaninom kao inhibitorom bakterijskog rasta, u poznatim koncentracijama. Paralelno se analiziraju diskovi dobiveni iz uzoraka poznatih koncentracija fenilalanina. Fenilalanin iz uzorka tijekom inkubacije prevladava inhibicijski učinak tienilalanina na bakterijski rast, a koncentracija fenilalanina procjenjuje se usporedbom promjera uzgojenih bakterijskih kultura u ispitivanom i kontrolnim uzorcima poznatih koncentracija fenilalanina (Bodamer, 2010; Lindsay, 1972).

Iako je inhibicijski test bakterijskog rasta postupno zamijenjen sve naprednijim tehnikama detekcije fenilalanina, sakupljanje i transport uzoraka u obliku suhe kapi krvi na filter papiru ostao je do danas standardni postupak u probiru, neovisno o primijenjenoj metodi, uključujući i tehnologiju tandemske spektrometrije masa (Sahai i Marsden, 2009). Jednostavnost prikupljanja, transporta i skladištenja čine uzorke suhe kapi krvi isplativim izborom i za niz drugih kliničkih primjena (Mei i sur., 2001).

Na *Slici 1.* prikazan je izgled kartice za novorođenački probir koja se koristi u Republici Hrvatskoj. Sažeti oblik uputa za pravilno uzorkovanje suhe kapi krvi nalazi se na poledini kartice za novorođenački probir.

Budući da koncentracije pojedinih metabolita u neonatalnom razdoblju mogu značajno varirati, kako u bolesne, tako i zdrave novorođenčadi, vrlo je važno definirati prihvatljivo vrijeme uzorkovanja za novorođenački probir. U idealnom bi slučaju uzorak trebalo prikupiti dovoljno kasno da biomarkeri dosegnu patološke razine, ali i dovoljno rano da ne dođe do aktivacije patofizioloških mehanizama (Pitt, 2010). U programima novorođenačkog probira većine zemalja svijeta preporučuje se uzorkovanje provesti između 48 i 72 sata starosti (Bilandžija i sur. 2018; Pitt, 2010; Sahai i Marsden, 2009).



**5005-2903HR Kartica za neonatalni probir**

LOT

8212

2022-12

**UPUTE ZA UZORKOVANJE KRVNI ZA NOVOROĐENAČKI PROBIR**

1. Ugrijati petu prije vađenja i prema potrebi nježnim trljanjem stimulirati cirkulaciju.
2. Obrisati petu vatom umočenom u alkohol.
3. Pričekati da alkohol ishlapi i suhom sterilnom gazom obrisati mjesto uboda kako bi bilo u potpunosti suho.
4. Ubosti petu sterilnom lancetom na neko od mjesta kako je označeno na slici. Za donošenu novorođenčad koristi se lanceta koja ubada 1,8-2mm, a za manju nedonoščad može biti pliće.
5. Prvu kap krvi obrisati.
6. Pričekati da se formira slijedeća velika kap krvi.
7. Formiranu kap krvi prisloniti na središte iscrtanog kruga filter papira na kartici pazeći da koža ne dodirne filter papir.
8. Pustiti da kap natopi cijeli krug na filter papiru pazeći da krv u potpunosti proдре na drugu stranu. Ukoliko jedna kap ne ispunji cijeli krug, nova kap se smije nanijeti na isto mjesto istog kruga jedino ukoliko druga kap dolazi nakon prethodne bez prekida.
9. Treba nastojati da svi krugovi budu potpuno nakapani. Ukoliko je to nemoguće, nakapati ispravno barem 2 kruga.
10. Tako nakapane kartice pustiti da se potpuno osuše, minimalno 3 sata na sobnoj temperaturi bez direktnog utjecaja svjetla, topline i kontakta s drugim karticama.
11. Osušene kartice staviti u plastične folije i što prije poslati u laboratorij u pripremljenim omotnicama.

Kontakt telefon: 01 23 76 412  
e-mail: novorodjenacki.probir@kbc-zagreb.hr

Nakapati sve krugove samo s jedne strane dok krv ne proдре na drugu stranu, osušiti i spremiti u omotnicu.

MOLIMO PISATI VELIKIM, TISKANIM SLOVIMA, PAŽLJIVO PROČITATI UPUTE NA POLJEDINI.

Podaci o majci:

Prezime majke: \_\_\_\_\_

Djevojačko prezime majke: \_\_\_\_\_

Ime majke: \_\_\_\_\_

Adresa (ulica, broj, mjesto): \_\_\_\_\_

Poštanski broj: \_\_\_\_\_

Telefon: \_\_\_\_\_

Podaci o ustanovi:  
ŽIG USTANOVE - RODILIŠTA

Telefon: \_\_\_\_\_

Podaci o djetetu:

Prezime djeteta: \_\_\_\_\_

Ime djeteta: \_\_\_\_\_

Datum rođenja: \_\_\_\_\_

dan    mј.    god.    sat

Spol: M  Z

Porodajna masa (kg): \_\_\_\_\_

Gestacijska doba (tjedni): \_\_\_\_\_

Datum i vrijeme uzimanja uzorka  
dan    mј.    god.    sat

Popis osobe odgovorne za uzorkovanje:

Ime djeteta: \_\_\_\_\_

Datum prvog mliječnog obroka  
dan    mј.    god.

glukoza

Infuzija: aminokiseline

lipidi

Korisne informacije:  
Ugroženo dijete:

Žutica:

Antibiotici:

Transfuzije krvi:

*Slika 1: Izgled kartice za novorođenački probir. S lijeve strane prikazana je poleđina kartice s opisanim uputama za uzorkovanje. S desne strane nalazi se prednja strana kartice s četiri iscrtana kruga na filter papiru koja predstavljaju mjesta za prikupljanje uzorka suhe kapi krvi te prostorom za unos svih potrebnih podataka o majci i novorođetu. (preuzeto i prilagođeno prema Bilandžija i sur., 2018)*

### 1.1.4 Novorođenački probir u Republici Hrvatskoj

Novorođenački probiru Republici Hrvatskoj provodi se centralizirano, u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku, Kliničkog bolničkog centra Zagreb. Probir na fenilketonuriju provodi od 1978. godine, a na konatalnu hipotireozu od 1985. Od 1986.

godine novorođenački je probir uvršten u obavezne mjere zdravstvene zaštite novorođenačadi te obuhvaća svu novorođenačad rođenu u Republici Hrvatskoj, zdravu ili bolesnu terminsku novorođenačad i nedonoščađ. Od kraja 2002. godine u Republici Hrvatskoj provodi se i program probira za rano otkrivanje oštećenja sluha procjenom evociranih otoakustičnih potencijala, koji je od 2006. uvršten u obaveznu mjeru zdravstvene zaštite (Petković Ramadža i sur., 2013).

Uvođenjem tehnologije tandemске spektrometrije masa u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir krajem 2017. godine omogućeno je proširenje novorođenačkog probira na još šest rijetkih nasljednih metaboličkih poremećaja. Uz fenilketonuriju i kongenitalnu hipotireozu obuhvaćena su još tri nasljedna poremećaja razgradnje masnih kiselina: nedostatak acil-CoA-dehidrogenaze srednjih lanaca, nedostatak 3-OH-acil-CoA-dehidrogenaze dugih lanaca (izdvojen ili kao dio manjka trifunkcionalnog proteina), nedostatak acil-CoA-dehidrogenaze vrlo dugih lanaca, te nedostatak karnitinskog nosača, izovalerična aciduriju i glutarna acidurija tipa I (Bilandžija i sur., 2018).

## 1.2 Fenilketonurija

Fenilketonurija je rijetki nasljedni poremećaj u metabolizmu esencijalne aminokiseline fenilalanina. Najčešća je aminoacidopatija među rijetkim nasljednim metaboličkim poremećajima s različitom prevalencijom ovisno o geografskom položaju (Yudkoff, 1999). Procijenjena srednja frekvencija pojavnosti u Europi iznosi 1:10 000 novorođenačadi, sa znatno višim incidencijama u Irskoj (1:4500) ili Turskoj (1:2600), odnosno s vrlo niskom incidencijom u Finskoj, gdje iznosi < 1: 100 000 (Vockley i sur., 2013; Blau i sur., 2010; Williams i sur., 2008). U Republici Hrvatskoj incidencija fenilketonurije iznosi 1: 8500 novorođene djece (Petković Ramadža i sur., 2013).

Poremećaj je najčešće uzrokovan nedostatnom funkcijom fenilalanin-hidroksilaze (engl. *phenylalanine hydroxylase*, PAH), enzima ključnog za pretvorbu L-fenilalanina u L-tirozin u normalnom procesu metabolizma slobodnih aminokiselina u organizmu. Smanjena aktivnost fenilalanin-hidroksilaze posljedica je mutacije u *PAH* genu koji kodira za istoimeni enzim, a nasljeđuje se autosomno recesivno (van Wegberg i sur., 2017; Williams i sur., 2008). Kao posljedica gubitka fenilalanin-hidroksilazne aktivnosti dolazi do povišenja koncentracije fenilalanina i smanjenja koncentracije tirozina što se očituje toksičnim učincima u mozgu (Blau i sur., 2010).

Neprepoznata i neliječena fenilketonurija može rezultirati ireverzibilnim intelektualnim oštećenjima, motoričkim smetnjama te psihijatrijskim simptomima. Ipak, zahvaljujući mogućnosti ranog otkrivanja fenilketonurije programima novorođenačkog probira te pravovremenom uvođenju fenilalanin restriktivne dijeta moguće je prevenirati većinu neuropsiholoških komplikacija te djeci s fenilketonurijom osigurati normalan život (van Wegberg i sur., 2017; Blau i sur., 2010; Williams i sur., 2008).

### **1.2.1 Genetska pozadina**

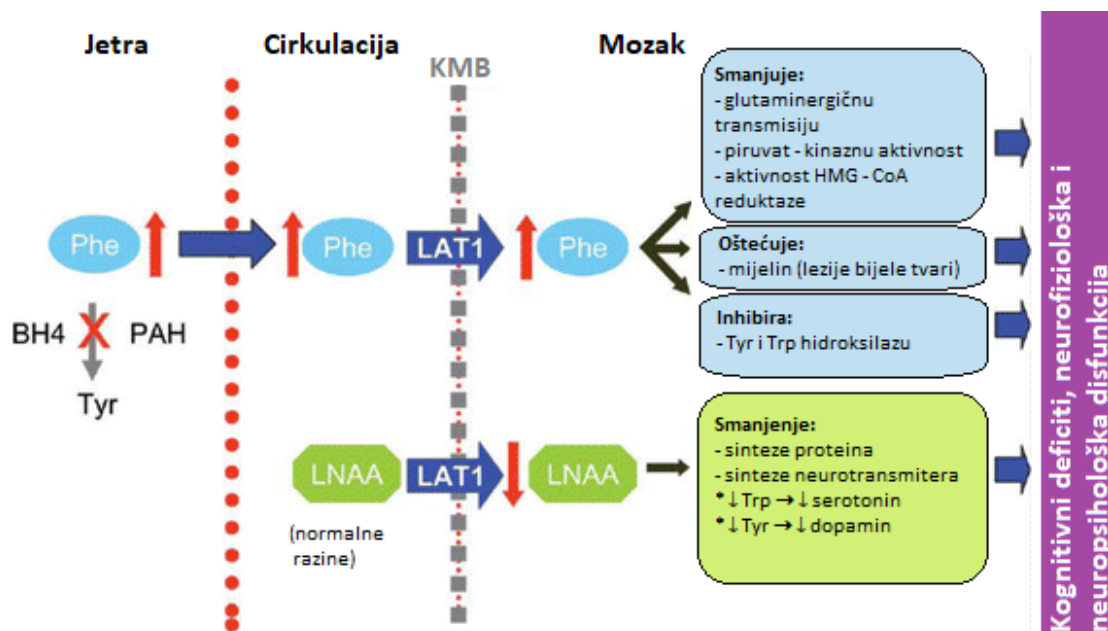
Gen za fenilalanin-hidroksilazu smješten je kromosomu 12q23 i sadrži trinaest eksona i dvanaest introna raspoređenih na 100 kilobaza genetičke upute (Williams i sur., 2008; van Wegberg i sur., 2017). Do danas je otkriveno više od 1000 varijanti PAH gena (<http://www.biopku.org/home/pah.asp>). Pozicija i vrsta mutacije utječu na stupanj aktivnosti PAH enzima koji onda određuje fenotip hiperfenilalaninemije. Najčešće mutacije koje vežemo uz pojavu fenilketonurije jesu tzv. *missense* mutacije, odnosno supstitucije jednog baznog para koje dovode do translacije i ugradnje drugačije aminokiseline u proteinski lanac, uzrokujući konačno pogrešno smatanje enzima i/ili smanjenje njegove katalitičke funkcije (van Wegberg i sur., 2017; Vockley i sur., 2013).

Mutacije koje rezultiraju minimalnom PAH aktivnošću ili njezinim potpunim odsustvom odgovaraju fenotipu takozvane klasične fenilketonurije. Neke mutacije uzrokuju samo parcijalnu inhibiciju enzimske aktivnosti koja se onda očituje blažim oblicima fenilketonurije, odnosno hiperfenilalaninemije. Budući da se radi o poremećaju koji se nasljeđuje autosomno recesivno pojedinci s mutacijom na jednom od dva alela samo su nosioci bolesti, odnosno ne pokazuju nikakve biokemijske ili kliničke karakteristike fenilketonurije (Blau i sur., 2010).

### **1.2.2 Patofiziologija**

Deficijentna aktivnost PAH enzima dovodi, dakle, do potpune ili djelomične nemogućnosti pretvorbe fenilalanina (podrijetlom iz hrane ili kao proizvoda katabolizma proteina) u drugu aminokiselinu, tirozin. Kao rezultat, fenilalanin se u krvi bolesnika nakuplja u povišenim koncentracijama, prelazi krvno moždanu barijeru te dovodi do štetnih učinaka po razvoj i funkciju mozga. Iako patofiziologija neuroloških oštećenja još uvijek nije detaljno razjašnjena, predloženo je nekoliko mogućih mehanizama (van Spronsen i sur., 2017).

Prijelaz fenilalanina kroz krvno-moždanu barijeru posredovan je transporterom velikih neutralnih L-aminokiselina (engl. *large neutral aminoacid carrier L-aminoacid transporter 1*, LAT1), koji uz fenilalanin prenosi i tirozin, prekursor dopamina i noradrenalina, te triptofan, prekursor serotonina. Visoke koncentracije fenilalanina u krvi blokiraju ulazak preostalih dviju aminokiselina u mozak, posljedično dovodeći do njihove smanjene raspoloživosti za intratekalnu sintezu proteina te neurotransmitterske neravnoteže. Drugi pretpostavljeni mehanizmi neuroloških oštećenja uzrokovanih fenilalaninom uključuju oštećenje mijelinske ovojnice, inhibiciju tirozin- i triptofan-hidroksilaze, smanjenje aktivnosti piruvat kinaze, ometanje glutaminičke neurotransmisije, smanjenje aktivnosti 3-hidroksi-3-metilglutaril koenzim A reduktaze (Blau i sur., 2010).



**Slika 2:** Patofiziologija fenilketonurije. Na slici su sumirani potencijalni mehanizmi neurokognitivnih oštećenja u fenilketonuriji uzrokovani visokim koncentracijama aminokiseline fenilalanina zbog smanjene aktivnosti fenilalanin-hidroksilaze. Kratica Phe označava fenilalanin, LNAA velike neutralne L-aminokiseline, a LAT1 njihov zajednički transporter kroz krvno- moždanu barijeru (KMB). Oštećenja nastaju kao izravna posljedica visokih koncentracija fenilalanina u mozgu ili posredno, zbog smanjenog unosa ostalih velikih neutralnih L-aminokiselina. (preuzeto i prilagođeno prema van Wegberg i sur., 2017)

U rijetkim slučajevima PKU može biti uzrokovana poremećajem u metabolizmu tetrahydrobiopterina (engl. *tetrahydrobiopterin*, BH<sub>4</sub>), kofaktora reakcije fenilalanin-hidroksilaze u kojoj sudjeluje kao proton donor. U reakciji hidroksilacije fenilalanina, BH<sub>4</sub> se oksidira do 4a-hidroksi međuprodukta koji se zatim regenerira do BH<sub>4</sub> uz djelovanje enzima

karbinolamin-4a-dehidrataze te dihidropteridin-reduktaze. BH<sub>4</sub> se u organizmu sintetizira iz gvanozin-trifosfata u reakcijama kataliziranim trima dodatnim enzimima. Varijante gena koji kodiraju za pojedine enzime u sintezi BH<sub>4</sub> dovest će do BH<sub>4</sub> deficijencije. BH<sub>4</sub> je, osim reakcije hidroksilacije fenilalanina, važan kofaktor i u reakcijama hidroksilacije aminokiselina tirozina i triprofana, ključnim u sintezi neurotransmitera dopamina te serotonina. Ispitivanje poremećaja sinteze i regeneracije BH<sub>4</sub> trebalo bi se provesti kod sve novorođenčadi kod koje su probirom utvrđene povišene koncentracije fenilalanina (van Spronsen i sur., 2017; Vockley i sur., 2013).

### **1.2.3 Klinička slika**

Prvih nekoliko dana, odnosno tjedana života novorođenčad s fenilketonurijom ne pokazuje očite kliničke simptome; katkad se uočavaju teškoće u hranjenju i letargija. Nadalje, ako se s primjenom terapije ne započne upravo u prvih nekoliko tjedana, bolest se nakon nekoliko mjeseci života očituje ozbiljnim ireverzibilnim intelektualnim oštećenjima. Stoga je do 1960-ih godina, prije mogućnosti provođenja novorođenačkog probira, većina djece s fenilketonurijom razvila tešku mentalnu zaostalost, s prosječnim kvocijentom inteligencije manjim od 50. Ostali neurološki simptomi neprepoznate te neliječene fenilketonurije uključuju napadaje u oko četvrtine oboljelih, devijantno ponašanje (agresivnost, hiperaktivnost), motoričke smetnje (loša koordinacija i nespretnost u hodu) te psihijatrijske simptome. Javlja se mikrocefalija te nepravilno držanje, a moguće i mučnina te povraćanje. Ekskrecija fenilalanina te njegovih metabolita u suvišku uzrokuje karakterističan miris urina i znoja oboljelih, koji potječe od fenilacetatne kiseline, a javljaju se i ekcemi, odnosno upalne promjene na koži karakterizirane crvenilom, svrbežom i oteklinama. Niske razine tirozina u fenilketonuriji odgovorne su za karakterističnu hipopigmentaciju kože, kose i očiju (<https://rarediseases.org>; Regier i Greene, 2017; Blau i sur., 2010; Yudkoff, 1999).

### **1.2.4 Dijagnoza i klasifikacija**

Nalaz povišenih koncentracija fenilalanina pri novorođenačkom probiru prvi ukazuje na mogućnost da novorođenče boluje od fenilketonurije, ali još nije dovoljno specifičan za postavljanje dijagnoze. Povišene razine fenilalanina u ponovljenom mjerenju zahtijevaju žurno obavještanje liječnika i roditelja te provođenje dodatnih diferencijalno dijagnostičkih postupaka. Konačna dijagnoza postavlja se na temelju kliničke slike i pozitivnog nalaza fenilpiruvične kiseline u urinu, povišenih koncentracija fenilalanina u mokraći, normalnih ili

snižene koncentracije tirozina u krvi i ostalih diferencijalno-dijagnostičkih postupaka (Williams i sur., 2008).

Klasifikacija fenilketonurije uobičajeno se temelji na težini hiperfenilalaninemije. Normalnim rasponom koncentracija fenilalanina u krvi smatra se 50 – 110  $\mu\text{mol/L}$  (Blau i sur., 2010). Ovisno o najvišoj izmjerenoj koncentraciji fenilalanina pri kliničkoj dijagnozi, a prije primijenjene terapije, uvriježena je podjela fenilketonurije na težak ili klasičan ( $>1200 \mu\text{mol/L}$ ), umjeren (600 – 1200  $\mu\text{mol/L}$ ) i blag (360 – 600  $\mu\text{mol/L}$ ) oblik, a kao dodatna se kategorija ističe se i tzv. blaga hiperfenilalaninemija ( $< 360 \mu\text{mol/L}$ ). Fenotipizacija pacijenata temeljena na navedenim kategorijama prisutna je danas u većini dijagnostičkih centara za fenilketonuriju (Campistol i sur., 2011). Međutim, s obzirom na činjenicu da navedeni rasponi i granične vrijednosti u praksi znatno variraju, a uzorci krvi za probir novorođenčadi na fenilketonuriju su često prikupljeni i prije nego fenilalanin dosegne svoje vršne koncentracije u krvi, navedena je klasifikacija upitne pouzdanosti te je potrebno napraviti prilagodbu graničnih vrijednosti pojedinoj novorođenačkoj populaciji (van Spronsen i sur., 2017; Campistol i sur., 2011).

2011. godine predložena je shema koja pacijente sa smanjenom aktivnošću fenilalanin-hidroksilaze kategorizira ovisno o nužnosti primjene terapije za održavanje koncentracije fenilalanina u dozvoljenim rasponima. U skladu s time razlikujemo pacijente kojima nije potrebna terapija, odnosno skupine kojima je za održavanje prihvatljivih koncentracija fenilalanina potrebna dijetoterapija, terapija tetrahidrobiopterinom ili oboje (van Wegberg i sur., 2017).

### **1.2.5 Terapija i terapijski ciljevi**

Temeljni terapijski cilj u fenilketonuriji je održavanje koncentracije fenilalanina u krvi unutar dozvoljenih raspona, odnosno izbjegavanje akutne ili kronične hiperfenilalaninemije koja bi mogla doprinijeti pogoršanju neuroloških simptoma. (Giovannini i sur., 2012) S terapijom je potrebno početi što ranije, po mogućnosti već u prvom tjednu nakon rođenja, s ciljem normalizacije koncentracije fenilalanina unutar dva tjedna. Kod svih se pacijenata preporučuje koncentraciju fenilalanina održavati u rasponu 120 – 360  $\mu\text{mol/L}$  (Vockley i sur., 2013). Pravodobnim uvođenjem djeteta s niskim udjelom fenilalanina te ispravnim pridržavanjem iste, ako je potrebno i tijekom cijelog života, moguće je postići vrlo dobru kontrolu koncentracije fenilalanina u krvi i tako osigurati normalan rast i razvoj, uključujući i normalan intelektualni razvoj (Blau i sur., 2010; Williams i sur., 2008).

Unatoč činjenici da povišene koncentracije fenilalanina nakon razdoblja ranog djetinjstva (nakon 12. god.) imaju znatno manji učinak na oštećenje mozga, dokazano je i kako zbog gubitka metaboličke kontrole u odrasloj dobi dolazi do pojave brojnih neuropsiholoških te neurofizioloških disfunkcija koje u konačnici mogu dovesti do smanjenog učinka u školi ili na radnom mjestu. Također, iako se pridržavanjem adekvatne dijetoterapije u potpunosti preveniraju ozbiljnija neurološka oštećenja, kod takvih će pacijenta i dalje biti moguće detektirati neke suptilnije neurološke deficite kao što su teškoće u planiranju, procesuiranju informacija ili održavanju koncentracije (Giovannini i sur., 2012; Blau i sur., 2010).

Optimalan terapijski pristup novorođenčadi s fenilketonurijom diktiraju bazalne koncentracije fenilalanina, izmjerene u uvjetima bez primijenjene terapije. U skladu s time, usuglašeno je kako koncentracije fenilalanina u krvi manje od 360  $\mu\text{mol/L}$  ne zahtijevaju terapijsku intervenciju, dok je za koncentracije veće od 600  $\mu\text{mol/L}$  ona nužna. Za bazalne koncentracije između 360 i 600  $\mu\text{mol/L}$  preporučuje se dijetoterapiju primijenjivati do dvanaeste godine života, dok se u slučaju koncentracija većih od 600  $\mu\text{mol/L}$  preporučuje doživotna restrikcija fenilalanina u prehrani, usprkos svijesti o značajnom teretu kojeg takva dijeta predstavlja (van Spronsen i sur., 2017).

Neliječena ili slabo kontrolirana fenilketonurija u trudnica predstavlja posebno osjetljiv zdravstveni problem zbog teratogenog učinka visokih koncentracija fenilalanina na plod te visokog rizika od pobačaja. Koncentracije fenilalanina u krvi majke do 900  $\mu\text{mol/L}$  gotovo uvijek rezultiraju mentalnom zaostalosti djeteta i mikrocefalijom te često poremećajima intrauterinog razvoja i urođenim srčanim manama. Stoga je u žena koje planiraju začće te trudnica potrebno koncentracije fenilalanina strogo održavati ispod 360  $\mu\text{mol/L}$ , odnosno u optimalnom rasponu koncentracija 120 – 360  $\mu\text{mol/L}$ . U skladu s time preporuča se koncentracije fenilalanina pratiti jednom tjedno u razdoblju prije začća te dva puta tjedno tijekom trudnoće (van Spronsen i sur., 2017; Blau i sur., 2010; Williams i sur., 2008).

Dijetoterapijski pristup fenilketonuriji sačinjavaju tri osnovna principa. Prvi, restrikcija unosa hrane bogate proteinima, temelji se na individualnoj toleranciji fenilalanina, odnosno količini unesenog fenilalanina izraženoj kao „mg phe/kg tjelesne mase/dan“, pri kojoj se održavaju prihvatljive razine fenilalanina u krvi. Ovakav je pristup nužan zbog interindividualnih razlika u aktivnosti fenilalanin-hidroksilaze. Generalno, takva restrikcija nalaže eliminaciju svih životinjskih proteinskih izvora, mahunarki i orašastih plodova te

ograničen unos kruha, riže, tjestenine te dijela povrća. Drugi princip vezan je uz primjenu sintetskih L-aminokiselinskih suplemenata bez fenilalanina za osiguravanje dnevnih potreba za proteinima, ali i vitaminima te mineralima, čiji je „prirodni“ unos zbog primjene restriktivne dijeta također smanjen. I treće, unos hrane s niskim sadržajem proteina za osiguranje adekvatnih potreba za energijom, ali i minimalnih koncentracija fenilalanina kao esencijalne aminokiseline važne u održavanju pravilnog rasta te ravnoteže ukupnog anabolizma i katabolizma proteina (van Spronsen i sur., 2017; MacLeod i sur., 2009).

### **1.2.6 Suplementacija tetrahidrobiopterinom**

Iako je dijeta s ograničenjem unosa fenilalanina već dugi niz godina zlatni standard u metaboličkoj kontroli fenilketonurije, u posljednjih se petnaestak godina pozornost nastojilo usmjeriti i na neke nedijetalne oblike terapije, s ciljem smanjenja izvjesnog psihosocijalnog opterećenja za bolesnika, kao i rizika od nutritivnih deficita. U skladu s time, u nizu studija pokazalo se kako kod određenog broja pacijenata s fenilketonurijom terapija kofaktorom fenilalanin – hidroksilaze, tetrahidrobiopterinom (BH<sub>4</sub>), ima povoljne učinke u smislu smanjivanja koncentracije fenilalanina u krvi. Osim toga, primjenom iste uočena je i povećana tolerancija na prehranu koja sadrži fenilalanin. Farmaceutska formulacija tetrahidrobiopterina odobrena od strane FDA te EMA, komercijalnog imena Kuvan®, sadrži u svome sastavu sapropterin dihidroklorid (6R-enantiomer tetrahidrobiopterina) koji djeluje poput farmakološkog šaperona u stabilizaciji fenilalanin-hidroksilazne strukture, čime dokazano doprinosi poboljšanoj regulaciji hiperfenilalaninemije u slučajevima tzv. fenilketonurije osjetljive na tetrahidrobiopterin (engl. *BH4 responsiveness*) (Anjema i sur., 2013; Burton i sur., 2007). Takav povoljan odgovor na terapiju tetrahidrobiopterinom zabilježen je u određenom postotku pacijenata s blagim, umjerenim, ali i klasičnim, težim oblikom fenilketonurije, s time da je u nekoliko studija najveći udio povoljnog odgovora zabilježen upravo kod pacijenata s bazalnim koncentracijama fenilalanina manjim od 600 µmol/L (Burton i sur., 2007). Unatoč teškoćama u standardizaciji samog testa za utvrđivanje skupine pacijenata koji bi pouzdano mogli profitirati od terapije tetrahidrobiopterinom, povoljan odgovor zabilježen u širokom spektru genotipa i fenotipa pacijenata s fenilketonurijom ukazuje na to da se sapropterin, u dozi prethodno prilagođenoj pojedinom pacijentu, može smatrati vrijednom terapijskom alternativom, odnosno nadopunom postojeće dijetoterapije u dugoročnoj kontroli hiperfenilalaninemije (van Spronsen i sur., 2017; Anjema i sur., 2013; Burton i sur., 2007).



### **1.3 Tehnologija tandemске spektrometrije masa i primjena u novorođenačkom probiru**

Primjena tehnologije tandemске spektrometrije masa uz korištenje uzoraka suhe kapi krvi na filter papiru u svrhu novorođenačkog probira prvi je put predložena još 1990. godine (Sweetman, 2001). Upotreba ove tehnologije u svrhu detekcije metaboličkih poremećaja u novorođenčadi smatra se jednim od najvećih unaprjeđenja u procesu novorođenačkog probira od Gütthriejevog otkrića inhibicijskog testa bakterijskog rasta za otkrivanje fenilketonurije (Chace i sur., 2003). Princip istovremene analize i detekcije velikog broja metabolita u kratkom roku i u istom uzorku suhe kapi krvi svojstven tandemskoj spektrometriji masa omogućio je proširenje programa novorođenačkog probira na čitav niz bolesti, metaboličkih, endokrinoloških, infektivnih i drugih (Sahai i Marsden, 2009). Također, u odnosu na tradicionalne metode, tehnologija je znatno više specifičnosti i osjetljivosti, te stoga unatoč povećanom broju poremećaja obuhvaćenim probirom govorimo o značajnom smanjenju stope lažno pozitivnih rezultata (Chace i sur., 2003; Levy, 1998).

Višekomponentna analiza omogućuje evaluaciju analita od interesa u odnosu prema ostalim sastavnicama, što dodatno pridonosi dijagnostičkoj specifičnosti (Levy, 1998). Tehnologija je osobito visoke specifičnosti i osjetljivosti za detekciju dviju metaboličkih bolesti s visokim incidencijama, MCAD i fenilketonuriju (Chace i sur., 2003). Budući da analiza zahtijeva minimalnu količinu izvornog uzorka suhe kapi krvi na filter papiru, većina uzorka ostaje raspoloživa za daljnja testiranja bez potrebe za ponovnim uzorkovanjem, što je osobito važno pri novorođenačkom probiru (Levy, 1998). Iako u usporedbi s drugim analizatorima u rutinskim kliničkim laboratorijima zahtijeva znatno višu početnu investiciju, troškovi pojedinačne analize tandemskim spektrometrom masa su relativno niski (Ho i sur., 2003). Zbog svega navedenog, tandemska spektrometrija masa smatra se iznimno korisnim alatom za procjenu metaboličkog statusa, uključujući detekciju nasljednih metaboličkih poremećaja novorođenačkim probirom kao i ispitivanje učinaka nasljednih poremećaja ili farmakoloških intervencija na intermedijarni metabolizam (Chace i Kalas, 2005).

#### **1.3.1 Opis tehnologije**

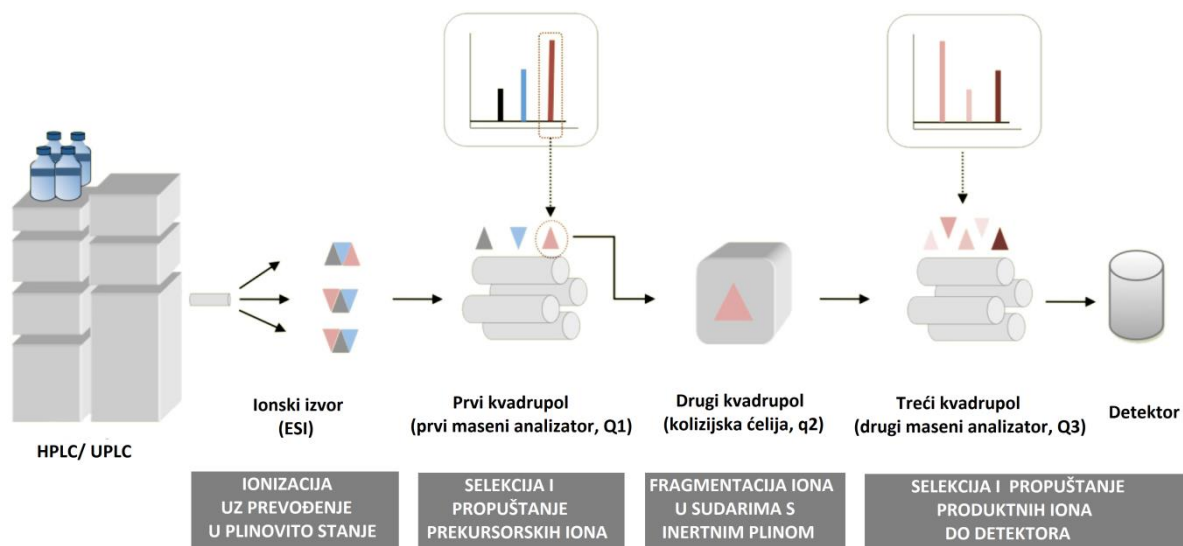
Spektrometrija masa analitička je tehnika kojom je moguće otkriti strukturne, kvalitativne, te kvantitativne informacije o analitima od interesa. Razlike u kretanju nabijenih čestica pod utjecajem magnetskog i električnog polja, ovisno o njihovom specifičnom omjeru mase i naboja, čini osnovni princip razdvajanja i detekcije analita masenom spektrometrijom.

Rezultati detekcije prikazuju se u grafu, tzv. masenom spektru (Chace i Kalas, 2005; Ho i sur., 2003).

Temeljne tehnološke značajke tandemske spektrometrije masa razvijene 1990.-ih godina za primjenu u analizi metabolita prisutne su i danas. Tandemski spektrometar masa sastoji se od pet osnovnih komponenti: ionizacijskog izvora, prvog masenog analizatora (MS1), kolizijske ćelije, drugog masenog analizatora (MS2) te detektora (Chace i sur., 2003).

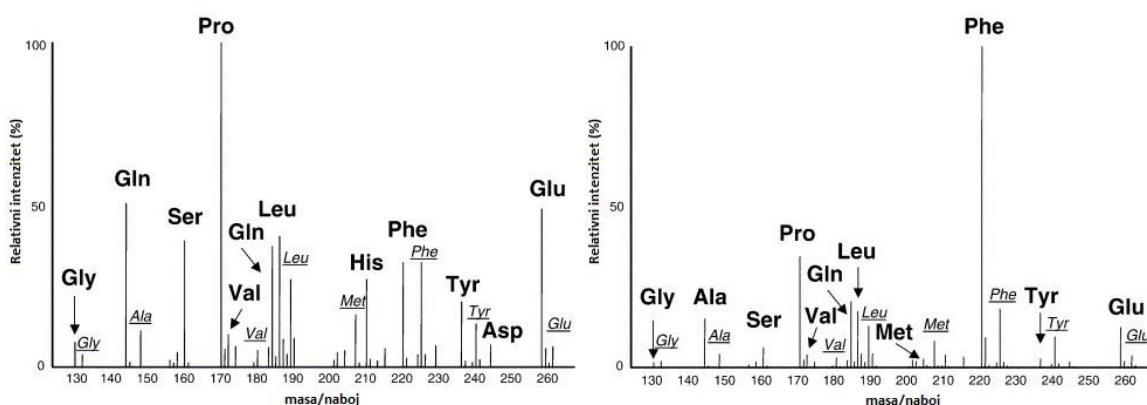
Uzorak koji želimo analizirati masenim analizatorima potrebno je prethodno ionizirati te prevesti u plinovito stanje. To se postiže nekolicinom ionizacijskih tehnika. Tandemska spektrometrija koja kao ionizacijsku tehniku koristi tzv. elektrosprej ionizaciju (ESI) pokazala se vrlo efikasnom za primjenu u kliničkim laboratorijima. Elektrosprej ionizacija osigurava osjetljivu, robusnu i pouzdanu analizu nehlapljivih i termolabilnih analita u femtomolarnim koncentracijama i iz mikrolitarskih volumena. Udruživanjem ESI-tandemske spektrometrije masa s npr. tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti (UPLC), omogućuje se pouzdana identifikacija malih i velikih molekula različitih polarnosti iz kompleksnog biološkog uzorka i u vrlo kratkom roku (Ho i sur., 2003).

U kliničkim je laboratorijima danas najraširenija upotreba kvadrupol masenih analizatora, koje najčešće čini sustav od tri uzastopna kvadrupola (Ho i sur., 2003). Svaki se kvadrupol sastoji se od četiri paralelne metalne šipke; parovi nasuprotnih šipki povezani su na različite izvore električnog napona. Takav postav osigurava postojanje magnetskog polja kojim se prolazak kroz kvadrupol omogućuje samo ionima određenog omjera mase i naboja, dok se nabijene čestice drugačijeg omjera mase i naboja gube u sudarima sa šipkama (Al Riyami i sur., 2012; Sahai i Marsden, 2009; Ho i sur., 2003). Princip analize na ESI-tandemskom spektrometru masa s trostrukim kvadrupolom opisan je na *Slici 3*.



**Slika 3:** Shematski prikaz ESI tandemskog spektrometra masa udruženog sa sustavom tekućinske kromatografije. Nakon razdvajanja komponenti tekućinskom kromatografijom uzorak se u ionizatoru pod visokim naponom raspršuje u sitne kapljice te postupnim isparavanjem tekućine pretvara u plinovite molekulske ione pojedinih analita. Ioni se zatim uvode u prvi maseni analizator (Q1) u kojem se dalje propuštaju svi ili samo ioni određenog omjera mase i naboja, karakterističnog za biomolekule od interesa. U drugom kvadrupolu dolazi do fragmentacije propuštenih iona, a u trećem se kvadrupolu do detektora ponovno mogu propustiti samo karakteristični fragmenti molekulskih iona koje želimo detektirati. (preuzeto i prilagođeno s [www.creative-proteomics.com](http://www.creative-proteomics.com))

Signal dobiven dolaskom iona na detektor pridružuje se odgovarajućem omjeru mase i naboja, i prikazuje u obliku masenog spektra. Maseni spektar zapravo je grafički prikaz relativnog broja nabijenih čestica s određenim omjerom mase i naboja; omjer mase i naboja kojeg poprima najveći broj čestica definira se najčešće kao 100%-tni signal, u odnosu na kojeg se izražava udio preostalih iona (Chace i sur., 2003; Ho i sur., 2003).



**Slika 4:** Maseni spektri butil estera aminokiselina dobiveni Neutral Loss scan-om na tandemskom spektrometru iz uzoraka suhe kapi krvi na filter papiru. Lijevi spektar pripada zdravom novorođenčetu, a desni novorođenčetu s fenilketonurijom (izražen signal fenilalanina). Horizontalna os predstavlja omjere masa i naboja, a vertikalna intenzitete signala pojedinih iona izražene kao postotak najvećeg intenziteta u spektru. Interni standardi pojedinih aminokiselina označeni su u kurzivu. (preuzeto i prilagođeno prema Chace i Kalas, 2005)

Budući da postoji mogućnost da je masa analita kojeg želimo identificirati identična masi neke druge komponente u originalnom uzorku, tehnologiju spektrometrije masa je u svrhu poboljšanja specifičnosti moguće kombinirati s dodatnom separacijskom tehnikom. Separacija i ukoncentriravanje analita od interesa koje prethodi razdvajanju u masenom analizatoru se može se provesti plinskom ili tekućinskom kromatografijom (Chace i Kalas, 2005). Kako kromatografska odjeljivanja mogu znatno produžiti vrijeme analize, u posljednjih je dvadesetak godina kao alternativa predstavljena tzv. protočno-injekcijska analiza (engl. *Flow injection analysis*, FIA). Kombinacije FIA i tandemskog spektrometra masa često se upotrebljava za analizu acilkarnitina i aminokiselina iz uzoraka suhe kapi krvi za potrebe novorođenačkog probira (Niesser i sur., 2012; assets.thermofisher.com).

Kvantifikacija analita od interesa u tandemskoj spektrometriji masa omogućena je upotrebom internih standarda. Interni standard je spoj koji kemijskom strukturom nalikuje analitu, ali se od njega razlikuje u masi za tri ili više jedinica (daltona). Uobičajeno se sintetizira inkorporacijom stabilnih izotopa u analit, npr. zamjenom nekoliko atoma vodika njihovim izotopom deuterijem. Ako takav interni standard nije dostupan, moguće je upotrijebiti i drugu molekulu slične strukture. Interni standard paralelno s pripadajućim analitom prolazi proces pretpripreme i analize, čime se kompenzira eventualni gubitak analita tijekom procesa te varijabilna osjetljivost spektrometra masa (Chace i Kalas, 2005; Ho i sur., 2003).

U kvantitativnoj se analizi signal za pojedini analit prikazuje u ovisnosti o retencijskom vremenu, odnosno vremenu potrebnom za dolazak iona do detektora. Na temelju omjera površina signala analita i internog standarda moguće je uz pomoć kalibracijske krivulje izračunati koncentraciju analita od interesa (Al Riyami i sur., 2012; Sahai i Marsden, 2009).

Primjenom različitih tipova skeniranja analita u masenim analizatorima moguće je selektirati i u daljnju analizu propuštati fragmente točno određenog omjera mase i naboja, karakteristične za pojedine skupine bioloških molekula, poput acilkarnitina i aminokiselina. Opisani princip čini ovu tehnologiju iznimno pogodnom za proces novorođenačkog probira na nasljedne metaboličke bolesti, uključujući i probir na fenilketonuriju (Chace i Kalas, 2005; Ho i sur., 2003).

### 1.3.2 Tandemska spektrometrija masa u probiru na fenilketonuriju

Dva ključna metabolita u otkrivanju fenilketonurije primjenom tandemске spektrometrije masa jesu aminokiseline fenilalanin i tirozin. Druge metabolite povezane s metabolizmom fenilalanina, fenilketone, zbog nedovoljne osjetljivosti metode nije moguće detektirati MS/MS-om (Chace i Kalas, 2005). Nalaz hiperfenilalaninemije, odnosno koncentracija fenilalanina iznad granične vrijednosti pri novorođenačkom probiru prva ukazuje na mogućnost fenilketonurije te je u tom slučaju potrebno ponoviti određivanje iz uzorka suhe kapi krvi ili plazme. Većina laboratorija za novorođenački probir definira vlastite granične vrijednosti prema kojima se donosi odluka o daljnjoj evaluaciji pacijenta (Vockley i sur., 2013; Bodamer, 2010).

Pozitivan probirni test, tj. nalaz hiperfenilalaninemije zahtijeva brzu proširenu evaluaciju stanja novorođenačeta, uzimajući u obzir klinički status, dob i primijenjenu dijetu do trenutka uzorkovanja. Uzorke koji služe za potvrdu dijagnoze fenilketonurije potrebno je uzeti prije uvođenja fenilalanin restriktivne dijetе. Osim ponovne kvantifikacije fenilalanina, testovi za fenilketonuriju uključuju kvantifikaciju tirozina, izračunavanje omjera molarnih koncentracija fenilalanina i tirozina te kompletan profil aminokiselina. Budući da koncentracije fenilalanina u djeteta s fenilketonurijom rastu s brojem obroka, a koncentracije tirozina opadaju, očekuje se povećanje koncentracije fenilalanina u ponovljenom uzorku u odnosu na koncentraciju pri samom probiru. Koncentracije fenilalanina iznad granične vrijednosti uz odsustvo generalizirane aminoacidemije u potvrđnoj analizi također je nalaz tipičan za fenilketonuriju (Vockley i sur., 2013).

Povišene koncentracije fenilalanina pri novorođenačkom probiru nalaze se također kod nedonoščadi zbog nedovoljno razvijenog jetrenog metabolizma ili u kritičnim stanjima povezanim s primjenom infuzije aminokiselina i potpune parenteralne prehrane. U tim slučajevima novorođenački se probir preporučuje ponoviti nakon 14 dana, odnosno u kraćem periodu bez nadomjesne terapije, kako bi se izbjegao lažno pozitivan nalaz fenilketonurije. Navedene preporuke mogu varirati ovisno o propisanom programu novorođenačkog probira (Bodamer, 2010).

Budući da je fenilalanin esencijalna aminokiselina koja se u organizam unosi isključivo prehranom, koncentracija u krvi novorođenačeta s fenilketonurijom, kako je već navedeno, raste s brojem primljenih obroka. U slučaju ranog otpusta iz rodilišta i prikupljanja uzorka za novorođenački probir u prva 24 sata od rođenja, koncentracije fenilalanina još uvijek ne moraju biti na patološkoj razini karakterističnoj za fenilketonuriju. Ova činjenica

dodatno komplicira ionako osjetljiv proces odabira graničnih vrijednosti te otvara mogućnost lažno negativnih rezultata. Zbog toga je uzorkovanje za probir na fenilketonuriju potrebno provesti u vremenu 48 – 72 sata nakon rođenja (Regier i Greene, 2017).

Pouzdanija dijagnoza fenilketonurije tandemskom spektrometrijom masa omogućena je istovremenim određivanjem koncentracije aminokiselina fenilalanina i tirozina te izračunavanjem omjera njihovih molarnih koncentracija (Phe/Tyr). Postavljanjem odgovarajućih graničnih vrijednosti za Phe/Tyr moguće je poboljšati dijagnostičku specifičnost i osjetljivost (Chace i sur., 1998; Levy, 1998). Izračunavanje ovog omjera te praćenje njegovog porasta zabilježeno je i u svrhu razlikovanja fenilketonurije i hiperfenilalaninemije, kao u otkrivanju hiperfenilalaninemije čiji uzrok nije smanjena aktivnost fenilalanin-hidroksilaze (Schulze i sur., 1999). Takav je poremećaj npr. hiperfenilalaninemija koja nastaje zbog mutacija u genima za jedan od proteina ključnog u sintezi ili regeneraciji tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>), kofaktora fenilalanin-hidroksilaza i drugih hidroksilaza. Ostali diferencijalno dijagnostički postupci u slučaju hiperfenilalaninemije mogu uključivati analizu pterina u urinu i suhoj kapi krvi, određivanje eritrocitne aktivnosti dihidropteridin reduktaze te molekularne analize pojedinih mutacija (Bodamer, 2010).

Otkrivanje vrijednosti pojedinog biološkog markera izvan graničnih vrijednosti tek je jedan korak u ostvarivanju cjelokupne svrhe novorođenačkog probira. Nakon toga slijedi često složena interpretacija nalaza te odabir i provođenje daljnjih potvrdnih i ostalih dijagnostičkih postupaka (Sahai i Marsden, 2009).

Proces novorođenačkog probira obuhvaća i planiranje i organizaciju programa probira, prikupljanje i obradu uzoraka, obavještanje zdravstvenih ustanova i obitelji o rezultatima te liječenje i praćenje pacijenata otkrivenim u procesu probira. Nadalje, provođenje novorođenačkog probira zahtijeva trajnu edukaciju svog medicinskog osoblja, kao i validaciju metoda, evaluaciju programa probira te na kraju procjenu učinkovitosti terapijskih intervencija i dugoročne korisnosti njegova provođenja za pojedinca i zajednicu u cjelini (Petković Ramadža i sur., 2013).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Novorođenački probir jedna je od najvažnijih i najuspješnijih javnozdravstvenih mjera iniciranih u posljednjih 50-ak godina. Nadalje, izniman značaj probira na fenilketonuriju za poboljšanje kliničkog ishoda oboljele novorođenčadi univerzalno je prepoznat te se danas smatra obaveznim u većini zemalja svijeta, uključujući i zemlje s vrlo niskom incidencijom ovog poremećaja. Zahvaljujući ranoj detekciji upravo pri novorođenačkom probiru, moguće je kod djece oboljele od fenilketonurije u potpunosti izbjeći teške neurološke komplikacije, uključujući i tešku mentalnu zaostalost. U nizu publikacija potvrđeno je kako probir na fenilketonuriju ispunjava sve zadane kriterije za novorođenački probir te ujedno opravdava trošak i infrastrukturu potrebnu za analizu, uz korištenje uzoraka suhe kapi krvi na filter papiru. U Republici Hrvatskoj novorođenački probir na fenilketonuriju provodi se od 1978. godine i to centralizirano, u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir, Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb. Od kraja 2017. godine u ovom se odjelu za probir na fenilketonuriju primjenjuje tehnologija tandemske spektrometrije masa, kojom je ujedno omogućeno proširenje programa novorođenačkog probira na dodatnih šest metaboličkih poremećaja. Osim u novorođenačkom probiru, tandemska spektrometrija masa je tehnologija izbora u praćenju metaboličke kontrole oboljelih tijekom cijeloga života. Uzorak izbora u oba slučaja jest uzorak suhe kapi krvi na filter papiru.

U Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probiru za probir na fenilketonuriju u upotrebi su dva UPLC tandemska spektrometra masa, UPLC Nexera-API3200 (*Shimadzu; AB Sciex*) i UPLC Nexera-MS8050 (*Shimadzu; Shimadzu*). U odnosu na tradicionalne metode korištene u probiru na fenilketonuriju, poput BIA-e ili spektrofluorimetrijskih metoda, tehnologija tandemske spektrometrije masa daleko je veće analitičke osjetljivosti i specifičnosti. Simultanom analizom većeg broja metabolita ovom se tehnologijom omogućava i promatranje njihovih međusobnih odnosa što pridonosi povećanju dijagnostičke osjetljivosti i specifičnosti. U slučaju probira na fenilketonuriju, uz određivanje koncentracije aminokiseline fenilalanina, osobito je važno praćenje omjera molarnih koncentracija fenilalanina i tirozina (engl. *Phe/Tyr ratio*), čime se znatno smanjuje i udio lažno pozitivnih rezultata u odnosu na tradicionalne metode, a posljedično izbjegava nepotreban stres za obitelj novorođenčeta te dodatna skupa dijagnostička obrada.

Cilj ovoga rada bila je usporedba rezultata molarnih koncentracija aminokiselina fenilalanina i tirozina i njihovih omjera (Phe/Tyr) dobivenih uzastopnom analizom uzoraka suhe kapi krvi na filter papiru na dvama UPLC-tandemskim spektrometrima masa, UPLC Nexera-API3200, *AB Sciex* i UPLC Nexera-MS8050, *Shimadzu*. Usporedivost dvaju uređaja ispitana je u svrhu validacije metode za mjerenje aminokiselina i acilkarnitina za potrebe novorođenačkog probira. U ispitivanje je uključeno 152 uzoraka novorođenčadi te 33 uzorka dijagnosticiranih PKU pacijenta.



## 3. MATERIJALI I METODE

### 3.1 Uzorci

Usporedba koncentracija fenilalanina i tirozina, kao i njihovih omjera (Phe/Tyr), dobivenih uzastopnom analizom na dvama tandemskim spektrometrima masa, UPLC Nexera-API3200, *AB Sciex* i UPLC Nexera-MS8050, *Shimadzu* provedena je u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir KBC-a Zagreb koristeći 185 uzoraka suhe kapi krvi na filter papiru. U analizu je uključeno 152 uzoraka novorođenčadi iz programa novorođenačkog probira te 33 uzorka dijagnosticiranih PKU pacijenata sa svrhom praćenja metaboličkog statusa.

Uzorci suhe kapi krvi novorođenčadi dobiveni su uzorkovanjem na Whatman 903<sup>TM</sup> filter papiru sadržanog u sklopu kartice za novorođenački probir. Uzorci su prikupljeni u razdoblju od 48 do 72 sata po rođenju, što je optimalno razdoblje uzorkovanja u kojem se očekuju karakteristične promjene analita za poremećaje obuhvaćene novorođenačkim probirom, uključujući i fenilketonuriju (Bilandžija i sur., 2018).

Prije uboda peta novorođenčeta se ugrije te se po potrebi nježnim trljanjem stimulira cirkulacija. Mjesto uboda dezinficira se zatim 70%-tnim izopropilnim alkoholom, pričekava se da alkohol ishlapi te se obriše suhom sterilnom gazom. Mjesto uboda prije uzorkovanja mora biti potpuno suho kako ne bi došlo do razrjeđenja uzorka. Uzorkovanje se provodi na dorzolateralnoj strani pete novorođenčeta, lancetom promjera ne većeg od 2 milimetra. Zbog mogućnosti kontaminacije uzorka tkivnom tekućinom prva se kapljica krvi nježno ukloni sterilnom gazom ili vaticom; druga kapljica krvi upija se isključivo jednom stranom filter papira, u mjestu označenom krugom, sve dok krv ne prodre na drugu stranu i ne ispunji krug u potpunosti. Postupak se ponavlja za svaki sljedeći krug. Ako jedna kapljica nije dovoljna za ispunjavanje jednog kruga, nova se kap nanosi na isto mjesto istog kruga, ali samo ako dolazi direktno nakon prethodne. Po uzorkovanju se mjesto uboda lagano pritisne sterilnom gazom do prestanka krvarenja. Prikupljene je uzorke potrebno dobro osušiti na zraku, u horizontalnom položaju i na neupijajućoj otvorenoj podlozi na sobnoj temperaturi u trajanju od minimalno četiri sata. Sakupljene i osušene uzorke s pravilno unesenim identifikacijskim podacima potrebno je proslijediti u laboratorij za novorođenački probir u odgovarajućim

zaštitnim vrećicama ili folijama unutar 24 sata od uzorkovanja (Bilandžija i sur., 2018; Hannon i sur., 2003; Sarnavka, 2003).

Nakon primitka u laboratorij, uzorci se pohranjuju na sobnoj temperaturi (15 – 30°C) i analiziraju u razdoblju od 24 – 48 sati. Uzorci koji neće biti analizirani unutar 48 sati kao i već analizirani uzorci pohranjuju se na temperaturama ispod 18°C, dobro zaštićeni od izvora vlage. Uzorke pohranjene na nižim temperaturama kroz dulje vrijeme potrebno je prije vađenja iz zaštitne folije zagrijati na sobnu temperaturu, kako bi se zaštitili od kondenzacije.

## **3.2 Materijali**

Za usporedbu koncentracija fenilalanina i tirozina iz uzoraka suhe kapi krvi na filter papiru korišten je ClinSpot® komercijalni kit, namijenjen semikvantitativnom određivanju derivatiziranih aminokiselina i acilkarnitina tandemskom spektrometrijom masa. Kontrola kvalitete provedena je koristeći ClinChek® kontrolnih uzoraka suhe kapi krvi u dvije koncentracijske razine. Ista metoda, primijenjena je na dvama tandemskim spektrometrima, UPLC Nexera-API3200 i UPLC Nexera-MS8050, različitih osjetljivosti. Oba tandemska spektrometra masa karakterizira protočno-injekcijska analiza (FIA), elektrosprej ionizacija (ESI) te trostruki kvadrupolni maseni analizator. Zahvaljujući visokoj osjetljivosti i specifičnosti ove tehnologije uzorci se analiziraju u vrlo kratkom vremenu, bez potrebe za prethodnim kromatografskim razdvajanjem na UPLC-koloni.

### **3.2.1 Kemikalije**

- Otopina za ispiranje
- Mobilna faza
- Interni standard, liofilizirani
- Reagens A
- Reagens B (derivatizirajući reagens)
- Reagens C

### **3.2.2 Oprema**

- Mikrotitarska pločica (96 jažica) s poklopcem/ zaštitnom folijom
- Komercijalne ClinChek® kontrole u dvije koncentracijske razine

- Automatske pipete i nastavci
- Odmjerna tikvica (25 mL)

### 3.2.3 Instrumenti

- Uređaj za izrezivanje isječaka uzoraka suhe kapi krvi na filter papiru (veličine 3,2 mm)
- Temostabilna miješalica (Termoshaker)
- Sušilo
- Digestor
- UPLC Nexera-API3200 (Shimadzu; Sciex)
- UPLC Nexera-MS8050 (Shimadzu; Shimadzu)

## 3.3 Priprema uzoraka

Predtretman uzorka za analizu aminokiselina relativno je jednostavan i uključuje ekstrakciju analita iz uzoraka suhe kapi krvi s otopinom metanola koja sadrži interne standarde te derivatizaciju, koja olakšava daljnju ionizaciju te doprinosi povećanju osjetljivosti.

*Priprema internog standarda (IS):* ClinSpot® komercijalni kit podrazumijeva pripremu jedinstvene otopine internog standarda za analizu aminokiselina i acilkarnitina. U bočice s liofiliziranim internim standardom (bočica 1 – acilkarnitini; bočica 2 – aminokiseline) doda se 3 mL reagensa A te se poklopi i ostavi stajati na sobnoj temperaturi tijekom 15 minuta, uz povremeno lagano miješanje. Sadržaj obje bočice prelijeva se zatim u odmjernu tikvicu volumena 25 mL. Bočice se dodatno ispiru još dva puta s po 3 mL reagensa A, a sav se sadržaj prelijeva u odmjernu tikvicu. Tikvica se nadopunjuje reagensom A do 25 mL te se sadržaj dobro promiješa. Čep tikvice učvrsti se parafilmom te pohranjuje u hladnjaku na 4°C do upotrebe.

*Ekstrakcija s internim standardom:* Pomoću uređaja za izrezivanje isječaka iz uzoraka suhe kapi krvi na filter papiru izrezuju se diskovi promjera 3,2 mm te redom prenose u jažice na mikrotitarskoj pločici. Prethodno je potrebno označiti mikrotitarske pločice rednim brojevima te izraditi radnu listu na kojoj su uzorci, kontrolni uzorci i slijepi probe definiranim redoslijedom pridruženi određenom broju jažice. Slijepu probu može činiti disk praznog filter

papira ili se mjesto u jažici ostavlja prazno. Svaka pločica sadrži kontrolne uzorke u dvije koncentracijske razine u triplikatu, na početku, sredini i kraju pločice. U svaku se jažicu zatim otpipetira 100  $\mu$ L internog standarda; pločica se prekrije poklopcem ili zaštitnom folijom te inkubira na miješalici (*Thermoshaker*), na sobnoj temperaturi i 700 rpm-a tijekom 20 minuta.

*Prijenos uzoraka i sušenje:* Po inkubaciji je potrebno pažljivo ukloniti poklopac / zaštitnu foliju te supernatant prebaciti u novu mikrotitarsku pločicu (pločica 2), poštivajući pritom redoslijed uzoraka iz prve pločice. Pločica se ponovno stavlja na miješalicu, na temperaturu 40°C i 700 rpm-a, te istovremeno uparuje korištenjem sušila za kosu do potpunog sušenja. Budući da se isparavanjem reagensa A oslobađaju štetne pare, proces je potrebno provoditi unutar digestora. Nakon uparivanja suhu je pločicu potrebno skinuti s miješalice, poklopiti i ostaviti u digestoru, a temperaturu na miješalici postaviti na 60°C.

*Derivatizacija:* Kada temperatura na miješalici dosegne 60°C, u svaku se jažicu dodaje 50  $\mu$ L derivatizirajućeg reagensa B te se pločica prekrije plastičnim poklopcem / zaštitnom folijom. Pločica se zatim inkubira na 60°C tijekom 20 minuta bez miješanja. Nakon inkubacije ponovno slijedi uparivanje do suhoga u digestoru, uz korištenje sušila. Derivatizacijom se aminokiseline prevode u svoje n-butil estere.

*Rekonstitucija:* Nakon uparivanja, u svaku se jažicu dodaje 100  $\mu$ L reagensa C; pločica se poklopi te inkubira na miješalici tijekom 5 minuta, na sobnoj temperaturi i 700 rpm-a.

Ovisno o osjetljivosti tandemskog spektrometra u LC-MS/MS sustav injektira se 5 – 10  $\mu$ L supernatanta.

Uzorci pripremljeni na ovaj način mogu se pohraniti na sobnoj temperaturi (15 – 30°C) u trajanju do 7 dana.

### 3.4 Analiza

Aminokiseline i acilkarnitini koje je moguće odrediti semikvantitativno korištenjem *ClinSpot*<sup>®</sup> kita navedeni su u *Tablici 1*.

Aminokiseline		Acilkartnitini	
Ala	Alanin	C0	Slobodni karnitin
Arg	Arginin	C2	Acetilkarnitin
Asp	Aspartat	C3	Propionilkarnitin
Cit	Citrulin	C4	Butirilkarnitin
Glu	Glutamin	C5	Izovalerilkarnitin
Gly	Glicin	C5DC	Glutarilkarnitin
Leu	Leucin	C6	Heksanoilkarnitin
Met	Metionin	C8	Oktanoilkarnitin
Orn	Ornitin	C10	Dekanoilkarnitin
Phe	Fenilalanin	C12	Dodekanoilkarnitin
Pro	Prolin	C14	Tetradekanoilkarnitin
Tyr	Tirozin	C16	Heksadekanoilkarnitin
Val	Valin	C18	Oktadekanoilkarnitin

**Tablica 1:** Aminokiseline i acilkarnitini koje moguće odrediti korištenjem *ClinSpot*<sup>®</sup> kita.

Umjesto razdvajanja analita tekućinskom kromatografijom, koje može potrajati i do 30 minuta, metoda koristi tzv. protočno-injekcijsku analizu (Flow injection analysis, FIA) (Chace i Kalas, 2005). U FIA-MS/MS spektrometar masa direktno je povezan s pumpom koja osigurava kontinuirani protok smjese otapala, zaobilazeći odjeljak UPLC-a s kromatografskom kolonom. Putem autosamplera minimalan volumen tekućeg uzorka injektira se u kontinuirani tok otapala; postupnim injektiranjem uzoraka, u točno određenim

vremenskim intervalima, izbjegava se *carryover* te osigurava pojava jasno definiranih kromatograma pojedinih analita, odnosno olakšava identifikacija i kvantifikacija analita od interesa (Kulkarni i Vaidya, 2015; Niesser i sur., 2012; Trojanowicz, 2008; Chace i Kalas, 2005).

Upotreba FIA u kombinaciji s tandemskom spektrometrijom masa osigurava dakle visoko osjetljivu i specifičnu detekciju, uz vrlo kratko vrijeme pojedinačne analize. Osim toga, FIA doprinosi i učinkovitijem uvođenju uzoraka u ionizacijske izvore (Trojanowicz, 2008; Nanita i Kaldon, 2015). U *Tablici 2* navedeni su korišteni parametri tekućinskih kromatografa za protočno-injekcijsku analizu.

LC Parametri	UPLC Nexera-MS8050		UPLC Nexera-API3200	
	Vrijeme	Protok	Vrijeme	Protok
HPLC pumpa	0,5 min	0,1 ml/min	0,35 min	0,3 ml/min
	0,6 min	0,5 ml/min	0,36 min	0,02 ml/min
	1,10 min	Stop	1,11 min	0,2 ml/min
			1,50 min	0,6 ml/min
			1,51 min	0,3 ml/min
			2,00 min	Stop
	Volumen injektiranja	5 µL	10 µL	

**Tablica 2:** LC parametri korišteni na UPLC Nexera-MS8050 te UPLC Nexera-API3200.

Korištenjem protoka manjih od 1ml/min FIA sustav jednostavno se povezuje s kapilaram u elektrosprej ionizatoru (Trojanowicz, 2008). U ESI, tekući se uzorci uz pomoć struje dušika protiskuju kroz tanku metalnu kapilaru pod naponom i na izlasku iz kapilare u evakuiranoj komori formiraju fini sprej nabijenih kapljica. Osiguranjem visoke temperature i/ili novog izvora suhog dušika omogućuje se isparavanje tekućine iz kapljica, što dovodi do postupnog povećanja gustoće naboja na površini kapljice i smanjenja promjera kapljica. Konačno, jakost električnog polja unutar nabijenih kapljica doseže kritičnu točku i prevladava

površinsku napetost, pri čemu se omogućuje oslobađanje analita u obliku jednostruko ili višestruko nabijenih plinovitih iona. Elektroda postavljena nasuprot metalne kapilare sadrži otvor u koji se nastali ioni usmjeravaju zahvaljujući gradijentu električnog potencijala i tlaka. Neutralni se analiti zatim uklanjaju pomoću vakuumskih pumpi, a ioni manipulacijom magnetskih polja usmjeravaju do masenog analizatora (Trojanowicz, 2008; Ho i sur., 2003; Vogeser, 2003).

Primijenjena metoda podrazumijeva analizu aminokiselina koristeći *MRM mode* način rada (engl. *Multiple Reaction Monitoring*) na trostrukim kvadrupol masenim analizatorima. U prvom se kvadrupolu iz smjese iona izdvajaju samo ioni definiranog omjera mase i naboja ( $m/z$ ) karakteristični za navedene aminokiseline i acilkarnitine (prekursorski ioni) i dalje usmjeravaju do kolizijske ćelije (drugog kvadrupola). U kolizijskoj se ćeliji propušteni prekursorski ioni fragmentiraju u sudarima s inertnim plinom tvoreći takozvane produktne ione. U trećem kvadrupolu ponovno dolazi do selekcije ionskih fragmenata samo određenih omjera mase i naboja, koji se onda propuštaju do detektora i kvantificiraju (Ho i sur., 2003).

Identifikacija pojedinih aminokiselina u uzorku omogućena je njihovim karakterističnim masenim prijelazima; svakoj aminokiselini i pripadajućem internom standardu pridružene su određene očekivane vrijednosti omjera mase i naboja njihovih produktnih i prekursorskih iona. Razlika omjera između prekursorskog i produktnog iona iznosi približno 120, odnosno odgovara gubitku neutralnog fragmenta butil–formata mase 102 daltona iz derivatizirane aminokiseline. Maseni prijelazi korišteni u analizi aminokiselina *ClinSpot*<sup>®</sup> kita prikazani su u *Tablici 3*. Na primjer, određivanje fenilalanina temelji se na propuštanju iona s vrijednošću omjera mase i naboja 222 u prvom kvadrupolu te iona s omjerom mase i naboja 120 u trećem kvadrupolu.

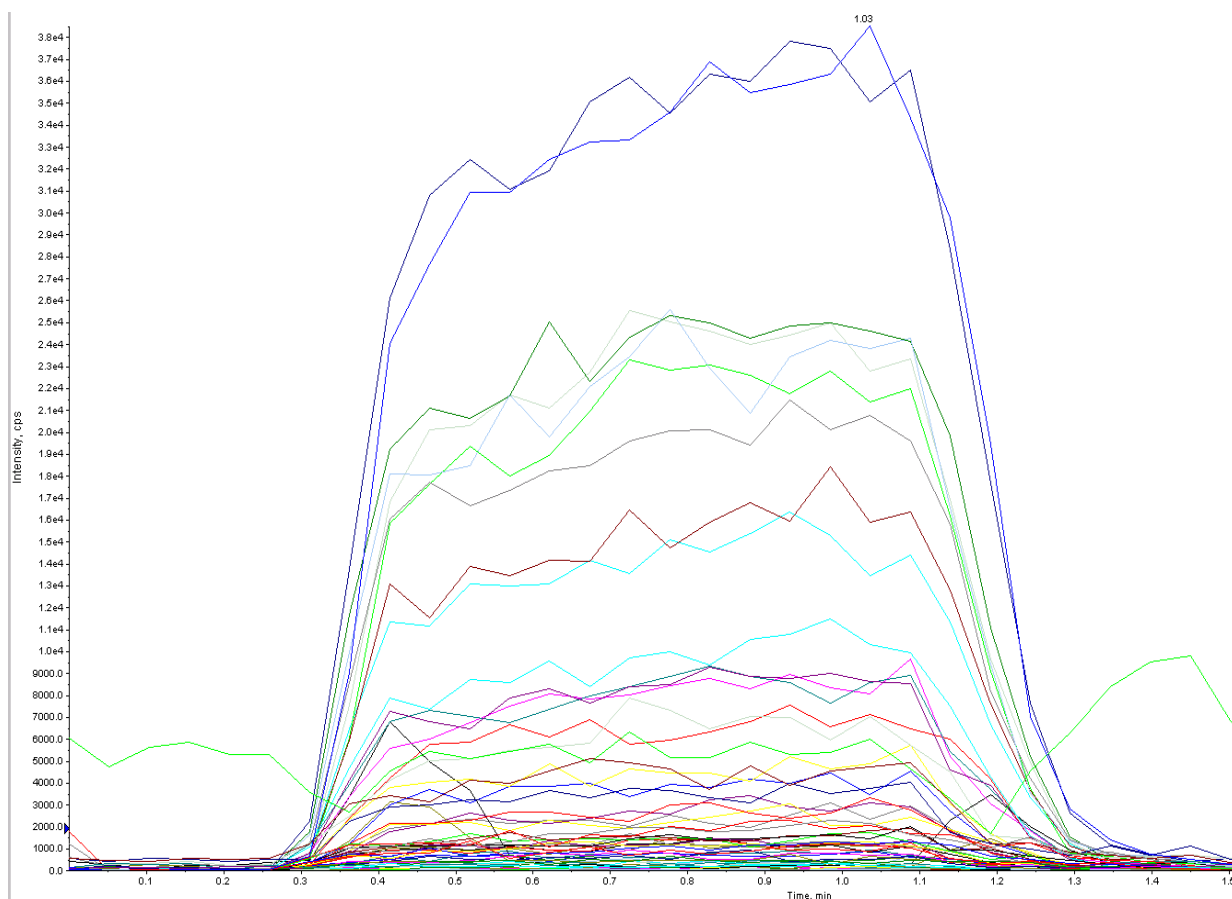
<b>Aminokiselina</b>	<b>Prekursor (m/z)</b>	<b>Produkt (m/z)</b>	<b>Interni standard</b>	<b>Prekursor (m/z)</b>	<b>Produkt (m/z)</b>
Alanin	146	44	$^{13}\text{C}_3\ ^{15}\text{N}$ – Alanin	150	47
Arginin	231	70	$^{13}\text{C}_6$ – Arginin	237	74
Aspartat	246	134	$^{13}\text{C}_4$ – Aspartat	250	138
Citrulin	232	113	$^2\text{H}_7$ – Citrulin	239	120
Glutamat	260	158	$^{13}\text{C}_3$ – Glutamat	265	162
Glicin	132	76	$2 - ^{13}\text{C}^{15}\text{N}$ – Glicin	134	78
Leucin	188	86	$^2\text{H}_3$ – Leucin	191	89
Metionin	206	104	$^2\text{H}_3$ – Metionin	209	107
Ornitin	189	70	$^2\text{H}_6$ – Ornitin	195	76
<b>Fenilalanin</b>	<b>222</b>	<b>120</b>	<b><math>^{13}\text{C}_6</math> – Fenilalanin</b>	<b>228</b>	<b>126</b>
Prolin	172	116	$^{13}\text{C}_5$ – Prolin	177	121
Tirozin	238	136	$^{13}\text{C}_6$ – Tirozin	244	142
Valin	174	72	$^2\text{H}_8$ – Valin	182	80

*Tablica 3: Karakteristični maseni prijelazi pojedinih aminokiselina i njihovih internih standarda unutar ClinSpot® kita.*

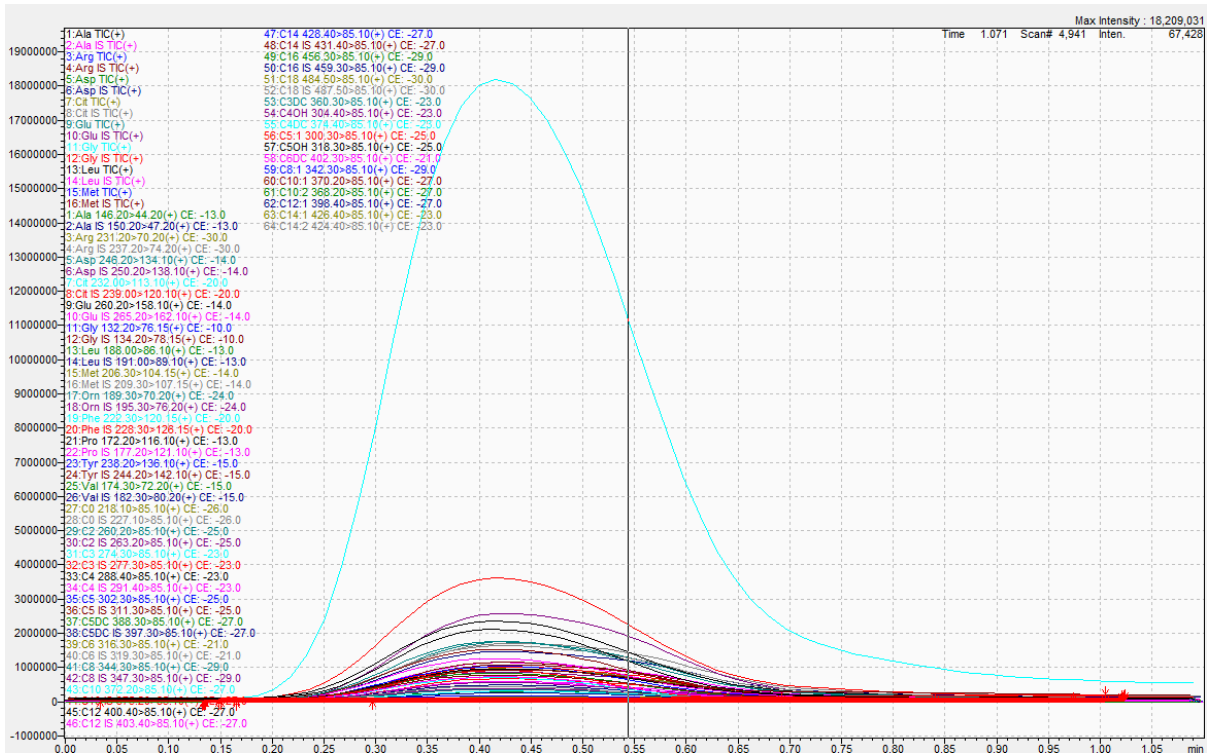
Rezultati analize mogu se prikazati u obliku ukupnog ionskog kromatograma (engl. *Total Ion Chromatogram*, TIC), odnosno kromatograma koji predstavlja sumirane intenzitete masenih spektara analita generiranih tijekom jedne analize. U našem slučaju TIC sadrži signale svih navedenih aminokiselina, acilkarnitina, pripadajućih internih standarda, ali i pozadinskih signala ([www.shimadzu.com](http://www.shimadzu.com)). Uz pomoć softvera, iz TIC-a je moguće generirati kromatograme pojedinačnih analita, ili kromatograme više analita istovremeno. Takvi se kromatogrami nazivaju ekstrahirani ionski kromatogrami ([www.waters.com](http://www.waters.com)).



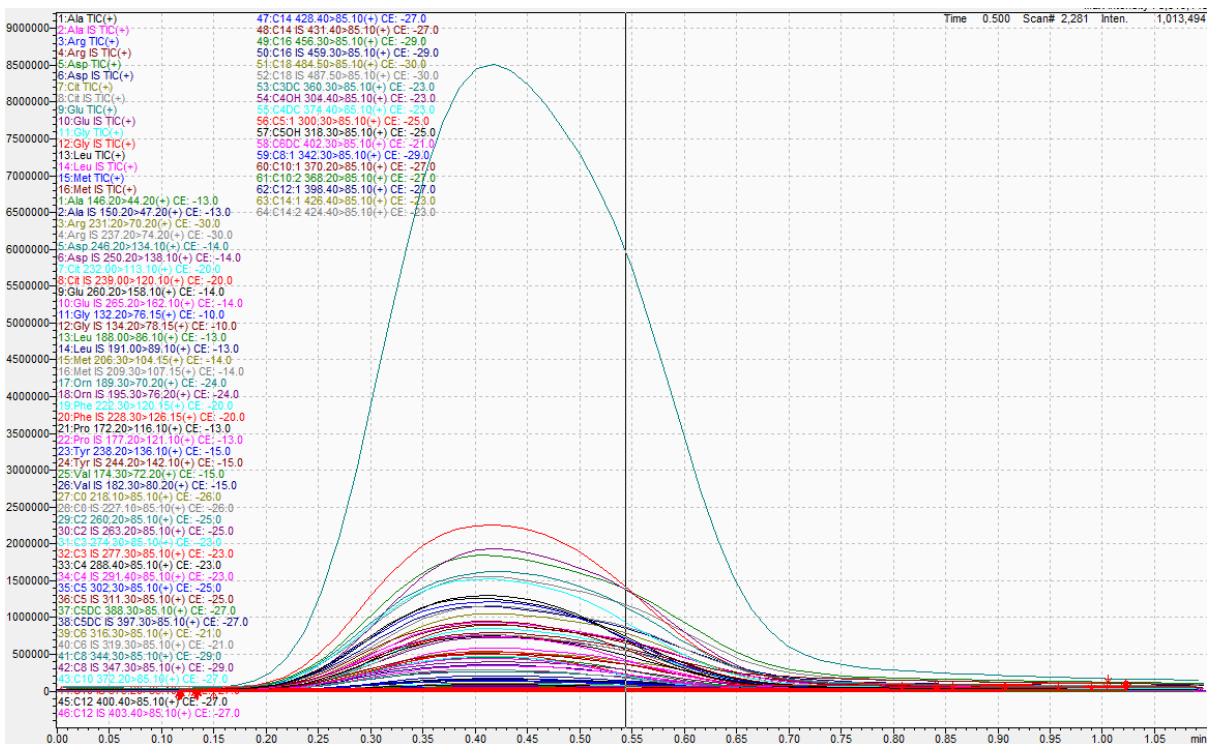
Na *Slici 5* prikazani su ekstrahirani ionski kromatogrami aminokiselina i acilkarnitina dobiveni analizom kontrolnog uzorka (L1) na UPLC Nexera-API3200. Ekstrahirani ionski kromatogrami uzoraka suhe kapi krvi novorođenčadi dobiveni na uređaju UPLC Nexera–MS8050 prikazani su na *Slici 6.* i *Slici 7.*



**Slika 5:** Ekstrahirani ionski kromatogrami aminokiselina i acilkarnitina dobiveni analizom kontrolnog uzorka (L1) na UPLC Nexera-API3200. Horizontalna os označuje retencijsko vrijeme, a vertikalna intenzitet signala.



Slika 6: Ekstrahirani ionski kromatogrami aminokiselina i acilkarnitina dobiveni analizom suhe kapi krvi novorođenčeta s fenilketonurijom na UPLC Nexera-MS8050. Horizontalna os predstavlja retencijsko vrijeme, a vertikalna intenzitet signala. Maksimalan intenzitet iznosi 18 291 031 i pripada fenilalaninu.



Slika 7: Ekstrahirani ionski kromatogrami aminokiselina i acilkarnitina dobiveni analizom suhe kapi krvi zdravog novorođenčeta na UPLC Nexera-MS8050. Horizontalna os predstavlja retencijsko vrijeme, a vertikalna intenzitet signala. Maksimalni intenzitet iznosi 1 013 494.

Primjena internog standarda omogućuje semikvantitativno određivanje pojedinih aminokiselina. Interni standard sadrži smjesu izotopno-obilježenih aminokiselina u poznatim koncentracijama te se dodaje svakom uzorku u procesu pripreme.

Koncentracija aminokiselina iz uzorka izračunava se prema sljedećoj formuli,

$$C (\text{Aminokiselina})[\mu\text{mol/L}] = \frac{A (\text{Aminokiselina}) \times C (\text{IS}) [\mu\text{mol/L}]}{A (\text{IS})} \times \frac{V (\text{IS}) [\mu\text{L}]}{V (\text{A}) [\mu\text{L}]}$$

pri čemu je

C (Aminokiselina): Koncentracija aminokiseline u uzorku

A (Aminokiselina): Površina ispod peeka za pojedinu aminokiselinu

C (IS): Koncentracija pojedine izotopno obilježene aminokiseline iz internog standarda

A (IS): Površina ispod peeka izotopno – obilježene aminokiseline

V (IS): Volumen internog standarda

V (A): Volumen uzorka

Ako je priprema uzorka napravljena po opisanom postupku, formulu je moguće pojednostaviti na sljedeći način,

$$C (\text{Aminokiselina})[\mu\text{mol/L}] = \frac{A (\text{Aminokiselina}) \times C (\text{IS, uzorak}) [\mu\text{mol/L}]}{A (\text{IS})}$$

pri čemu je

C (IS, uzorak): Koncentracija izotopno obilježene aminokiseline u uzorku.

Pojednostavljeni izračun temelji se na poznatom volumenu internog standarda od 100  $\mu\text{L}$  te definiranom promjeru diska uzorka suhe kapi krvi na filter papiru koji iznosi 3,2 mm.

Pomoću ovih parametara koncentracija izotopno obilježenih aminokiselina iz internog standarda preračunava se u koncentraciju izotopno obilježene aminokiseline u ispitivanom uzorku. Srednji pretpostavljeni volumen uzorka iznosi 3,1  $\mu\text{L}$ , a izračunat je na temelju kontrolnog uzorka suhe kapi krvi na filter papiru pomjera 3,2 mm i vrijednosti hematokrita 50%. Budući da je stvaran volumen uzorka varijabilan, primijenjena metoda ne može služiti preciznoj kvantifikaciji aminokiselina ili acilkarnitina. Umjesto toga govorimo o semikvantitativnom određivanju, koje u potpunosti odgovara potrebama novorođenačkog probira kao i okvirnog praćenja pacijenata s fenilketonurijom.

U svrhu usporedbe rezultata na dvama tandemskim spektrometrima masa za potrebe novorođenačkog probira te praćenja pacijenata s fenilketonurijom izdvojeni su rezultati molarnih koncentracija aminokiselina fenilalanina, tirozina, kao i njihovih omjera.

Programi korišteni za izračunavanje koncentracija aminokiselina jesu ChemoView<sup>®</sup> na UPLC Nexera-API3200 i Neonatal Solution<sup>®</sup> na UPLC Nexera-MS8050.

### **3.5 Statistička obrada**

Za usporedbu koncentracija aminokiselina fenilalanina i tirozina te njihovih omjera (Phe/Tyr) dobivenih na dvama spektrometrima masa, UPLC Nexera-API3200 AB Sciex i UPLC Nexera-MS8050 Shimdazu, korištena je Passing Bablok regresijska analiza te Bland Altman analiza statističkog programa MedCalc v. 12.5.0.0.

Passing Bablok regresijska analiza je statistički postupak kojim je moguće ispitati podudarnost između dviju metoda. Usporedba rezultata mjerenja na dvama analitičkim sustavima temelji se na izradi regresijskog pravca te pripadajućoj jednadžbi pravca. Vrijednost odsječka mjera je sistematske, a vrijednost nagiba proporcionalne razlike između dviju metoda. Izračunavanjem 95%-tnih intervala pouzdanosti za vrijednosti odsječka i nagiba testira se je li odstupanje vrijednosti odsječka od 0 te vrijednosti nagiba od 1 statistički značajno. Ukoliko 95%-tni intervali pouzdanosti za odsječak i nagib sadrže 0, odnosno 1, zaključujemo kako ne postoji značajno sustavno ni proporcionalno odstupanje i obratno (Blilić-Zulle, 2011; [www.medcalc.org](http://www.medcalc.org)).

Prednosti Passing Bablok statističke analize jesu neosjetljivost na raspodjelu ili vrijednosti koje se nalaze značajno izvan skupa podataka. Jedini uvjeti za njenu primjenu jesu kontinuirana raspodjela podataka te linearna povezanost između rezultata mjerenja. Linearnost se ispituje Cusum (engl. *cumulative sum*) testom. Mala P vrijednost ( $P < 0,05$ )

ukazivat će na to da ne postoji linearna povezanost između dva mjerenja, odnosno Passing Bablok analiza tada nije primjenjiva (Bilić – Zulle, 2011; [www.medcalc.org](http://www.medcalc.org)).

Bland Altman statistička analiza metoda je procjene slaganja kvantitativnih mjerenja temeljena na intervalima slaganja (engl. *limits of agreement*, LOA). Ovi statistički intervali izračunavaju se iz srednje vrijednosti razlika dvaju mjerenja (engl. *mean*) te standardne devijacije (*s*) razlika dvaju mjerenja. Rezultati analize prikazuju se Bland Altman dijagramom, koji prikazuje ovisnost razlike dvaju mjerenja (A-B) i njihove srednje vrijednosti (A-B/2). Bland Altman analiza jednostavna je metoda procjene biasa, kao i definicije intervala slaganja koji obuhvaća 95% razlika dvaju mjerenja, no ne govori jesu li navedeni intervali prihvatljivi ili ne. Konačni zaključak o tome jesu li navedeni intervali slaganja adekvatni ili preširoki može se donijeti samo na temelju unaprijed definiranih analitičkih, bioloških ili kliničkih kriterija (Giavarina, 2015, [www.medcalc.org](http://www.medcalc.org)).

U slučaju da su razlike u mjerenju rezultat samo analitičke nepreciznosti dviju metoda, srednja vrijednost razlika iznosila bi 0. Nadalje, ukoliko 95%-tni interval pouzdanosti srednje vrijednosti razlika dvaju mjerenja (engl. *mean*) ne obuhvaća 0, moguće je zaključiti da postoji statistički značajna razlika između rezultata dobivenih na dvama uređajima, tj. rezultati mjerenja dobiveni jednom metodom su konstantno viši ili niži u odnosu na drugu metodu (Giavarina, 2015; [www.medcalc.org](http://www.medcalc.org)).

## 4. REZULTATI

UPLC Nexera-API3200 (AB Sciex)			UPLC Nexera-MS8050 (Shimadzu)		
Fenilalanin ( $\mu\text{mol/L}$ )	Tirozin ( $\mu\text{mol/L}$ )	Fenilalanin/ Tirozin ( $\mu\text{mol/L}$ )	Fenilalanin ( $\mu\text{mol/L}$ )	Tirozin ( $\mu\text{mol/L}$ )	Fenilalanin/ Tirozin ( $\mu\text{mol/L}$ )
41,174	72,786	0,566	43,286	76,242	0,568
66,150	124,815	0,530	79,334	97,969	0,810
54,870	91,521	0,600	61,031	83,858	0,728
51,770	82,134	0,630	57,415	83,657	0,686
57,422	74,643	0,769	61,855	75,726	0,817
65,595	122,598	0,535	65,936	122,824	0,537
70,527	74,973	0,941	77,394	74,839	1,034
38,799	136,877	0,283	38,175	143,443	0,266
51,559	100,484	0,513	53,344	104,919	0,508
53,757	100,361	0,536	61,072	110,594	0,552
39,278	81,884	0,480	42,759	89,031	0,480
62,145	94,434	0,658	67,274	97,492	0,690
57,296	81,768	0,701	62,850	82,189	0,765
40,583	96,901	0,419	42,752	100,492	0,425
54,633	61,599	0,887	61,832	61,140	1,011
67,425	105,847	0,637	75,184	110,069	0,683
56,135	82,511	0,680	59,153	85,093	0,695
53,012	78,492	0,675	53,443	77,903	0,686
47,945	89,586	0,535	48,358	89,773	0,539
60,446	121,420	0,498	66,324	123,819	0,536
67,767	71,531	0,947	73,010	74,151	0,985
59,877	63,970	0,936	63,716	64,195	0,993
74,479	85,104	0,875	78,274	85,134	0,919
77,543	105,408	0,736	80,254	106,873	0,751
62,673	104,429	0,600	65,199	105,809	0,616
59,677	87,059	0,685	64,817	92,759	0,699
61,208	123,357	0,496	64,594	127,461	0,507
65,479	88,453	0,740	67,536	91,191	0,741
79,009	97,470	0,811	87,499	101,239	0,864
66,742	86,826	0,769	70,420	86,689	0,812
89,422	125,010	0,715	94,772	120,176	0,789
63,653	112,348	0,567	65,281	116,417	0,561
48,536	65,441	0,742	50,596	66,582	0,760
68,907	62,231	1,107	73,903	62,520	1,182
71,058	86,042	0,826	76,483	87,883	0,870
61,521	64,594	0,952	64,569	65,482	0,986
46,679	70,567	0,661	46,872	69,521	0,674
37,162	89,733	0,414	37,628	88,781	0,424
68,059	63,942	1,064	71,268	66,264	1,076
53,877	66,184	0,814	54,160	64,885	0,835
51,310	169,442	0,303	51,195	183,884	0,278
49,674	59,035	0,841	52,877	55,625	0,951
77,562	53,422	1,452	80,446	53,571	1,502
67,225	130,668	0,514	68,588	135,552	0,506
70,641	61,991	1,140	72,890	64,524	1,130

52,263	82,715	0,632	51,000	83,146	0,613
40,579	60,283	0,673	40,968	60,998	0,672
55,975	102,577	0,546	58,114	103,287	0,563
55,008	75,411	0,729	54,598	74,377	0,734
97,829	168,565	0,580	98,897	164,131	0,603
86,541	78,361	1,104	88,940	76,762	1,159
64,291	51,837	1,240	67,646	50,948	1,328
90,266	142,182	0,635	93,495	145,008	0,645
58,279	52,905	1,102	59,157	51,728	1,144
75,351	89,142	0,845	79,570	90,894	0,875
42,707	104,995	0,407	42,583	106,481	0,400
49,062	57,128	0,859	50,960	57,137	0,892
61,397	56,839	1,080	64,802	56,091	1,155
63,105	50,414	1,252	67,713	50,199	1,349
75,488	73,844	1,022	78,185	75,404	1,037
68,123	60,083	1,134	69,539	58,456	1,190
64,861	66,446	0,976	68,059	67,417	1,010
59,798	69,657	0,858	63,814	70,902	0,900
73,386	166,128	0,442	74,231	174,890	0,424
41,648	54,508	0,764	43,613	57,769	0,755
57,229	89,661	0,638	60,730	95,189	0,638
77,913	102,580	0,760	85,968	111,650	0,770
64,563	98,502	0,655	67,600	99,609	0,679
82,539	113,022	0,730	89,698	119,174	0,753
58,522	86,123	0,680	62,546	85,822	0,729
113,203	197,010	0,575	124,179	204,600	0,607
78,161	120,377	0,649	83,392	126,021	0,662
70,689	65,823	1,074	76,766	67,623	1,135
66,369	57,234	1,160	72,025	60,590	1,189
51,186	64,630	0,792	53,112	71,315	0,745
60,354	76,816	0,786	63,794	79,117	0,806
63,983	92,680	0,690	72,205	103,272	0,699
66,171	59,562	1,111	75,773	65,680	1,154
59,761	104,443	0,572	65,863	114,229	0,577
55,142	113,705	0,485	62,137	128,509	0,484
62,297	69,607	0,895	70,296	66,632	1,055
64,689	68,897	0,939	76,728	68,621	1,118
53,473	92,297	0,579	59,101	98,161	0,602
65,906	79,958	0,824	71,802	86,730	0,828
56,480	82,163	0,687	61,756	82,385	0,750
60,685	111,889	0,542	66,285	120,758	0,549
53,960	147,913	0,365	58,818	159,699	0,368
63,911	90,197	0,709	71,957	89,477	0,804
60,635	154,657	0,392	67,669	166,136	0,407
69,553	114,490	0,608	78,401	117,088	0,670
67,671	85,208	0,794	74,128	83,840	0,884
67,422	63,362	1,064	74,047	63,390	1,168
44,294	81,234	0,545	48,337	84,885	0,569
47,334	105,989	0,447	50,721	112,559	0,451
71,959	75,989	0,947	81,964	83,470	0,982
51,757	76,727	0,675	58,219	78,917	0,738
60,535	132,583	0,457	68,047	141,543	0,481
64,118	79,673	0,805	69,202	81,201	0,852

61,920	129,755	0,477	69,607	137,895	0,505
74,737	184,240	0,406	82,605	201,256	0,410
75,968	126,059	0,603	81,942	129,215	0,634
93,283	130,644	0,714	102,412	133,591	0,767
79,145	63,990	1,237	89,004	63,670	1,398
88,287	85,166	1,037	99,198	89,159	1,113
73,464	67,322	1,091	80,053	69,466	1,152
58,967	83,326	0,708	59,461	85,332	0,697
54,252	75,708	0,717	56,542	76,395	0,740
69,542	90,973	0,764	71,980	94,825	0,759
60,828	101,471	0,599	64,157	103,071	0,622
52,024	60,767	0,856	55,385	60,318	0,918
73,778	105,677	0,698	81,637	105,847	0,771
91,794	139,060	0,660	99,303	150,034	0,662
50,335	89,429	0,563	53,905	97,465	0,553
57,276	90,050	0,636	60,738	92,461	0,657
71,135	91,959	0,774	76,521	96,162	0,796
65,106	99,465	0,655	73,021	106,052	0,689
58,702	69,322	0,847	64,412	69,496	0,927
75,504	109,552	0,689	82,104	113,814	0,721
64,666	102,668	0,630	67,736	110,767	0,612
50,304	71,430	0,704	53,254	73,938	0,720
46,257	56,110	0,824	49,777	56,529	0,881
69,982	70,089	0,998	73,607	72,672	1,013
103,068	153,889	0,670	116,975	157,851	0,741
114,179	122,920	0,929	124,414	129,352	0,962
66,385	64,291	1,033	68,971	65,880	1,047
65,297	110,164	0,593	71,275	113,973	0,625
61,799	77,387	0,799	64,684	80,078	0,808
52,464	81,649	0,643	56,433	87,646	0,644
50,872	88,004	0,578	55,301	92,109	0,600
63,793	73,631	0,866	71,006	79,435	0,894
61,467	59,649	1,030	62,965	59,194	1,064
50,476	96,007	0,526	53,989	91,585	0,589
64,576	91,908	0,703	68,931	93,885	0,734
70,482	101,490	0,694	73,910	108,669	0,680
52,304	49,986	1,046	55,936	51,528	1,086
57,328	74,741	0,767	59,420	77,017	0,772
69,172	91,841	0,753	73,548	93,304	0,788
64,200	81,125	0,791	69,059	77,261	0,894
76,661	107,041	0,716	87,109	110,811	0,786
47,458	61,750	0,769	48,638	62,420	0,779
68,065	111,835	0,609	73,831	123,001	0,600
60,961	119,821	0,509	65,197	124,935	0,522
65,986	108,382	0,609	70,134	113,431	0,618
49,111	117,356	0,418	52,627	118,767	0,443
59,505	142,104	0,419	62,497	147,116	0,425
64,598	67,511	0,957	68,067	70,625	0,964
73,118	120,879	0,605	79,569	118,421	0,672
99,904	130,101	0,768	107,649	144,239	0,746
76,110	83,951	0,907	78,517	91,725	0,856
77,404	116,545	0,664	79,709	129,053	0,618
101,041	142,818	0,707	117,673	159,275	0,739



103,012	114,421	0,900	113,487	123,317	0,920
176,210	113,503	1,552	176,427	114,845	1,536
50,193	39,050	1,285	56,346	39,709	1,419
296,241	43,333	6,836	285,718	45,695	6,253
309,919	39,317	7,883	355,335	43,993	8,077
333,011	89,287	3,730	322,548	84,609	3,812
52,948	159,000	0,333	55,228	160,451	0,344
14,782	71,940	0,205	10,726	74,917	0,143
55,273	54,680	1,011	57,335	56,048	1,023
59,280	92,546	0,641	64,956	91,190	0,712
48,416	45,260	1,070	49,142	49,053	1,002
34,061	109,300	0,312	36,806	116,271	0,317
33,022	64,930	0,509	31,606	62,225	0,508
45,307	44,274	1,023	51,943	48,022	1,082
40,524	167,700	0,242	42,747	206,245	0,207
41,877	53,534	0,782	43,155	51,027	0,846
106,340	100,800	1,055	120,801	106,385	1,136
211,836	88,090	2,405	232,538	86,177	2,698
73,843	98,570	0,749	77,572	96,659	0,803
81,510	49,015	1,663	81,009	51,473	1,574
55,818	92,878	0,601	58,279	86,612	0,673
346,209	72,000	4,808	425,988	81,325	5,238
19,266	75,460	0,255	18,051	83,039	0,217
45,681	66,533	0,687	46,054	63,185	0,729
72,893	80,308	0,908	73,418	79,235	0,927
64,272	44,340	1,450	77,317	48,970	1,579
70,468	46,860	1,504	68,502	43,506	1,575
106,171	138,600	0,766	117,808	157,523	0,748
216,991	39,690	5,467	261,640	44,443	5,887
59,936	52,430	1,143	66,009	57,772	1,143
80,320	53,832	1,492	79,796	50,397	1,583
175,706	62,740	2,801	221,953	69,084	3,213
92,982	126,900	0,733	103,539	132,46	0,782
45,910	42,104	1,090	51,645	44,052	1,172

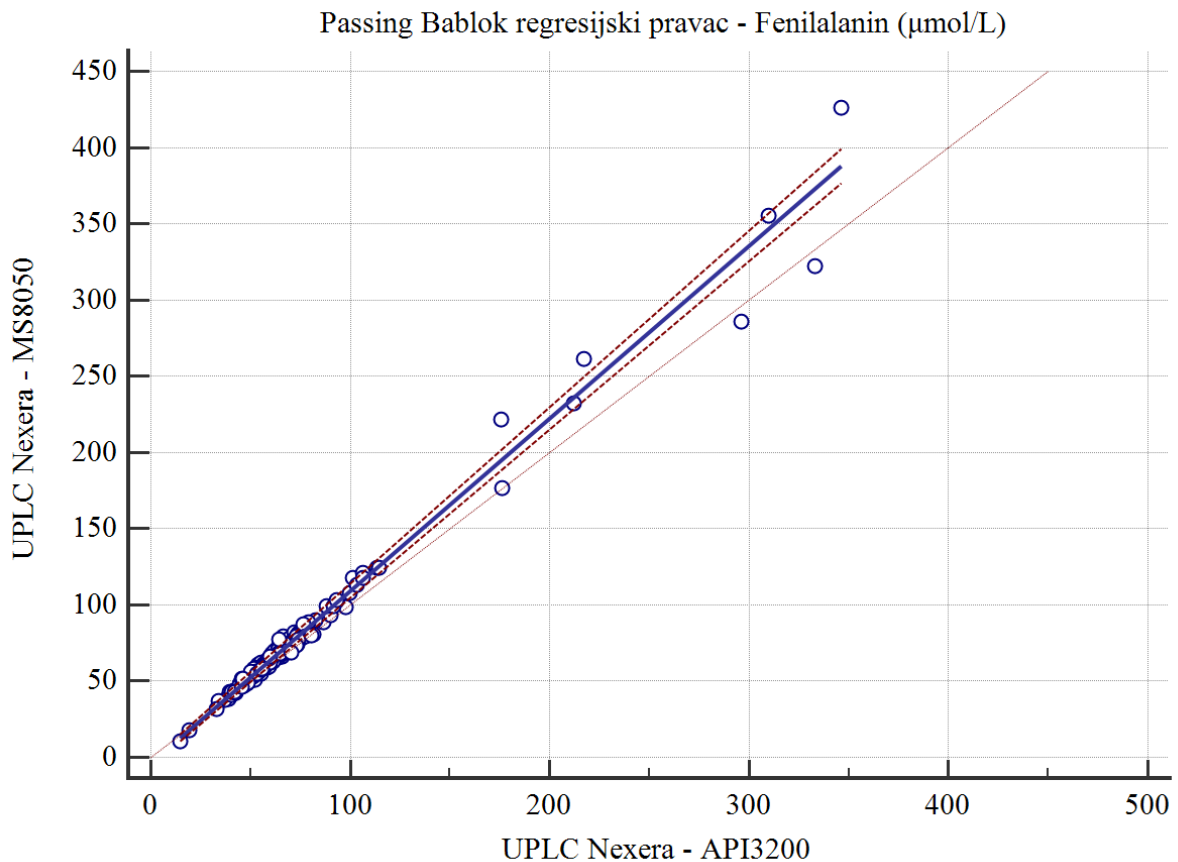
**Tablica 4:** Koncentracije fenilalanina i tirozina te omjeri koncentracija fenilalanina i tirozina (Phe/Tyr) dobiveni analizom 185 uzoraka suhe kapi krvi na dvama tandemskim spektrometrima masa, UPLC Nexera-API3200 (Shimadzu; AB Sciex) i UPLC Nexera-MS8050 (Shimadzu; Shimadzu).

## 4.1 Usporedba koncentracija fenilalanina

### 4.1.1 Passing Bablok regresijska analiza

Varijabla X	Koncentracija fenilalanina izmjerena na UPLC Nexera-API3200
Varijabla Y	Koncentracija fenilalanina izmjerena na UPLC Nexera-MS8050
Broj uzoraka	185
Jednadžba pravca	$y = -3,831048 + 1,131226 x$
Odsječak na y – osi (A)	-3,831048
95% CI	-5,5646 – (-2,0737)
Nagib pravca (B)	1,131226
95% CI	1,1044 – 1, 1584
	P = 1,00
CUSUM test linearnosti	Nema značajnog odstupanja od linearnosti.

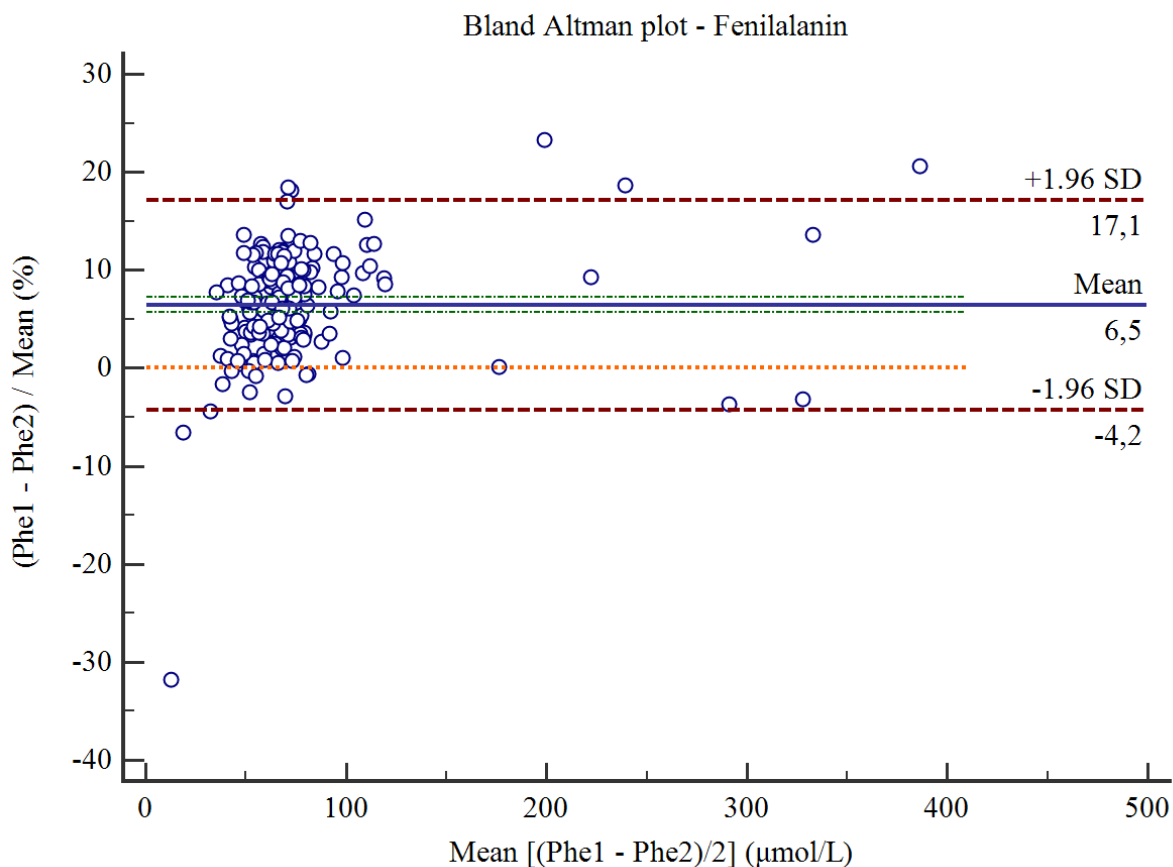
Tablica 5: Brojčani rezultati Passing Bablok regresijske analize za usporedbu koncentracija fenilalanina na dvama tandemskim spektrometrima masa.



Slika 8: Passing Bablok regresijski pravac za fenilalanin.

Usporedbom vrijednosti koncentracija fenilalanina dobivenih dvama tandemskim spektrometrima masa utvrđeno je postojanje konstantne (95%-tni CI za vrijednost odsječka na y-osi ne uključuje 0) te proporcionalne razlike (95%-tni CI za nagib ne uključuje 1).

#### 4.1.2 Bland Altman analiza



**Slika 9:** Bland Altmanov dijagram relativnih razlika koncentracija fenilalanina dobivenih na dvama tandemskim spektrometrima. Phe1 odgovara vrijednostima s UPLC Nexera-MS8050, a Phe2 s UPLC Nexera-API3200. Relativne razlike dvaju mjerenja prikazane su u odnosu na srednju vrijednost dvaju mjerenja. Udaljenost na y-osi od srednje razlike dvaju mjerenja 0 do stvarne srednje razlike dvaju mjerenja predstavlja BIAS.

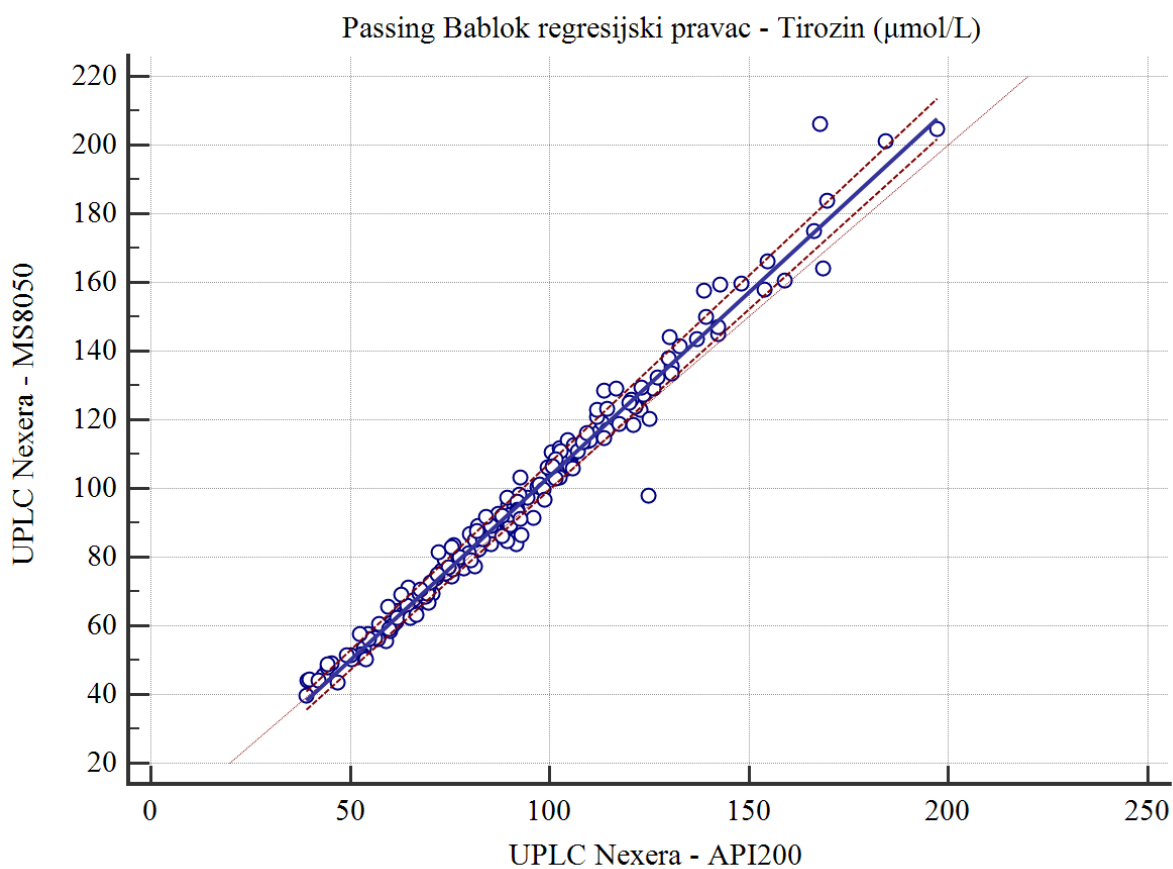
U koncentracijama fenilalanina izmjerenim na dvama tandemskim spektrometrima postoji statistički značajna razlika (95%-tni CI srednje razlike dvaju mjerenja ne sadrži 0). Vrijednosti koncentracija fenilalanina izmjerene na UPLC Nexera-MS8050 tandemskom masenom spektrometru u prosjeku su za 5,5 µmol/L (6,5%) više u odnosu na koncentracije fenilalanina izmjerene na UPLC Nexera-API3200.

## 4.2 Usporedba koncentracija tirozina

### 4.2.1 Passing Bablok regresijska analiza

Varijabla X	Koncentracija tirozina izmjerena na UPLC Nexer-API3200
Varijabla Y	Koncentracija tirozina izmjerena na UPLC Nexera-MS8050
Broj uzoraka	185
Jednadžba pravca	$y = -3,711739 + 1,072785 x$
Odsječak na y – osi (A)	-3,7117
95% CI	-5,4062 – (-1,8530)
Nagib pravca (B)	1,0728
95% CI	1,0519 – 1,0928
CUSUM test linearnosti	P = 0,51 Nema značajnog odstupanja od linearnosti.

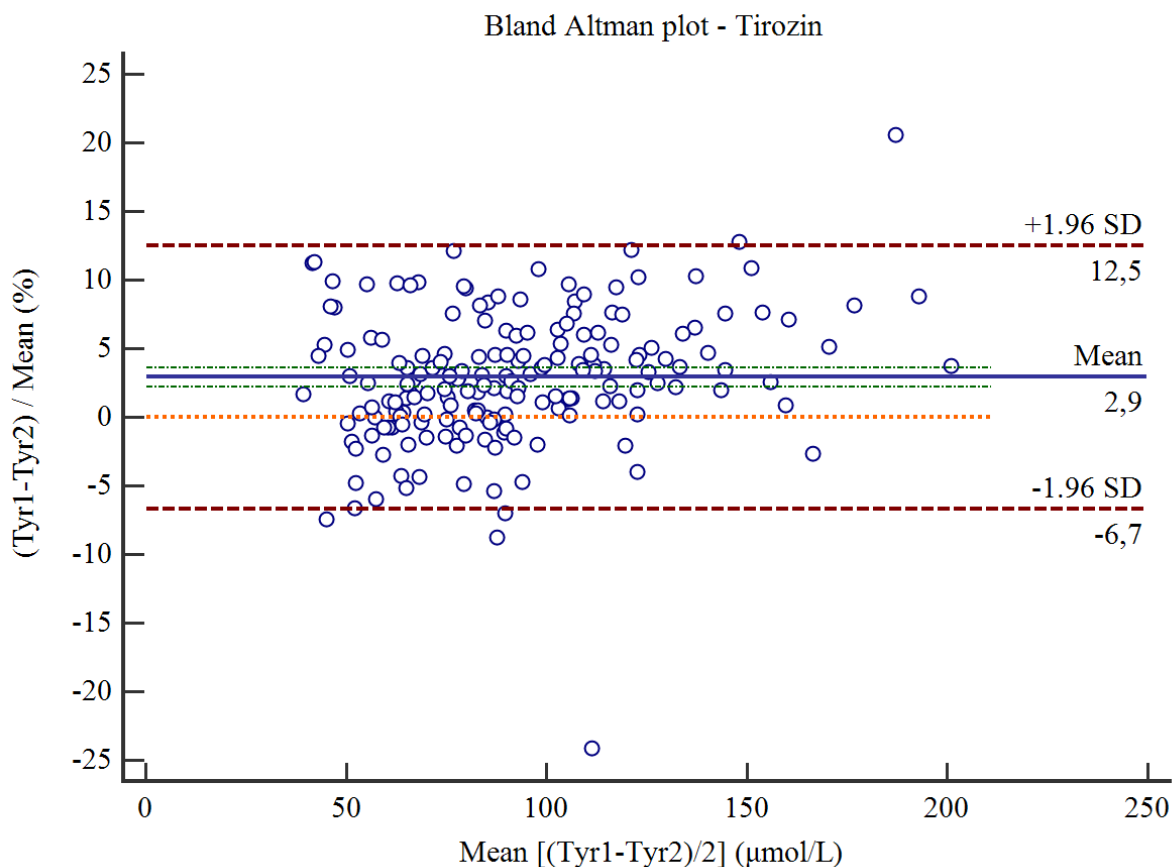
*Tablica 6: Brojčani rezultati Passing Bablok regresijske analize za usporedbu koncentracija tirozina na dvama tandemskim spektrometrima masa.*



*Slika 10: Passing Bablok regresijski pravac za tirozin.*

Usporedbom vrijednosti koncentracija tirozina dobivenih dvama tandemskim spektrometrima masa utvrđeno je postojanje konstantne (95%-tni CI za vrijednost odsječka na y-osi ne uključuje 0) te proporcionalne razlike (95%-tni CI za nagib ne uključuje 1).

#### 4.2.2 Bland Altman analiza



**Slika 11:** Bland Altmanov dijagram relativnih razlika koncentracija tirozina dobivenih na dvama tandemskim spektrometrima. Tyr1 odgovara vrijednostima s UPLC Nexera-MS8050, a Tyr2 s UPLC Nexera-API3200. Relativne razlike dvaju mjerenja prikazane su u odnosu na srednju vrijednost dvaju mjerenja. Udaljenost na y-osi od srednje razlike dvaju mjerenja 0 do stvarne srednje razlike dvaju mjerenja predstavlja BIAS.

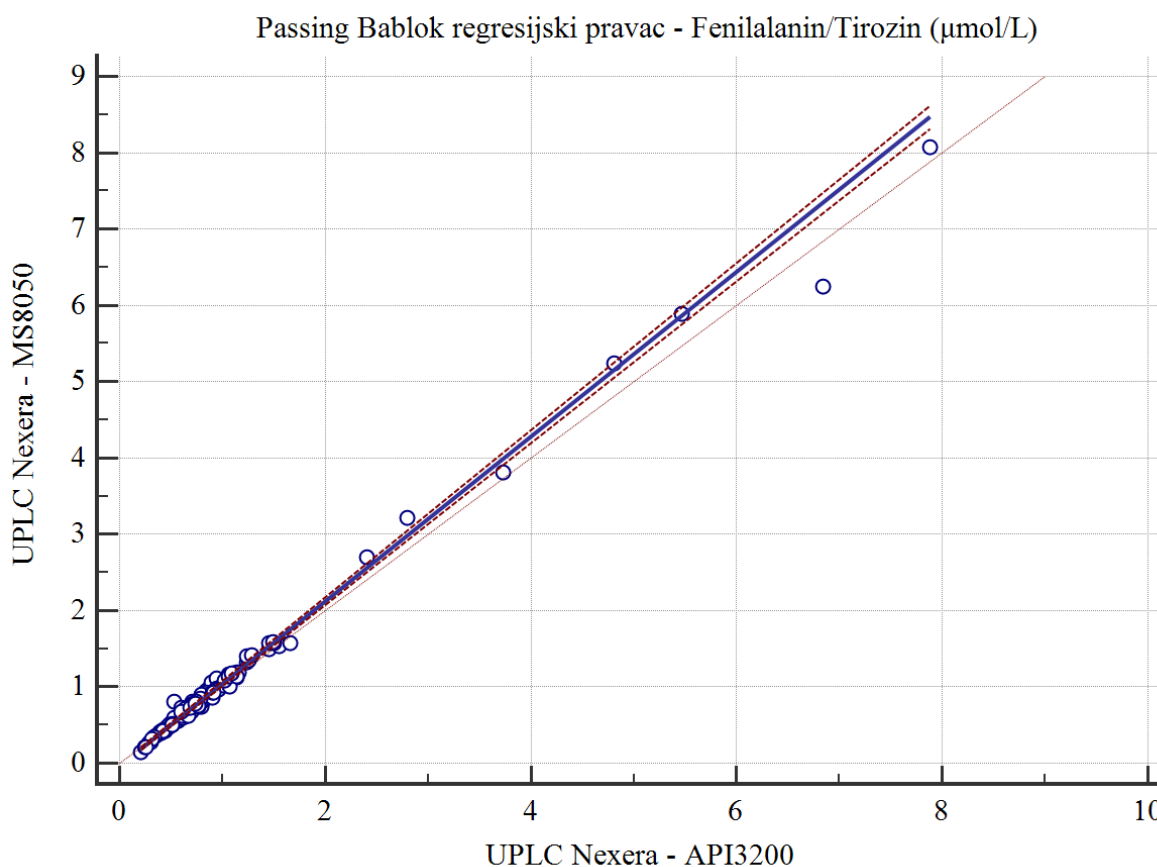
Između koncentracija tirozina izmjerenim na dvama tandemskim spektrometrima postoji statistički značajna razlika (95%-tni CI srednje razlike dvaju mjerenja ne sadrži 0). Vrijednosti koncentracija tirozina izmjerene na UPLC Nexera-MS8050 tandemskom masenom spektrometru u prosjeku su za 3,1 µmol/L (2,9 %) više u odnosu na koncentracije tirozina izmjerene na UPLC Nexera - API3200.

## 4.3 Usporedba koncentracijskih omjera fenilalanina i tirozina

### 4.3.1 Passing Bablok regresijska analiza

Varijabla X	Phe/ Tyr izmjeren na UPLC Nexera-API3200
Varijabla Y	Phe/ Tyr izmjeren na UPLC Nexera-MS8050
Broj uzoraka	185
Jednadžba pravca	$y = -0,0311343 + 1,078600 x$
Odsječak na y – osi (A)	-0,03113
95% CI	-0,04387 – (-0,01838)
Nagib pravca (B)	1,0786
95% CI	1,0592 – 1,0949
CUSUM test linearnosti	P=0,95 Nema značajnog odstupanja od linearnosti.

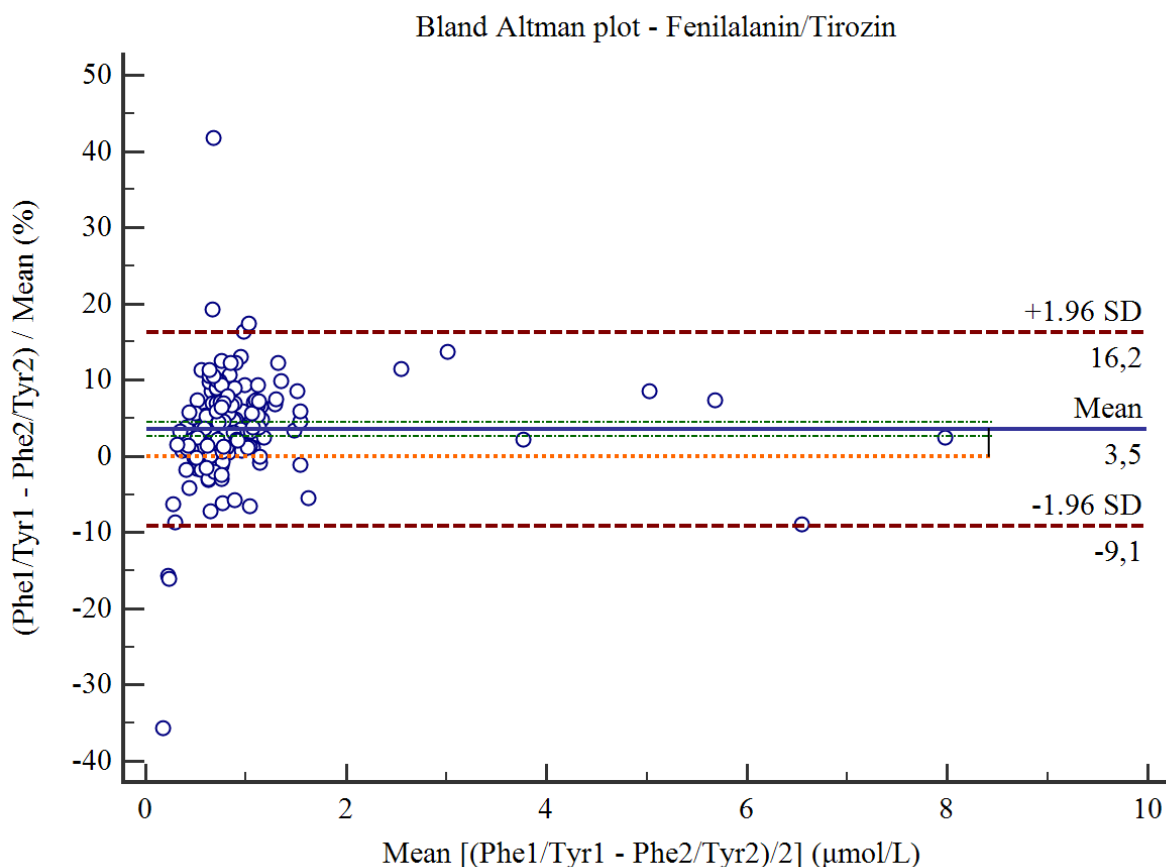
*Tablica 7: Brojčani rezultati Passing Bablok regresijske analize za usporedbu koncentracijskih omjera fenilalanina i tirozina (Phe/Tyr).*



*Slika 12: Passing Bablok regresijski pravac za koncentracijski omjer fenilalanina i tirozina na dvama tandemskim spektrometrima masa.*

Usporedbom vrijednosti koncentracijskih omjera fenilalanina i tirozina dobivenih dvama tandemskim spektrometrima masa utvrđeno je postojanje konstantne (95%-tni CI za vrijednost odsječka na y-osi ne uključuje 0) te proporcionalne razlike (95%-tni CI za nagib ne uključuje 1) u mjerenjima.

#### 4.3.2 Bland Altman analiza



**Slika 13:** Bland Altmanov dijagram relativnih razlika koncentracija tirozina dobivenih na dvama tandemskim spektrometrima. Phe1/Tyr1 odgovara vrijednostima s UPLC Nexera-MS8050, a Phe2/Tyr2 s UPLC Nexera-API3200. Relativne razlike dvaju mjerenja prikazane su u odnosu na srednju vrijednost dvaju mjerenja. Udaljenost na y osi od srednje razlike dvaju mjerenja 0 do stvarne srednje razlike dvaju mjerenja predstavlja BIAS.

Između koncentracijskih omjera fenilalanina i tirozina izmjerenih na dvama tandemskim spektrometrima postoji statistički značajna razlika (95%-tni CI srednje razlike dvaju mjerenja ne sadrži 0). Vrijednosti koncentracijskih omjera izmjerenih na UPLC Nexera-MS8050 tandemskom masenom spektrometru u prosjeku su za 0,04  $\mu\text{mol/L}$  (3,5 %) više u odnosu na koncentracijske omjere izmjerene na UPLC Nexera-API3200.

## 5. RASPRAVA

Novorođenački probir danas je u većini zemalja diljem svijeta obavezna mjera zdravstvene zaštite novorođenčadi. Njegovim provođenjem ostvaruje se mogućnost predsimptomatske identifikacije niza nasljednih metaboličkih i drugih poremećaja, a time osigurava pravodobna rana intervencija oboljele novorođenčadi sa svrhom ublažavanja i prevencije simptoma ili čak smrtnosti povezanih s ovim vrstama poremećaja.

Dva ključna metabolita u probiru na fenilketonuriju tandemskom spektrometrijom masa jesu aminokiseline fenilalanin i tirozin. Nalaz povišene koncentracije fenilalanina pri novorođenačkom probiru uvijek se potvrđuje ponovnim određivanjem koncentracije fenilalanina u inicijalnom uzorku u duplikatu. Većina laboratorija definira vlastite granične vrijednosti koncentracija fenilalanina prema kojima se donosi odluka o potrebi za daljnjim dijagnostičkim postupcima (Chace i Kalas, 2005).

Uvođenjem tandemske spektrometrije masa u novorođenački probir na fenilketonuriju omogućeno je znatno pouzdanije prepoznavanje oboljelih, uz smanjenje stope lažno pozitivnih rezultata  $> 100$  puta u odnosu na tradicionalne fluorimetrijske metode za određivanje koncentracije fenilalanina (Chace i sur., 1998). Ovo je rezultat veće specifičnosti za pojedini analit, određivanja više različitih analita u jednoj seriji mjerenja te izračunavanja molarnih omjera analita od interesa. Simultanom analizom većeg broja aminokiselina tandemskom spektrometrijom masa omogućeno je istovremeno praćenje koncentracija aminokiselina fenilalanina i tirozina, a određivanje omjera njihovih molarnih koncentracija (engl. *Phe/Tyr ratio*) pokazalo se značajnim dodatnim markerom za postavljanje sumnje na fenilketonuriju te pridonijelo smanjenju udjela lažno pozitivnih rezultata pri probiru na fenilketonuriju. Izračunavanje omjera Phe/Tyr, uz određivanje koncentracije primarnog fenilalanina, ima, nadalje, i veliki potencijal za diferencijalnu dijagnozu hiperfenilalaninemija, odnosno razlikovanje klasične fenilketonurije od blažih hiperfenilalaninemija, hiperfenilalaninemija zbog nedostatka BH<sub>4</sub>, prolaznih te sekundarnih hiperfenilalaninemija zbog poremećaja jetrene funkcije (Schulze i sur., 1999; Chace i sur., 1998).

Praćenje koncentracije fenilalanina u krvi oboljelih od fenilketonurije primarni je pokazatelj održavanja metaboličke kontrole putem fenilalanin-restriktivne dijeta te ono određuje daljnji terapijski pristup. Do 12. godine života, za osiguranje pravilnog neurološkog sazrijevanja preporučuje se koncentracije fenilalanina održavati ispod 360  $\mu\text{mol/L}$ , a tijekom



adolescencije i odrasle dobi u optimalnom rasponu od 120 do 600  $\mu\text{mol/L}$  (van Wegberg i sur., 2017).

Uloga vrijednosti omjera Phe/Tyr u praćenju pacijenata s fenilketonurijom nije još do kraja razjašnjena; smatra se kako povećanje omjera kao i/ili sniženje koncentracije tirozina doprinose deficijenciji dopamina, što bi moglo objasniti njihovu visoku korelaciju sa simptomima depresije u oboljelih. Nadalje, budući da koncentracije tirozina tijekom dana znatno variraju, vrijednost omjera Phe/Tyr ovisit će o vremenu uzorkovanja; kao prihvatljivo vrijeme uzorkovanja smatra se ono nakon noćnog gladovanja, kada su koncentracije fenilalanina najviše. Jasnija korelacija povišenog Phe/Tyr omjera i simptoma depresije ili smanjene kognitivne funkcije tek treba biti utvrđena (van Wegberg i sur., 2017).

Sustavno praćenje pacijenata s fenilketonurijom tijekom cijelog života preporučuje se neovisno o stupnju pridržavanja terapije i obliku liječenja, a u svrhu probira na dugoročne komplikacije bolesti te osiguranja adekvatne potpore pacijentu. Kod novorođenčadi kojima je tek dijagnosticirana fenilketonurija preporučuje se učestalo praćenje koncentracije fenilalanina i tirozina do njihove stabilizacije sa svrhom prilagodbe i edukacije roditelja. Do prve godine života, koncentracije fenilalanina bi se trebale pratiti minimalno jednom tjedno, uz učestalije praćenje tijekom razdoblja intenzivnog rasta ili prijelaska s majčinog mlijeka na druge oblike hranjenja. U razdoblju od prve do dvanaeste godine, kontrola fenilalanina provodi se minimalno jednom u dva tjedna ili jednom mjesečno, ovisno o koncentraciji. U adolescenata i odraslih sa stabilnom dijetom preporučuje se provesti određivanje koncentracije fenilalanina minimalno jednom mjesečno. Različiti stresni događaji poput promjene škole, teškoća u prilagodbi na dijetu (osobito tijekom adolescencije), zaposlenje ili početak samostalnog života zahtijevaju češće praćenje koncentracije fenilalanina (van Spronsen i sur., 2017; van Wegberg i sur., 2017; Vockley i sur., 2013).

U Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir KBC-a Zagreb, probir na fenilketonuriju, kao i praćenje metaboličkog statusa pacijenata s fenilketonurijom, provodi se tehnologijom tandemske spektrometrije masa iz uzoraka suhe kapi krvi na filter papiru. Probir na fenilketonuriju dio je proširenog novorođenačkog probira tandemskom spektrometrijom masa koji je trenutno u fazi pilot projekta i podrazumijeva prilagodbu graničnih (engl. *cut – off*) vrijednosti pojedinih analita za utvrđivanje pozitivnog ili negativnog rezultata probira (Bilandžija i sur., 2018).

Za potrebe proširenog novorođenačkog probira, u primjeni su dva tandemska spektrometra masa, UPLC Nexera-MS8050 i UPLC Nexera-API3200. S obzirom da se u RH novorođenački probir provodi centralizirano, osiguranjem dvaju tandemskih spektrometara masa omogućuje se njegovo kontinuirano provođenje i u slučaju da jedan od uređaja nije u funkciji. Nadalje, u laboratorijima za novorođenački probir diljem svijeta, unatoč korištenju tehnologije tandemске spektrometrije masa iste osjetljivosti i istih reagenasa, zabilježene su značajne razlike u graničnim vrijednostima metabolita karakterističnih za određene poremećaje, pa tako i za fenilketonuriju. Stoga se svakom laboratoriju preporuča izrada vlastitih graničnih vrijednosti, primjerenih pojedinoj populaciji, što podrazumijeva optimiziranje udjela lažno negativnih te lažno pozitivnih rezultata. (Vockley i sur., 2013)

Prije definicije koncentracija graničnih vrijednosti, za potrebe novorođenačkog probira na fenilketonuriju bilo je nužno ispitati usporedivost koncentracija fenilalanina, tirozina te njihovih koncentracijskih omjera dobivenih na dvama tandemskim spektrometrima masa. Za usporedbu rezultata korištene su Passing Bablok regresijska analiza i Bland Altman analiza. U analizu su uključena 152 uzorka suhe kapi krvi na filter papiru iz programa novorođenačkog probira te 33 uzorka suhe kapi krvi na filter papiru PKU pacijenata.

Uvjet za provođenje regresijske analize bilo je utvrđivanje linearne povezanosti te visoke korelacije između rezultata dobivenih dvama tandemskim spektrometrima masa. Cusumovim testom linearnosti ni za jedan ispitivani parametar nije pronađeno značajno odstupanje od linearnosti, s P vrijednostima  $>0,05$ . Visoka korelacija rezultata potvrđena je izračunavanjem Spearmanovog koeficijenta korelacije s vrijednošću vrlo blizu 1. Passing Bablok analizom utvrđeno je postojanje konstantne i proporcionalne razlike u mjerenju između dva instrumenta za sve navedene parametre.

Usporedba rezultata dobivenih dvama tandemskim spektrometrima provedena je i Bland Altman statističkom analizom. Srednja razlika u mjerenjima između dva instrumenta iznosila je  $5,5 \mu\text{mol/L}$  za fenilalanin,  $3,1 \mu\text{mol/L}$  za tirozin te  $0,04 \mu\text{mol/L}$  za omjer koncentracija fenilalanina i tirozina. Drugim riječima, vrijednosti promatranih parametara dobivene tandemskim spektrometrom masa UPLC Nexera-MS8050 u prosjeku su  $6,5\%$ ,  $2,9\%$  i  $3,5\%$  više u odnosu na mjerenja dobivena na UPLC Nexera-API3200. Postojanje konstante i proporcionalne razlike između dva tandemska spektrometra masa može se objasniti činjenicom da je uređaj UPLC Nexera-MS8050 približno 100 puta veće osjetljivosti

od uređaja UPLC Nexera-API3200. Zbog tako velike razlike u osjetljivosti na uređaju UPLC-Nexera-MS 8050 očekuju se nešto više vrijednosti koncentracija pojedinih analita.

U svrhu ispitivanja usporedivosti ta dva uređaja i optimizacije mjerenja koncentracija analita kao dio validacije metode provedena je usporedba rezultata i obrađena navedenim statističkim testovima. Usporedba omjera Phe/Tyr pokazuje minimalnu prosječnu razliku od 0,04  $\mu\text{mol/L}$  između dva tandemski spektrometra masa. Ta razlika nije i klinički značajna te pokazuje kako se, iako postoji proporcionalna i konstantna razlika u koncentraciji Phe na dva tandemski spektrometra masa, oba uređaja, uz korištenje oba markera, mogu koristiti u novorođenačkom probiru na fenilketonuriju. Uzimajući u obzir potvrđenu ulogu Phe/Tyr omjera u smanjenju udjela lažno pozitivnih rezultata, uz pronađenu minimalnu razliku između dva tandemski spektrometra, novorođenački probir na fenilketonuriju može se provesti s poboljšanom dijagnostičkom specifičnošću, usporedno na oba ispitivana uređaja.

## 6. ZAKLJUČAK

Usporedba koncentracija fenilalanina, tirozina i njihovih omjera molarnih koncentracija na dva tandemski spektrometra masa različite osjetljivosti pokazala je da postoji statistički značajna razlika između mjerenja na dva ispitivana uređaja. Ta je razlika primarno rezultat različite osjetljivosti dvaju tandemskih spektrometara masa. Na uređaju veće osjetljivosti, UPLC Nexera-MS 8050, izmjerene vrijednosti fenilalanina, tirozina te omjera koncentracija fenilalanina i tirozina u prosjeku su za 5,5  $\mu\text{mol/L}$ , 3,1  $\mu\text{mol/L}$  i 0,04  $\mu\text{mol/L}$  veće u odnosu na vrijednosti izmjerene UPLC Nexera-API 3200.

Uvođenjem novog sekundarnog markera, omjera Phe/Tyr, u probir na fenilketonuriju može se smanjiti broj lažno pozitivnih fenilalanina u postavljanju opravdane dijagnostičke sumnje na fenilketonuriju i poboljšati dijagnostička osjetljivost metode. Izmjerena srednja razlika omjera Phe/Tyr na dva tandemski spektrometra masa ne utječe na kliničku odluku postavljanja sumnje na fenilketonuriju pri novorođenačkom probiru (0,04  $\mu\text{mol/L}$ ). Stoga se, unatoč utvrđenoj proporcionalnoj i konstantnoj razlici u koncentracijama fenilalanina, primjenom omjera Phe/Tyr omogućuje istovremeno provođenje novorođenačkog probira na fenilketonuriju na oba ispitivana tandemski spektrometra masa.

Laboratorij za novorođenački probir započeo je sudjelovanje u shemama vanjske procjene kontrole kvalitete. Svi će kontrolni uzorci biti analizirani na oba uređaja te će se nakon statističke obrade podataka vanjske kontrole kvalitete donijeti odluka koji je od dva navedena uređaja primarni u provođenju novorođenačkog probira i na temelju toga uskladiti njihov rad, te postaviti odgovarajuće granične vrijednosti koncentracija fenilalanina, tirozina i njihovih omjera (Phe/Tyr) za potrebe novorođenačkog probira na fenilketonuriju.

## 7. LITERATURA

- Al Riyami S, Al Maney M, Joshi SN, Bayoumi R. Detection of Inborn Errors of Metabolism using Tandem Mass Spectrometry among High-risk Omani Patients. *Oman Med J*, 2012, 27, 482–485.
- Andermann A, Blancquaert I, Beauchamp S, Déry V. Revisiting Wilson and Jungner in the genomic age: a review of screening criteria over the past 40 years. *Bull World Health Organ*, 2008, 86, 317–319.
- Anjema K, van Rijn M, Hofstede FC, Bosch AM, Hollak CEM, Rubio-Gozalbo E, Maaikje C de Vries MC, Janssen MCH, Boelen CCA, Burgerhof JGM, Blau N, Heiner-Fokkema MR, van Spronsen FJ. Tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria: prediction with the 48-hour loading test and genotype. *Orphanet J Rare Dis*, 2013, 8, 103.
- Bilandžija I, Barić I, Škaričić A, Zekušić M, Križić I, Petković Ramadža D, Žigman T, Fumić K. Program proširenog novorođenačkog probira u Republici Hrvatskoj – zahtjevi i izazovi pravilnog uzimanja suhe kapi krvi. *Paediatr Croat*, 2018, 62, 10–14.
- Bilić-Zulle L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochem Med (Zagreb)*, 2011, 21, 49–52.
- Bland-Altman plot, 2018, [www.medcalc.org](http://www.medcalc.org), pristupljeno 23.5.2018.
- Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet*, 376, 1417–1427.
- Bodamer OA. Screening for Phenylketonuria. *Ann Nestlé*, 2010, 68, 53–57.
- Burton BK, Grange DK, Milanowski A, Vockley G, Feillet F, Crombez EA, Abadie V, Harding CO, Cederbaum S, Dobbelaere D, Smith A, Dorenbaum A. The response of patients with phenylketonuria and elevated serum phenylalanine to treatment with oral sapropterin dihydrochloride (6R-tetrahydrobiopterin): a phase II, multicentre, open – label, screening study. *J Inherit Metab Dis*, 2007, 30, 700–707.
- Campistol J, Gassió R, Artuch R, Vilaseca MA. Neurocognitive function in mild hyperphenylalaninemia. *Dev Med Child Neurol*, 2011, 53, 405–408.

- Chace DH, Sherwin JE, Hillman SL, Lorey F, Cunningham GC. Use of phenylalanine-to-tyrosine ratio determined by tandem mass spectrometry to improve newborn screening for phenylketonuria of early discharge specimens collected in the first 24 hours. *Clin Chem*, 1998, 44, 2405–2409.
- Chace DH, Kalas TA, Naylor EW. Use of Tandem Mass Spectrometry for Multianalyte Screening of Dried Blood Specimens from Newborns. *Clin Chem*, 2003, 49, 1797–1817.
- Chace DH, Kalas TA. A biochemical perspective on the use of tandem mass spectrometry for newborn screening and clinical testing. *Clinical Biochem*, 2005, 38, 296–309.
- Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med (Zagreb)*, 2015, 25, 141–151.
- Gine MF. Flow Injection Mass Spectrometry. U: *Advances in Flow Analysis*. Marek Trojanowicz, urednik, Wiley, John & Sons, 2008, str. 564–566.
- Giovannini M, Verduci E, Salvatici E, Paci S, Riva E. Phenylketonuria: nutritional advances and challenges. *Nutr Metab (Lond)*, 2012, 9, 7.
- Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, Ng KF, Suen MWM, Tai HL. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin Biochem Rev*, 2003, 24, 3–12.
- Kulkarni AA, Vaidya IS. Flow Injection Analysis: An Overview. *J Crit Rev*, 2015, 2, 19–24.
- Levy HL. Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry: A New Era. *Clin Chem*, 1998, 44, 2401–2402.
- Lindsay G. Bacterial Inhibition Assays for Phenylketonuria and other Metabolic Disorders. *AnN c/in Biochem*, 1972, 9, 115–117.
- MacLeod EL, Gleason ST, van Calcar SC, Ney DM. Reassessment of Phenylalanine Tolerance in Adults with Phenylketonuria is Needed as Body Mass Changes. *Mol Genet Metab*, 2009, 98, 331–337.
- Mass Data Terminology, Consideration, And Interpretation, 2015, <http://www.waters.com>, pristupljeno 1.6.2018.

- Mei JV, Alexander JR, Adam BW, Hannon WH. Use of Filter Paper for the Collection and Analysis of Human Whole Blood Specimens., *J Nutr*, 2001, 131, 1631–1636.
- Nanita SC, Kaldon LG. Emerging flow injection mass spectrometry methods for high-throughput quantitative analysis. *Anal Bioanal Chem*, 2016, 408, 23–33.
- Niesser M, Koletzko B, Peissner W. Determination of Creatinine in Human Urine with Flow Injection Tandem Mass Spectrometry. *Ann Nutr Metab*, 2012, 61, 314–321.
- Passing-Bablok regression, 2018, [www.medcalc.org](http://www.medcalc.org), pristupljeno 22.5.2018.
- PAHvdb : Phenylalanine Hydroxylase Gene Locus-Specific Database, 2018., <http://www.biopku.org>, pristupljeno 10.5.2018.
- Petković Ramadža D, Sarnavka V, Škaričić A, Fumić K, Barić I. Novorođenački skrining u Hrvatskoj i u svijetu. *Paediatr Croat*, 2013, 57, 350–357.
- Phenylketonuria, 2018., <https://rarediseases.org>, pristupljeno 15.5.2018.
- Pitt JJ. Newborn Screening. *Clin Biochem Rev*, 2010, 31, 57–68.
- Pourfarzam M, Zadhoush F. Newborn Screening for inherited metabolic disorders; news and views. *J Res Med Sci*, 2013, 18, 801–808.
- Regier DS, Greene CL. Phenylalanine Hydroxylase Deficiency. 2000 Jan 10 (Updated 2017 Jan 5). U: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, i sur., urednici, GeneReviews® (Internet). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018.
- Sahai I, Marsden D. Newborn Screening. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 2009, 46, 55–82.
- Sarnavka V. Novorođenački skrining. *Paediatr Croat*, 2004, 48, 197–203.
- Schulze A, Mayatepek E, Kohlmüller D. Sensitivity of electrospray-tandem mass spectrometry using the phenylalanine/tyrosine-ratio for differential diagnosis of hyperphenylalaninemia in neonates. *Clin Chim Acta*, 1999, 283, 15–20.
- Simultaneous Analysis of Amino Acids, Acylcarnitines, and Succinylacetone in Dried Blood Spots for Research Using Nonderivatized and Derivatized Methods, 2016, <https://www.thermofisher.com>, pristupljeno 22.4.2018.

Sweetman L. Newborn Screening by Tandem Mass Spectrometry. *Clin Chem*, 2001, 47, 1937–1938.

Total Ion Chromatogram (TIC), 2018., [www.shimadzu.com](http://www.shimadzu.com), pristupljeno 29.5.2018.

Triple Quadrupole Mass Spectrometry, 2018., <https://www.creative-proteomics.com>, pristupljeno 20.4.2018.

van Spronsen FJ, van Wegberg AMJ, Ahring K, Bélanger-Quintana A, Blau N, Bosch AM, Burlina A, Campistol J, Feillet F, Giżewska M, Huijbregts SC, Kearney S, Leuzzi V, Maillot F, Muntau AC, Trefz FK, van Rijn M, Walter JH, MacDonald A. Key European guidelines for the diagnosis and management of patients with phenylketonuria. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2017, 5, 743–756.

van Wegberg AMJ, MacDonald A, Ahring K, Bélanger-Quintana A, Blau N, Bosch AM, Burlina A, Campistol J, Feillet F, Giżewska M, Huijbregts SC, Kearney S, Leuzzi V, Maillot F, Muntau AC, van Rijn M, Trefz F, Walter JH, van Spronsen FJ. The complete European guidelines on phenylketonuria: diagnosis and treatment. *Orphanet J Rare Dis*, 2017, 12, 162.

Vockley J, Andersson HC, Antshel KM, Braverman NE, Burton BK, Frazier DM, Mitchell J, Smith WE, Thompson BH, Berry SA. Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline. *Genet Med*, 2014, 16, 188–200.

Vogesser M. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry – Application in the Clinical Laboratory. *Clin Chem Lab Med*, 2003; 41, 117–12.

Wilcken B, Wiley V, Hammond J, Carpenter K. Screening Newborns for Inborn Errors of Metabolism by Tandem Mass Spectrometry. *N Engl J Med*, 2003, 348, 2304–2312.

Williams RA, Mamotte CDS, Burnett JR. Phenylketonuria: An Inborn Error of Phenylalanine Metabolism. *Clin Biochem Rev*, 2008, 29, 31–41.

Yudkoff M. Phenylalanine Metabolism: Phenylketonuria. U: Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects. Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW i sur., urednici, Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.



## 8. SAŽETAK

Novorođenački probir na fenilketonuriju u Republici Hrvatskoj provodi se centralizirano, u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir KBC-a Zagreb od 1978. godine. 2017. godine u Hrvatskoj započinje prošireni novorođenački probir tandemskom spektrometrijom masa. Ključni metaboliti u novorođenačkom probiru na fenilketonuriju tandemskom spektrometrijom masa jesu aminokiseline fenilalanin i tirozin, a omjer koncentracija fenilalanina i tirozina dodatno povećava dijagnostičku specifičnost, odnosno smanjuje udio lažno pozitivnih rezultata. Cilj ovog rada bilo je ispitati usporedivost dvaju tandemskih spektrometara masa, UPLC Nexera-API3200, *AB Sciex* i UPLC Nexera-MS8050, *Shimadzu* u određivanju koncentracija aminokiselina fenilalanina, tirozina te njihovih koncentracijskih omjera (Phe/Tyr), koristeći uzorke suhe kapi krvi novorođenčadi te PKU pacijenata. Passing Bablok te Bland Altman statističkom analizom utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u rezultatima svih promatranih parametara, tj. vrijednosti dobivene tandemskim spektrometrom masa UPLC Nexera-MS8050 u prosjeku su 6,5%, 2,9% i 3,5% više u odnosu na mjerenja dobivena na UPLC Nexera-API3200, što se može objasniti većom osjetljivošću UPLC Nexera-MS8050. Utvrđena srednja razlika za vrijednosti omjera Phe/Tyr od 0,04  $\mu\text{mol/L}$  ne smatra se i klinički značajnom, tj. unatoč konstantnoj i proporcionalnoj razlici u koncentracijama fenilalanina, zaključujemo kako istovremeno praćenje koncentracija fenilalanina i omjera Phe/Tyr opravdava simultano korištenje ispitivanih tandemskih spektrometara za postavljanje sumnje na fenilketonuriju pri novorođenačkom probiru.

## 9. SUMMARY

Newborn screening for Phenylketonuria in Republic of Croatia has been centrally organized, in the Department of laboratory diagnostics of inherited metabolic disorders and newborn screening at University Hospital Centre Zagreb, since 1978. Since 2017 Croatia has started expanded NBS with tandem mass spectrometry. Key metabolites included in newborn screening for phenylketonuria by tandem mass spectrometry are aminoacids phenylalanine and tyrosine, and their molar Phe/Tyr ratio further enhances the diagnostic specificity, i.e. reduces the false positive ratio. The aim of this thesis was to examine the differences between two tandem mass spectrometers, UPLC Nexera-API3200, *AB Sciex* i UPLC Nexera-MS8050, *Shimadzu*, for phenylalanine and tyrosine concentrations, as well as their molar ratio (Phe/Tyr), in dried blood spot samples obtained from newborns and PKU patients. Passing Bablok analysis and Bland Altman plot analysis revealed statistically significant differences for all observed parameters. Values measured on UPLC Nexera - MS8050 tandem mass spectrometer were on average 6,5%, 2,9% and 3,5% higher compared to results measured on UPLC Nexera-API3200, due to higher sensitivity of UPLC Nexera-MS8050. Mean difference for Phe/Tyr ratio of 0,04  $\mu\text{mol/L}$  is not considered clinically relevant and, despite constant proportional differences in phenylalanine concentrations, we conclude that observing both phenylalanine concentrations and Phe/Tyr ratio justifies simultaneous use of examined tandem mass spectrometers for sensitive and specific newborn screening for phenylketonuria.

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu  
Farmaceutsko-biokemijski fakultet  
Studij: Medicinska biokemija  
Zavod za medicinsku biokemiju i hematologiju  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

### Usporedba koncentracija fenilalanina, tirozina i njihovih omjera (Phe/Tyr) izmjerenih na dvama tandemskim spektrometrima masa u svrhu novorođenačkog probira i praćenja metaboličke kontrole pacijenata s fenilketonurijom

Donatella Čagljević

#### SAŽETAK

Novorođenački probir na fenilketonuriju u Republici Hrvatskoj provodi se centralizirano, u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir KBC-a Zagreb od 1978. godine. 2017. godine u Hrvatskoj započinje prošireni novorođenački probir tandemskom spektrometrijom masa. Ključni metaboliti u novorođenačkom probiru na fenilketonuriju tandemskom spektrometrijom masa jesu aminokiseline fenilalanin i tirozin, a omjer koncentracija fenilalanina i tirozina dodatno povećava dijagnostičku specifičnost, odnosno smanjuje udio lažno pozitivnih rezultata. Cilj ovog rada bilo je ispitati usporedivost dvaju tandemskih spektrometara masa, UPLC Nexera-API3200, *AB Sciex* i UPLC Nexera-MS8050, *Shimadzu* u određivanju koncentracija aminokiselina fenilalanina, tirozina te njihovih koncentracijskih omjera (Phe/Tyr), koristeći uzorke suhe kapi krvi novorođenčadi te PKU pacijenata. Passing Bablok te Bland Altman statističkom analizom utvrđeno je postojanje statistički značajne razlike u rezultatima svih promatranih parametara, tj. vrijednosti dobivene tandemskim spektrometrom masa UPLC Nexera-MS8050 u prosjeku su 6,5%, 2,9% i 3,5% više u odnosu na mjerenja dobivena na UPLC Nexera-API3200, što se može objasniti većom osjetljivošću UPLC Nexera-MS8050. Utvrđena srednja razlika za vrijednosti omjera Phe/Tyr od 0,04  $\mu\text{mol/L}$  ne smatra se i klinički značajnom, tj. unatoč konstantnoj i proporcionalnoj razlici u koncentracijama fenilalanina, zaključujemo kako istovremeno praćenje koncentracija fenilalanina i omjera Phe/Tyr opravdava simultano korištenje ispitivanih tandemskih spektrometara za postavljanje sumnje na fenilketonuriju pri novorođenačkom pobiru.

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

Rad sadrži: 54 stranice, 13 grafičkih prikaza, 7 tablica i 46 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Novorođenački probir, fenilketonurija, tandemska spektrometrija masa, fenilalanin, tirozin, omjer Phe/Tyr, Passing Bablok regresija, Bland Altman analiza

Mentor: **Dr. sc. Ksenija Fumić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ksenija Fumić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Nada Vrkić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

**Dr. sc. Toma Keser**, *asistent – znanstveni novak Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2018.

## Basic documentation card

University of Zagreb  
Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
Study: Medical biochemistry  
Department of Medical Biochemistry and Hematology  
Domagojeva 2, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

### **Comparison of phenylalanine and tyrosine concentrations and their molar ratio (Phe/Tyr) measured on two tandem mass spectrometers for purposes of newborn screening and follow up of patients with phenylketonuria**

**Donatella Čagljević**

#### **SUMMARY**

Newborn screening for Phenylketonuria in Republic of Croatia has been centrally organized, in the Department of laboratory diagnostics of inherited metabolic disorders and newborn screening at University Hospital Centre Zagreb, since 1978. Since 2017 Croatia has started expanded NBS with tandem mass spectrometry. Key metabolites included in newborn screening for phenylketonuria by tandem mass spectrometry are aminoacids phenylalanine and tyrosine, and their molar Phe/Tyr ratio further enhances the diagnostic specificity, i.e. reduces the false positive ratio. The aim of this thesis was to examine the differences between two tandem mass spectrometers, UPLC Nexera-API3200, *AB Sciex* i UPLC Nexera-MS8050, *Shimadzu*, for phenylalanine and tyrosine concentrations, as well as their molar ratio (Phe/Tyr), in dried blood spot samples obtained from newborns and PKU patients. Passing Bablok analysis and Bland Altman plot analysis revealed statistically significant differences for all observed parameters. Values measured on UPLC Nexera-MS8050 tandem mass spectrometer were on average 6,5%, 2,9% and 3,5% higher compared to results measured on UPLC Nexera-API3200, due to higher sensitivity of UPLC Nexera-MS8050. Mean difference for Phe/Tyr ratio of 0,04  $\mu\text{mol/L}$  is not considered clinically relevant and, despite constant proportional differences in phenylalanine concentrations, we conclude that observing both phenylalanine concentrations and Phe/Tyr ratio justifies simultaneous use of examined tandem mass spectrometers for sensitive and specific newborn screening for phenylketonuria.

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

Thesis includes: 54 pages, 13 figures, 7 tables and 46 references. Original is in Croatian language.

**Keywords:** Newborn screening, Phenylketonuria, tandem mass spectrometry, phenylalanine, tyrosine, Phe/Tyr ratio, Passing Bablok regression, Bland Altman plot

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

**Reviewers:** **Ksenija Fumić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Nada Vrkić, Ph.D.** Associate Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry  
**Toma Keser, Ph.D.** Assistant - research associate, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: June 2018.

