

Usporedba koncentracija fenilalanina i slobodnog karnitina u uzorcima suhe kapi krvi, plazme i suhe kapi plazme na tandemskom spektrometru masa

Šarčević, Željka

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:044719>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-31**



Repository / Repozitorij:

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



Željka Šarčević

**Usporedba koncentracija fenilalanina i slobodnog
karnitina u uzorcima suhe kapi krvi, plazme i
suhe kapi plazme na tandemskom spektrometru
masa**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2020.

Ovaj diplomski rad prijavljen je na kolegiju Specijalna područja kliničke biokemije na Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Laboratoriju za nasljedne metaboličke bolesti Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod stručnim vodstvom izv. prof. dr. sc. Ksenije Fumić.

Zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc Kseniji Fumić na prenesenom znanju te velikom trudu i strpljenju pri izradi ovog rada.

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

Zahvaljujem svojim roditeljima i ostali članovima obitelji te svim prijateljima i prijateljicama koji su bili uz mene kao bezuvjetna podrška tijekom studija.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Rijetke bolesti	1
1.2. Nasljedni metabolički poremećaji	1
1.3. Novorođenački probir	2
1.3.1. Novorođenački probir u Hrvatskoj	3
1.4. Primjena uzoraka suhe kapi krvi u novorođenačkom probiru	4
1.4.1. Prednosti i nedostaci suhe kapi krvi	5
1.5. Suha kap plazme	7
1.6. Karnitin	7
1.6.1. Važnost karnitina i acilkarnitina	8
1.6.2. Nasljedni metabolički poremećaji oksidacije masnih kiselina i ciklusa karnitina	9
1.6.2.1. Primarni manjak transportera karnitina	10
1.7. Aminokiseline	11
1.7.1. Fenilketonurija	12
1.8. Tandemska spektrometrija masa u novorođenačkom probiru	14
2. OBRAZLOŽENJE TEME	16
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Ispitanici	17
3.2. Uzorci	17
3.3. Materijali	17
3.3.1. Kemikalije	17
3.3.2. Oprema	18
3.3.3. Instrumenti	18
3.4. Priprema uzoraka	18

3.5. Analiza	20
3.6. Statistička obrada	24
4. REZULTATI	27
5. RASPRAVA	33
6. ZAKLJUČAK	34
7. LITERATURA	35
8. SAŽETAK	38
9. SUMMARY	39
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA / BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Rijetke bolesti

Rijetke su bolesti prema prihvaćenoj definiciji u Republici Hrvatskoj (RH) i zemljama Europske Unije one bolesti koje se javljaju u manje od pet pojedinaca na 10.000 stanovnika (Bilandžija i sur., 2018). Europsko udruženje za rijetke bolesti procjenjuje da postoji oko 6 000 - 8 000 raznih oboljenja koje spadaju u kategoriju rijetkih bolesti, dok samo u Europskoj Uniji se procjenjuje da od rijetkih bolesti boluje oko 30 milijuna ljudi. Karakterizira ih široki spektar poremećaja i simptoma. Takve bolesti su kronične, degenerativne, a često i smrtonosne. Zbog male incidencije u općoj populaciji, relativno se kasno otkrivaju, a za velik broj rijetkih bolesti još uvijek ne postoji adekvatno liječenje (<https://www.eurordis.org/>).

1.2. Nasljedni metabolički poremećaji

Pojam nasljednih metaboličkih poremećaja (engl. *inborn errors of metabolism*) uveo je u medicinu Garrod 1909. godine kada je opisao kliničku sliku alkaptonurije, albinizma, pentozurije i cistinurije. Nasljedni metabolički poremećaji uzrokovani su mutacijama jednog gena (monogenske bolesti). Nasljeđuju se većinom prema Mendelovim zakonima nasljeđivanja, recesivno ili dominantno, autosomno ili X-vezano. Vrlo mali broj ih se nasljeđuje mitohondrijskim ili maternalnim nasljeđivanjem (poremećaji koji su posljedica mutacija mitohondrijske DNA). Do danas je poznato više od 500 nasljednih metaboličkih poremećaja (poznati su biokemijski mehanizmi nastanka koji mogu objasniti patogenezu). Posljedica mutacije gena je nedostatna sinteza ili sinteza nefunkcionalnog proteina (najčešće enzima). Zbog toga dolazi do promjene metaboličkih puteva, što uzrokuje nakupljanje supstrata i aktiviranje sporednih metaboličkih mehanizama koji dovode do nakupljanja produkata. Ti procesi uvjetuju razvoj određene kliničke slike. Budući da je mogućnost mutacija na proteinima izuzetno velika, razumljiva je i raznovrsnost promjena na funkcionalnoj razini. Posljedica toga je širok spektar mogućih promjena na biokemijskoj razini i velika varijabilnost kliničke slike. Učestalost pojedinih nasljednih metaboličkih poremećaja razmjerno je niska, ali kao skupina važan su medicinski problem, posebice među bolestima dječje dobi. Smatra se da ti poremećaji zahvaćaju najmanje 1% sve novorođenčadi. Broj novootkrivenih nasljednih metaboličkih poremećaja u stalnom je porastu. Tome posebice

pridonosi sve bolja edukacija i razvoj novih tehnologija. Posljednjih desetljeća najznačajniju ulogu u tome imala je primjena tandemske spektrometrije masa (MS-MS) koja je danas standardni dio opreme većine metaboličkih laboratorija. Osim za bolesnika, pravodobna i točna dijagnoza važna je i za obitelj, jer zbog načina nasljeđivanja postoji visok rizik ponavljanja bolesti unutar iste obitelji (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009.). Laboratorijska dijagnostika se za rijetke metaboličke i druge prirođene bolesti može provoditi na nekoliko organizacijskih razina: prenatalno, u okviru novorođenačkog probira ili kao selektivna dijagnostika nakon postavljene kliničke sumnje. Uspješnost provođenja selektivnog probira ovisi ponajprije o pravodobno postavljenoj kliničkoj sumnji i mogućnosti provođenja analiza prema odgovarajućim postupcima. Dijagnostička obrada na temelju ovakvog pristupa često je dugotrajna, iscrpljujuća za pacijenta i obitelj, a ponekad do postavljanja konačne dijagnoze mogu proći i mjeseci. Osim toga, neke nasljedne metaboličke bolesti mogu imati vrlo brz tijek gdje svaki dan može biti presudan za povoljan ishod te se stoga zadnjih godina sve više ovih bolesti uključuje u programe novorođenačkih probira pojedinih zemalja ili regija. (Bilandžija i sur., 2018).

1.3. Novorođenački probir

Novorođenački probir za određenim rijetkim metaboličkim i drugim prirođenim bolestima sustav je organiziranog traganja u cjelokupnoj novorođenačkoj populaciji neke zemlje (ili regije) s ciljem njihova prepoznavanja prije nego izazovu posljedice po zdravlje djeteta (Bilandžija i sur., 2018). Novorođenački probir je započeo ranih 1960-ih kada je dr. Robert Guthrie razvio test koji koristi rast bakterija za ispitivanje povišenih koncentracija fenilalanina u uzorcima suhe kapi krvi. Suha kap krvi na filter papiru (engl. *dried blood spots* - DBS) prikuplja se iz pete novorođenčadi u određenom vremenskom periodu djetetova života. Metode kojima se provodi novorođenački probir su gotovo u potpunosti kvantitativne, zbog čega zahtijevaju dosljedno jednak volumen uzorka kako bi rezultati bili usporedivi – laboratoriji koji provode novorođenački probir se oslanjaju na činjenicu da jednaki isječci suhe kapi krvi sadrže relativno uniforman volumen krvi (Hall i sur., 2015). Laboratorijska dijagnostika najčešće je organizirana tako da jedan laboratorij pokriva područje neke regije (oko 3 000 000 stanovnika) ili države. Laboratorij prima uzorke suhih kapi krvi iz svih rodilišta tog područja. Ovisno o incidenciji bolesti u pojedinoj populaciji, financijskim i organizacijskim mogućnostima, u sustavno traganje mogu biti uključene fenilketonurija, kongenitalna hipotireoza, galaktozemija, leucinoza, homocistinurija, manjak biotinidaze,

manjak glukoza-6-fosfat dehidrogenaze, cistična fibroza, kongenitalna adrenalna hiperplazija, Tay-Sachsova bolest i dr. Da bi neka bolest ušla u nacionalni program sustavnog traganja, mora zadovoljiti sljedeće uvjete: dovoljno visoka učestalost u populaciji, nemogućnost postavljanja rane kliničke dijagnoze, mogućnost liječenja nakon ranog otkrivanja, postojanje odgovarajućeg testa za provođenje novorođenačkog probira (brzog, specifičnog i osjetljivog) i povoljan odnos troškova programa prema ekonomskoj koristi ranog otkrivanja. To su kriteriji Wilsona i Jungera koje je još 1975. godine prihvatila Svjetska zdravstvena organizacija (SZO). Razvoj novih tehnologija otvorio je prostor za proširenje programa novorođenačkog probira. Izolacija DNA iz suhe kapi krvi omogućuje probir za hemoglobinopatije, cističnu fibrozu i dr. MS-MS tehnologija omogućuje probir na niz bolesti iz skupine aminoacidopatija, organskih acidurija, poremećaja β -oksidacije masnih kiselina i lizosomskih bolesti nakupljanja (analizom acilkarnitina, aminokiselina i nerazgrađenih supstrata lizosomskih enzima). Tako se stvara mogućnost rane dijagnostike više od 50 bolesti. Stoga je nužna pažljiva interpretacija dobivenih nalaza, što podrazumijeva suradnju cijelog tima za novorođenački probir (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009).

1.3.1. Novorođenački probir u Hrvatskoj

Novorođenački probir je u Hrvatskoj od 1986. godine obavezna mjera zdravstvene zaštite novorođenčeta. Nacionalni plan za rijetke bolesti koji uključuje i proširenje novorođenačkog probira metodom tandemske spektrometrije masa usvojen je 2015. godine odlukom vlade Republike Hrvatske. Početak proširenog novorođenačkog probira tehnologijom tandemske spektrometrije masa zahtijevao je uvođenje određenih promjena u odnosu na dotadašnji probir na fenilketonuriju i prirođenu hipotireozu (koji se provodio spektrofluorimetrijskim metodama). Temeljem odluke Povjerenstva za novorođenački probir Ministarstva zdravstva RH program novorođenačkog probira proširen je na, za sada, još šest bolesti: 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, nedostatak karnitinskog nosača, izovaleričnu aciduriju i glutarnu aciduriju tipa I. Krajem 2017. godine, nakon nekoliko godina priprema, stekli su se analitički i organizacijski preduvjeti za provođenje proširenog novorođenačkog probira tehnologijom tandemske spektrometrije masa (odgovarajuća oprema i educirano osoblje). Organizacijski se proces novorođenačkog probira može podijeliti na: predanalitičke postupke, analitički dio i postupke nakon pozitivnoga novorođenačkog probira. Iskustva drugih zemalja, koje već dulje

vrijeme provode prošireni novorođenački probir, pokazala su da jedino dobro organizirano i usklađeno djelovanje na sve tri razine može u konačnici donijeti dobrobiti novorođenčetu, njegovoj obitelji i društvu u cjelini. Za uspješno provođenje proširenog novorođenačkog probira od velike je važnosti odgovarajuće i pravodobno prikupljanje uzoraka iz 32 rodilišta u RH. U ovom dijelu procesa probira ključnu ulogu imaju zdravstveni djelatnici svih hrvatskih rodilišta i neonatoloških odjela kao i patronažne sestre. Analitički dio probira provodi se u Kliničkom bolničkom centru Zagreb u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir. U ovim aktivnostima svakodnevno surađuju specijalisti medicinske biokemije i laboratorijske medicine, laboratorijski inženjeri i tehničari, analitičari (magistri kemije), liječnici specijalisti pedijatri i medicinske sestre svih profila Poliklinike pedijatrije i Zavoda za genetiku i bolesti metabolizma Klinike za pedijatriju KBC-a Zagreb. Svaki nalaz koji je izvan graničnih vrijednosti pedijatri iz tima za novorođenački probir javljaju kolegama pedijatrima i/ ili obiteljima novorođenčeta, dogovaraju daljnje dijagnostičke postupke i daju upute o eventualno potrebnim terapijskim postupcima s novorođenčecom. Kasnije, ako se dodatnim pretragama potvrdi dijagnoza, preuzimaju praćenje bolesnika u suradnji s pedijatrima iz ostalih zdravstvenih ustanova i uz pomoć ostalih članova medicinskog tima (medicinske sestre svih profila, magistar nutricionizma, magistar psihologije, ostalih subspecijalista) (Bilandžija i sur., 2018).

1.4. Primjena uzoraka suhe kapi krvi u novorođenačkom probiru

Uvođenje proširenog novorođenačkog probira u RH uvjetovalo je i novi izgled kartice za uzimanje kapljica krvi na filtarski papir (tzv. Guthrijeve ili PKU kartice). Dio kartice predviđen za uzimanje krvi čini standardizirani filtar papir Whatman 903TM na kome su iscertana četiri kruga. Svaki krug predviđen je za jednu kap krvi koja odgovara volumenu od oko 50 μ L krvi. Od velike je važnosti za razumijevanje svih drugih preporuka, istaknuti da se u postupak mjerenja analita tandemskom spektrometrijom masa uzima uvijek isječak iz kapi krvi od 3,2 mm za koji pretpostavljamo da sadržava 3,1 μ L krvi (ovisno o hematokritu). To je osnovna pretpostavka od koje se polazi u izračunu koncentracija pojedinih analita kojima se koristimo za postavljanje dijagnostičke sumnje u proširenom novorođenačkom probiru. S obzirom na važnost pouzdanog mjerenja, svako odstupanje od preporučenog načina uzimanja dovodi do znatnih odstupanja u izmjenjenim koncentracijama analita i posljedično tome do krivih kliničkih zaključaka sa svim mogućim posljedicama po novorođenče.

Uzorak suhe kapi krvi za provođenje novorođenačkog probira:

- ima ispunjene sve potrebne podatke o majci i djetetu;
- uzet je između 48 i 72 sata djetetova života;
- nema zagađenja alkoholom, kremom, puderom iz rukavica, antikoagulansom iz epruveta ili kapilara;
- ima ispunjena sva četiri iscrtana kruga (ili minimalno dva kruga) ravnomjerno na obje strane filtera papira (bez više slojeva krvi, bez ugruška);
- sušen je minimalno četiri sata na ravnoj, čistoj, neupijajućoj površini bez izravnog utjecaja sunčeve svjetlosti i topline;
- nakon sušenja je pohranjen u prozirnu foliju i poslan u laboratorij sljedećeg radnog dana (najbolje unutar 24 sata od uzimanja krvi) (Bilandžija i sur., 2018).

Uzorci suhe kapi krvi najviše se koriste u svrhu provođenja novorođenačkog probira, no njihova primjena nalazi se i u dijagnozi infekcija, toksikokinetičkim i farmakokinetičkim istraživanjima, metaboličkim profiliranjima, terapijskom praćenju lijekova, forenzičkoj toksikologiji i kontroli ekoloških kontaminacija (Grüner i sur., 2015).

Nakon pozitivnog novorođenačkog probira, sumnja na pojedinu bolest postavlja se temeljem pozitivnih nalaza potvrdnih testova što su u našem slučaju profil acilkarnitina i aminokiselina u plazmi, aminokiseline u plazmi, organske kiseline u urinu i analiza gena.

1.4.1. Prednosti i nedostaci suhe kapi krvi

U usporedbi s klasičnom venepunkcijom, za suhu kap krvi potreban je manji volumen krvi, uzorkovanje je jednostavno, neinvazivno i jeftino, rizik za kontaminaciju bakterijama ili hemolizu je minimalan te se suhe kapi krvi mogu čuvati duži vremenski period na sobnoj temperaturi bez utjecaja na stabilnost analita (Grüner i sur., 2015.).

Mikrouzorkovanje omogućava prikupljanje malih volumena krvi u zdravstvenoj ustanovi ili pacijenti mogu samo provoditi uzorkovanje. Također, izbjegava se stresna venepunkcija kod djece jer djeca ne doživljavaju bol i stres na isti način kao odrasli, ne mogu u potpunosti razumjeti zašto su podvrgnuti procesu venepunkcije te pate zbog nesigurnosti i gubitka kontrole. Uzorkovanje se može vršiti bilo gdje, bilo kada, s minimalnom vještinom uzorkovanja. U kontekstu pedijatrijske medicine, to znači da roditelji i njegovatelji mogu uzeti uzorak kod kuće ili bilo gdje drugdje, bez putovanja do laboratorija i čekanja u čekaonicama. Pravilno osušeni uzorci pošalju se poštom iz ruralnih dijelova zemlje do centralnog laboratorija (uzorke je moguće slati običnom poštom na sobnoj temperaturi) (<https://www.neoteryx.com/>).

Usprkos jednakom načinu prikupljanja uzoraka, razlika u hematokritu i ukupnom volumenu krvi može rezultirati time da isječki izrezani iz iste kapljice krvi sadrže različit omjer krvi i seruma. Referentni interval hematokrita za novorođenčad je između 42% i 65%; nedonoščad imaju malo niže vrijednosti (Hall i sur., 2015). Uzorak suhe kapi krvi normalnog hematokrita sadrži oko 50 μL pune krvi s prosječnim promjerom kapi od 12 mm. Kapanjem krvi na filter papir krv ulazi u matriks filter papira. Plazma zauzima veći volumen u vlaknima filter papira od eritrocita (na što utječe hematokrit) i to dovodi do gubitka homogenosti kroz cijeli uzorak suhe kapi krvi (kromatografski efekt), čime se eritrociti koncentriraju na rubove. Gubitak homogenosti kapi krvi dovodi do povećanih koncentracija analita čije se koncentracije mjere u eritrocitima u perifernim isječcima u odnosu na isječke uzete iz središta suhe kapi krvi. Veličina (volumen krvi apliciran na filter papir) i kvaliteta suhe kapi krvi te mjesto uzimanja isječka imaju značajan utjecaj na rezultate analize. Vrijednosti hematokrita variraju među pojedincima i ovise o kliničkom stanju pacijenta. Hematokrit značajno utječe na vrijeme potrebno za sušenje suhe kapi krvi, homogenost i ekstrakciju analita jer utječe na viskoznost krvi. Kod uzoraka s visokim hematokritom krv je viskoznija, što utječe na raspodjelu eritrocita i krvne plazme kroz filter papir. Razlike u hematokritu moguće je uočiti i golim okom jer suha kap krvi s nižim hematokritom je više simetrična s glatkim rubovima, dok su one s višim hematokritom manje, tamnije i imaju nejednak rub. Studije su pokazale da je veličina suhe kapi krvi obrnuto proporcionalna hematokritu (veličina suhe kapi krvi se smanjuje kako raste hematokrit). Ovo ima utjecaj na kvantifikaciju biomolekula u uzorcima suhe kapi krvi kada se izrezuje isječak točno određene veličine. U literaturnim podacima prikazano je da se koncentracije aminokiselina povećavaju s povišenim vrijednostima hematokrita. Sličan utjecaj hematokrit ima i na slobodni karnitin (C0). Utjecaj hematokrita kada se uspoređuje centralni i periferni isječak može biti aditivan, čak i sinergističan. Utjecaj hematokrita se može izbjeći ako se analizira čitava suha kap krvi, ali količina krvi koja se aplicira na filter papir mora biti točno određenog volumena. Novi sustavi za prikupljanje krvi koji su prebrodili utjecaj hematokrita i volumena krvi su sustavi koji analiziraju cijelu suhu kap umjesto izrezivanja isječka, odnosno koriste točno određeni volumen krvi na filter papiru. Iako su ova rješenja skuplja od običnog filter papira, njihova mogućnost da prebrode utjecaj hematokrita i volumena krvi rezultiraju boljim analitičkim značajkama i trebaju se razmotriti za praćenje pacijenata s nasljednim metaboličkim poremećajima kako bi rezultati analiza bili pouzdaniji (Moat i sur., 2020). U studiji koja je testirala utjecaj porasta hematokrita ispitano je 5 različitih koncentracija hematokrita u kombinaciji s 2 različite pozicije izrezanog isječka (centralni i periferni) te su svi ispitani metaboliti pokazali utjecaj

hematokrita na koncentraciju analita. Koncentracije analita su bile više u uzorcima s višim hematokritom, a niže s nižim hematokritom neovisno o poziciji izrezanog diska. Kod niskog hematokrita potreban je manji ukupni volumen krvi da se ispuni označeno područje nego kod visokog hematokrita što može objasniti razlike u koncentracijama analita. Mjesto uzimanja isječka ima veći utjecaj kod nižih vrijednosti hematokrita nego kod viših, gdje su više koncentracije analita pronađene u perifernom dijelu nego u središtu zbog kromatografskog efekta (Holub, 2006.). Također, pritisnuti uzorci suhe kapi krvi, slučajno zbog nedovoljnog sušenja ili namjerno, radi ispunjavanja cijelog označenog kruga, mogu dovesti do lažno sniženog rezultata analize (Moat i sur., 2020).

1.5. Suha kap plazme

Za razliku od kartica za prikupljanje suhe kapi krvi, s Noviplexom suha kap plazme se dobiva tako da se plazma odvaja od stanica unutar same komercijalno pripremljene kartice, čime se eliminira utjecaj hematokrita, uzorci su stabilniji i rezultati analize su usporedivi s metodama koje koriste klasične načine uzorkovanja plazme. Kartice se sastoje od sustava membrana i filtara te su dizajnirane za uklanjanje eritrocita iz pune krvi kapilarnom silom koja vuče matriks kroz karticu. Ostatna plazma se širi na diskove i suši. Plazma se raspoređuje na dva odvojena diska koji čine dva uzorka (Hvozda i sur., 2016). U usporedbi sa suhom kapi krvi, suha kap plazme ima točno određeni volumen neovisno o volumenu krvi. Ovu metodu je prvi put objavio Li i sur. gdje su korištene filter kartice za prikupljanje suhe kapi plazme u svrhu kvantitativnog određivanja guanfacina u punoj krvi (Li i sur., 2012). Za dobivanje suhe kapi plazme iz Noviplexa potrebno je nakapati 60 μL pune krvi na označeno područje na kartici i nakon 3 minute skinuti gornjeg sloja. Donji sloj filter papira (na kojem se nalazi plazma) se suši na sobnoj temperaturi barem 15 minuta te se čuva u originalnom plastičnom pakiranju (Yuan i sur., 2018).

1.6. Karnitin

Karnitin (3-hidroksi-4-N-trimetil-aminobutirična kiselina) je za čovjeka od vitalne važnosti. Njegova najznačajnija uloga je prijenos masnih kiselina dugih lanaca (>12 C atoma) iz citosola kroz unutarnju mitohondrijsku membranu u unutrašnjost mitohondrija (matriks), gdje se uključuju u procese β -oksidacije masnih kiselina. Biološki je aktivan L-enantiomer karnitina. Najznačajniji izvor karnitina u organizmu je hrana životinjskog porijekla (oko

75%), dok se ostatak endogeno sintetizira u jetri i bubrezima iz lizina i metionina. U vegetarijanaca endogena sinteza pridonosi i s više od 90%. Koncentracija u plazmi većim je dijelom regulirana bubrežnim pragom koji iznosi oko 40 $\mu\text{mol/L}$. Aktivnim transportom u proksimalnom bubrežnom tubulu sprječava se prekomjerni gubitak karnitina. U fiziološkim uvjetima resorbira se više od 90% filtriranog karnitina. Koncentracije karnitina i pojedinih acilkarnitina se mogu mjeriti tehnologijom visokodjelotvorne tekućinske kromatografije spregnute s tandemskom spektrometrijom masa (engl. *Liquid chromatography mass spectrometry*, LC- MS/MS) u uzorcima suhe kapi krvi na filter papiru i plazmi. Poznavanje tih metabolita ključno je za dijagnostiku nasljednih metaboličkih poremećaja mitohondrijskog stvaranja energije (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009).

1.6.1. Važnost karnitina i acilkarnitina

Masne kiseline kemijski su relativno inertni spojevi i stoga se njihova reakcijska sposobnost povećava prevođenjem u tioestere. Prijenos masnih kiselina kroz vanjsku membranu mitohondrija započinje stvaranjem tioestera dugolančane masne kiseline s CoA, pri čemu se troši jedna molekula ATP-a. Reakciju katalizira acil-CoA sintetaza koja se nalazi na vanjskoj strani mitohondrija. Molekula acilkarnitina lagano prolazi kroz lipidne membrane. Između dvije mitohondrijske membrane obavlja se reakcija u koju ulazi s jedne strane tioester dugolančane masne kiseline i CoA, a s druge strane karnitin. Iz reakcije izlazi acilkarnitin i CoA. Reakciju katalizira karnitin-palmitoil-transferaza I (CPT I, engl. *carnitine palmitoyltransferase I*) koja se nalazi na vanjskoj membrani mitohondrija. Karnitin-translokaza (CT, engl. *carnitine-acylcarnitine translocase*) prenosi acilkarnitin iz međumembranskog prostora u matriks mitohondrija u zamjenu za molekulu karnitina koja iz matriksa izlazi u međumembranski prostor. Aktivirana masna kiselina ulazi u proces β -oksidacije masnih kiselina iz kojeg se u konačnici dobiva energija iz razgradnje masti. Prijelazom masne kiseline iz spoja s karnitinom na CoA ponovno nastaje acil-CoA. Iz mitohondrija izlazi karnitin koji se pomoću CT II vraća u međumembranski prostor mitohondrija da bi mogao ponovno sudjelovati u reakciji vezanja sljedeće masne kiseline te prijenosa kroz unutrašnju membranu mitohondrija u matriks. Osim toga, karnitin potiče oksidaciju α -ketokiselina razgranatog lanca, kontrolira omjer acil-CoA i CoA u mitohondriju i veže potencijalno toksične spojeve CoA s različitim molekulama koje se mogu nakupljati pri metaboličkim krizama, otrovanju lijekovima i drugim patološkim stanjima. Te molekule

moгу inhibitorno djelovati na procese u ciklusu uree, ciklusu limunske kiseline, glukoneogenezi i β -oksidaciji masnih kiselina. (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009)

1.6.2. Nasljedni metabolički poremećaji oksidacije masnih kiselina i ciklusa karnitina

Primarni manjak karnitina genski je uvjetovan nedostatak transporta karnitina kroz staničnu membranu. Klinička slika primarnog manjka karnitina smatra se ponajprije posljedicom nemogućnosti unosa dugolančanih masnih kiselina u stanicu, tj. stvaranja energije i ketonskih spojeva iz lipida te često nemogućnosti održavanja dovoljne količine slobodnog CoA. Glavne kliničke posljedice takvih zbivanja jesu hipoketotička hipoglikemija, ponajprije u rizičnim situacijama kad su potrošeni drugi izvori energije ili je povećana potreba za energijom (dulje gladovanje, iscrpljujući naponi i dr.), krize nalik na Reyeov sindrom, mišićna hipotonija i kardiomiopatija. Nagla smrt može nastupiti u bilo kojoj životnoj dobi. Osim hipoketotičke hipoglikemije, laboratorijski nalazi koji se nalaze pri primarnom manjku karnitina jesu povećan omjer slobodnih masnih kiselina (engl. *free fatty acid*, FFA) prema ketonskim spojevima, hiperamonijemija, povećane aktivnosti aminotransferaze i kreatin kinaze, eventualno povećana koncentracija mioglobina u serumu i njegova pojava u mokraći, te najkarakterističnije vrlo nizak ukupni i slobodni karnitin u plazmi, bez nakupljanja bilo kojeg acilkarnitina. Brojni su nasljedni metabolički poremećaji koji uzrokuju sekundarni manjak karnitina (ponajprije iz skupine organskih acidurija i poremećaja β -oksidacije masnih kiselina). Za najveći broj tih poremećaja karakteristično je da se za karnitin veže neka molekula koja se zbog enzimskog manjka normalno ne razgrađuje, nego se nakuplja, veže za slobodni karnitin i troši ga. Zato je u takvim stanjima, uz smanjen ukupni karnitin, smanjen i slobodni karnitin, a povećan je omjer acilkarnitina prema slobodnom karnitinu (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009). Nomenklatura acilkarnitina se temelji na dužini lanca masne kiseline vezane za slobodni karnitin (C0), na primjer, C6 je karnitin vezan za masnu kiselinu sa šest ugljikovih atoma. Strukture nezasićenih masnih kiselina se označavaju s C6:1, gdje 1 ukazuje na jednu nezasićenu vezu. Dikarboksilne masne kiseline i hidroksilirane masne kiseline su označene kao „-DC“ i „-OH“. Kada postoji nedostatak enzima specifičnog za metabolizam masnih kiselina, dolazi do povišenih razina acilkarnitina u krvi. Pošto su enzimi selektivni selektivni ovisno o dužini lanca, enzim odgovoran za poremećaj može se identificirati na osnovi povišenja specifičnog acilkarnitina. Povišene koncentracije C6, C8 i C10 znače nedostatak acil-CoA-dehidrogenaze srednjih lanaca (engl. *medium chain acyl CoA dehydrogenase deficiency*- MCADD). Povišene C16-OH, C16 i C18:1-OH ukazuju na

nedostatak 3-OH-acil-CoA-dehidrogenaze dugih lanaca (engl. *long chain hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency* – LCHADD) i povišene C14, C14:1 i C16 ukazuju na nedostatak acil-CoA-dehidrogenaze vrlo dugih lanaca (engl. *very long chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency* – VLCADD). Poremećaji organskih kiselina proizlaze iz poremećaja enzima odgovornih za razgradnju aminokiselina prije ciklusa limunske kiseline. Kao posljedica se javljaju povišene razine organskih kiselina kratkog lanca i konjugiraju se s karnitinom (Miller, 2012).

1.6.2.1. Primarni manjak transportera karnitina

Primarni nedostatak karnitina je autosomni recesivni poremećaj oksidacije masnih kiselina koji nastaje zbog nedostatka funkcionalnih OCTN2 transportera karnitina. Učestalost ovog poremećaja je 1:40 000 novorođenčadi u Japanu i 1:37 000 – 1:100 000 novorođenčadi u Australiji. U Europi i SAD-u učestalost nije definirana, ali po prijavljenim slučajevima, čini se slična onoj u Japanu. Nedostatak membranskog transportera karnitina dovodi do gubitka karnitina izlučivanjem u urinu, niskih koncentracija karnitina u serumu (0-5 $\mu\text{mol/L}$; referentni interval je 25-50 $\mu\text{mol/L}$) i smanjenog nakupljanja unutarstaničnog karnitina. Pacijenti s primarnim nedostatkom karnitina gube većinu (90-95%) filtriranog karnitina u urinu, te njihovi roditelji koji su heterozigoti gube 2 do 3 puta veću količinu od normalne, što objašnjava njihov nalaz blago sniženog karnitina u plazmi. Pacijenti imaju pretežno metaboličke ili srčane simptome. Metabolički simptomi se javljaju češće prije druge godine života. Tipično, ova djeca počinju odbijati hranjenje i postanu podložna infekcijama gornjeg dišnog sustava ili akutnom gastroenteritisu, što dovodi do letargičnog stanja. U većini slučajeva javlja se hepatomegalija, a laboratorijski nalazi pokazuju hipoglikemiju s jako malo ili bez ketona u urinu i hiperamonijemiju, te kreatin kinaza može biti blago povišena. Bez terapije intravenske glukoze dijete pada u komu i može doći do smrti. Kardiomiopatija je češća u starijih pacijenata i povezana s hipotonijom. Hipertrofija srca pronađena je kod heterozigota srednje dobi, iako nije utvrđena povezanost s nekim zdravstvenim problemom. Ključ u dijagnozi je mjerenje koncentracije karnitina u plazmi. Slobodni i acilkarnitini su iznimno sniženi, a organske kiseline u urinu ne pokazuju nikakvu abnormalnost. Pacijenti s primarnim nedostatkom karnitina mogu se prepoznati novorođenačkim probirom. U profilu acilkarnitina tipično je niska koncentracija slobodnog karnitina, kao i ostalih acilkarnitina. Karnitin se prenosi posteljicom s majke na dijete, tako da nakon rođenja koncentracije u plazmi značajno padaju. Pacijentima s primarnim nedostatkom karnitina uvodi se karnitin u

prehranu (100-400 mg/kg/dan), a terapiju je potrebno započeti prije nego nastupi ireverzibilno oštećenje organa. Doza se treba prilagođavati svakom pacijentu pojedinačno mjerenjem koncentracija karnitina u plazmi. Manjak karnitina javlja se i kod brojnih organskih acidemija, poremećaja oksidacije masnih kiselina i karnitinskog ciklusa. Niska koncentracija karnitina u plazmi značajna je i kod pacijenata s bubrežnom tubularnom disfunkcijom, kao što je Fanconijev sindrom (Longo i sur., 2006).

1.7. Aminokiseline

Aminokiseline sadržavaju karboksilnu, $-\text{COOH}$ i aminoskupinu, $-\text{NH}_2$. Proteine u organizmu čovjeka grade α -aminokiseline, tj. samo one koje imaju $-\text{NH}_2$ skupinu vezanu na C-atom na koji je vezana i karboksilna skupina. Osim glicina, ostale aminokiseline mogu biti u dvama stereoizomernim oblicima. One čija se aminoskupina nalazi lijevo od α -C atoma označuju se kao L-aminokiseline, a one s NH_2 skupinom desno kao D-aminokiseline. Proteini se sastoje isključivo od L-aminokiselina. Osim stereoizomerije, aminokiseline posjeduju i optičku aktivnost. Zbog karboksilne i aminoskupine, aminokiseline su amfoterni spojevi, tj. mogu se ponašati i kao kiseline i kao baze. Prema kemijskoj strukturi, aminokiseline se dijele na neutralne, kisele i bazne. Neutralne aminokiseline imaju jednu karboksilnu i jednu aminoskupinu, a ostatak R može biti nesupstituiran (glicin, alanin, valin, leucin, izoleucin), heterociklički (prolin), aromatski (fenilalanin, tirozin, triptofan), tioeterski (metionin), hidroksi (serin, treonin), merkapt (cistein) ili karboksiamidni (asparagin, glutamin). Kisele aminokiseline ili monoaminodikarbonske kiseline imaju dvije karboksilne skupine. To su asparaginska i glutaminska kiselina. Bazne ili diaminomonokarbonske kiseline imaju, osim α - NH_2 skupine, još jednu baznu skupinu. Tu spadaju lizin, arginin i histidin. U izgradnji proteina sudjeluje 20 različitih aminokiselina, od kojih dio čovjek sam sintetizira (procesom transaminacije iz ketokiselina), ne mora ih unositi hranom i nazivaju se neesencijalnim aminokiselinama. Nasuprot njima, esencijalne aminokiseline moraju se unositi hranom jer ih organizam ne može sintetizirati. Takve su aminokiseline leucin, izoleucin, valin, metionin, treonin, triptofan i fenilalanin, a djelomično i arginin, histidin i lizin.

Poremećaji u metabolizmu pojedinih aminokiselina nalaze se u nekim nasljednim metaboličkim poremećajima. U takvim se slučajevima pojavljuju pojedine aminokiseline ili njihovi metaboliti u povećanim koncentracijama u krvi i povećava se njihovo izlučivanje mokraćom, npr. cistin, triptofan, fenilalanin i fenilpiruvat, homogentizinska kiselina, histidin, leucin, izoleucin i valin.

Poznavanje koncentracije i odnosa aminokiselina u plazmi, likvoru i mokraći, nužno je za dijagnostiku aminoacidemija i aminoacidurija, ali i velikog broja drugih nasljednih metaboličkih poremećaja. Najveću dijagnostičku važnost ima mjerenje aminokiselina u plazmi bolesnika, što je bitno u postavljanju dijagnoze, ali i u praćenju tijeka liječenja nasljednih metaboličkih poremećaja u kojih je uvedena dijeta s ograničenom količinom proteina (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009).

Poremećaji u metabolizmu aminokiselina rezultiraju povišenim razinama specifičnih aminokiselina. Fenilketonurija (PKU, engl. *phenylketonuria*) je klasični poremećaj metabolizma aminokiselina gdje dolazi do nedostatka enzima odgovornog za metabolizam fenilalanina. Koncentracije fenilalanina u krvi su iznimno povišene, a ukoliko se ne liječi, može izazvati mentalnu retardaciju. Metode novorođenačkog probira najčešće obuhvaćaju mjerenje koncentracija šest do sedam aminokiselina i devet do dvadeset acilkarnitina. Vrijednosti karakterističnih aminokiselina i acilkarnitina iznad granične vrijednosti govore u prilog pozitivnog novorođenačkog probira za pojedini poremećaj, a postavljenu sumnju potrebno je potvrditi dodatnim testovima (Miller, 2012).

1.7.1. Fenilketonurija

Fenilketonurija je nasljedni metabolički poremećaj koji karakteriziraju mutacije gena za fenilalanin hidroksilazu (engl. *phenylalanine hydroxylase*, PAH). PAH prevodi fenilalanin u tirozin i zahtijeva tetrahidrobiopterin (BH₄) kao kofaktor, molekularni kisik i željezo za reakciju. Gubitak aktivnosti ovog enzima dovodi do povišenja koncentracije fenilalanina u krvi i toksične koncentracije u mozgu. Neliječena fenilketonurija povezana je s progresivnim intelektualnim poremećajima, praćena je brojnim drugim simptomima koji uključuju atopijski dermatitis, autizam, napadaje i motoričke poremećaje. Kod djece se javljaju problemi u razvoju i psihijatrijski simptomi. Rana dijagnoza i brza intervencija su važan faktor u prepoznavanju pojedinaca s fenilketonurijom i izbjegavanju mentalne retardacije kod takvih pacijenata. Ograničavanje unosa fenilalanina u prehrani još uvijek je glavni tretman ove bolesti. Pojavnost fenilketonurije varira u svijetu. Procijenjena srednja pojavnost u Europi iznosi 1:10 000 novorođenčadi, ali u nekim područjima u Europi je viša. U Turskoj i Sjevernoj Irskoj iznosi 1:4 000. Finska ima najnižu frekvenciju pojavnosti, gdje iznosi 1: 100 000 (Blau i sur., 2010.). U Republici Hrvatskoj incidencija fenilketonurije iznosi 1: 8 500 novorođene djece (Petković Ramadža i sur., 2013).

Gen za PAH se sastoji od 13 eksona i njihovih introna, nasljeđuje se autosomno recesivno, zbog čega se bolest fenilketonurije pojavljuje kada su oba alela gena mutirana. Osobe koje imaju samo jedan alel mutiran su prenosioci i nemaju biokemijske ili kliničke karakteristike fenilketonurije. Pozicija i priroda mutacije određuje njen utjecaj na aktivnost PAH enzima, što određuje fenotip hiperfenilalaninemije pacijenta. Mala aktivnost ili potpuni gubitak aktivnosti enzima rezultira u fenotipu klasične fenilketonurije. Ostale mutacije samo djelomično inhibiraju aktivnost enzima, što rezultira s blagom fenilketonurijom ili hiperfenilalaninemijom. Referentni interval za koncentraciju fenilalanina je 50-110 $\mu\text{mol/L}$.

Fenilalanin ulazi u mozak pomoću prijenosnika neutralnih aminokiselina LAT1 (engl. *L-aminoacid transporter 1*). Povišene koncentracije fenilalanina u mozgu mogu smanjiti neurološku i psihološku funkciju kroz nekoliko mehanizama. Dokazana je povezanost između nastajanja abnormalnosti bijele tvari u mozgu i neuroloških i psiholoških poremećaja. Dvije velike neutralne aminokiseline, tirozin (prekursor dopamina i norepinefrina) i triptofan (prekursor serotonina), također ulaze u mozak pomoću LAT1 prijenosnika. Visoke koncentracije fenilalanina u krvi mogu inhibirati LAT1 i ulazak ostalih velikih neutralnih aminokiselina u mozak, što dovodi do disfunkcije neurotransmitera i smanjuje dostupnost tih aminokiselina za sintezu proteina. Kontroliranje koncentracije fenilalanina u krvi je učinkovito u prevenciji većine poremećaja središnjeg živčanog sustava povezanih s fenilketonurijom. Iako se mozak većim dijelom razvija u prvim godinama života, prestanak kontroliranja prehrane i unosa fenilalanina u kasnijim godinama života dovodi do suptilnih ali prisutnih deficita u neurološkom i psihološkom funkcioniranju tijekom odraslog života.

Svakom djetetu kojem se novorođenačkim probirom utvrdi hiperfenilalaninemija treba metaboličkim testovima odrediti koncentracije aminokiselina u krvi. Te pretrage će otkriti povišenu koncentraciju fenilalanina ($>120 \mu\text{mol/L}$), normalnu ili sniženu koncentraciju tirozina (omjer fenilalanina i tirozina >2) i normalne koncentracije ostalih aminokiselina. Ovo je obrazac koji prate svi oblici hiperfenilalaninemije/fenilketonurije. Također, treba odrediti diferencijalnom dijagnozom ima li pacijent deficit u sintezi BH₄, kako bi se odredila terapija.

Ograničavanje unosa fenilalanina hranom počinje odmah nakon dijagnoze. Novorođenčad se hrani formulom bez fenilalanina (dojenje je također dozvoljeno), a kasnija prehrana treba uključivati što manje hrane bogate proteinima (meso, riba, jaja, klasičan kruh, sirevi, orašasti plodovi i sjemenke) te hrane i pića koja sadrži aspartam, brašno, soju, pivo itd. Potreban dnevni unos proteina postiže se komercijalno dostupnim pripravcima proteina bez fenilalanina. Neke mutacije su povezane s fenotipom fenilketonurije koji je osjetljiv na BH₄, kod kojih davanje farmakoloških doza egzogenog BH₄ dovodi do povećanja aktivnosti PAH

koje je dovoljno za snižavanje koncentracije cirkulirajućeg fenilalanina. Glavni mehanizam BH4 je stabilizacija tetramerne strukture PAH sprječavanjem pogrešnog slaganja, agregacije podjedinice, proteolitičke razgradnje i inaktivacije enzima toplinom (Blau i sur.,2010).

1.8. Tandemska spektrometrija masa u novorođenačkom probiru

Tandemska spektrometrija masa se koristi za identifikaciju i kvantifikaciju analita, radi na principu prevođenja molekule analita u ionizirano stanje, fragmentira nastale ione i analizira ih na osnovu omjera njihove mase i naboja (m/z). U svrhu određivanja profila acilkarnitina i aminokiselina koristi se elektrosprej ionizacija (ESI) pomoću koje se uzorak otopljen u kombinaciji vode i organskog otapala ionizira kako bi maseni spektrometar mogao prepoznati ione od interesa. Uzorak prolazi kroz usku kapilaru koja se nalazi pod visokim naponom, prilikom ionizacije dolazi do prijenosa napona na kapljice otapala, isparavanja otapala i nastanka pozitivno ili negativno nabijenih iona. Takav uzorak ulazi u prvi kvadropol koji propušta samo odabrane (m/z) ione od interesa. Ti ioni nazivaju se prekursori ili parent ioni. Nakon prolaska kroz prvi kvadropol, uzorak dolazi do kolizijske ćelije u kojoj se odvija fragmentacija pomoću inertnog plina (dušik ili argon), a novonastali fragmenti određenih omjera m/z se odabiru u trećem kvadropolu. Detekcijom m/z prvog i trećeg kvadropola moguće je odrediti samo analite od interesa bez interferencije ostalih molekula koje se nalaze u uzorku. Kvadropol analizatora se sastoji od četiri paralelne metalne šipke. Kombinacija konstantnih i varirajućih napona dopušta prijenos uskog raspona m/z vrijednosti uz os šipki. Mijenjanjem napona u vremenu moguće je analizirati velik raspon m/z vrijednosti, iz čega proizlazi maseni spektar. Kvadropoli se mogu postaviti tako da prate određenu m/z vrijednost, a nakon toga drugu m/z vrijednost, što se postiže podešavanjem napona. Utjecaj na rezultate analize MS-om ima čistoća izvora iona i kolizijske ćelije, ionska supresija, brzina protoka izvora iona, tlak u kolizijskoj ćeliji i vakuum MS-a. Interni standardi se koriste kako bi se postigli pouzdani i točni kvantitativni rezultati. Verzije analita sa stabilnim izotopima su idealni interni standardi jer imaju skoro identična kemijska svojstva ali se lako razlikuju u MS-u. Oni ispravljaju gubitke i neučinkovitosti u pripremi uzoraka i ispravljaju supresiju iona. Ova tehnika se zove dilucija stabilnim izotopima i pruža točnost i preciznost. Kvantifikacija bez kalibracije je moguća ako se zna količina internog standarda koja je dodana. Ovo se koristi kod uzoraka suhe kapi krvi. Međutim, ovaj pristup se bazira na tome da su interni standardi 100% čisti i imaju isti molarni odgovor kao i analit. Za točne rezultate, potrebne su kalibracijske krivulje koje prikazuju odnos omjera analita i internog standarda sa

koncentracijom analita. Detekcija pojedinih analita se može poboljšati derivatizacijom - neki analiti daju slab signal korištenjem ESI jer nemaju funkcionalnu grupu koja može nositi naboj. U svrhu provođenja novorođenačkog probira koristi se derivatizacija za stvaranje butil-estera, što poboljšava osjetljivost metode (Pitt, 2009).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

U svrhu provođenja novorođenačkog probira u uzorcima suhe kapi krvi određuje se profil aminokiselina i acilkarnitina. Nakon pozitivnog novorođenačkog probira, sumnja na pojedinu bolest postavlja se temeljem pozitivnih nalaza potvrdnim testovima što su u našem slučaju uz organske kiseline u urinu i analizu gena, profil acilkarnitina i aminokiselina u plazmi te aminokiseline u plazmi zbog čega novi načini uzorkovanja, kao što je suha kap plazme (Noviplex®), predstavlja zanimljiv pristup praćenju takvih pacijenata.

Pretpostavka od koje se polazi prilikom izračuna rezultata je da isječak suhe kapi krvi točno određenog promjera sadrži točno određeni volumen krvi, odnosno plazme/seruma. Na rezultat analize utječe volumen krvi nakapan na filter papir, hematokrit, raspodjela analita u suhoj kapi krvi te postupak ekstrakcije uzorka. Prednost suhe kapi krvi i suhe kapi plazme u odnosu na uzorak plazme/seruma je manji volumen uzorkovanja, stabilnost analita na sobnoj temperaturi, lakši transport i pohrana. Međutim, nekoliko faktora utječe na kvantitativni rezultat kada se analizira izrezani disk iz uzorka suhe kapi krvi. Volumen krvi koji se aplicira na filter papir, hematokrit, distribucija analita u suhoj kapi zbog utjecaja eritrocita i postupak ekstrakcije analita imaju utjecaj na analitičku točnost i preciznost. Također, plazmu kao uzorak je potrebno u roku od par sati nakon uzorkovanja obraditi ili skladištiti na -20°C . Za pacijente s potvrđenim metaboličkim poremećajima koji se kontinuirano prate, velika je prednost što uzorke suhe kapi krvi koju mogu poslati poštom u laboratorij i smanjiti učestalost i invazivnost venepunkcije stalnih pretraga. Međutim, za većinu testova koji se koriste u praćenju metaboličkih pacijenata primarni uzorak izbora je plazma.

Cilj ovog rada bio je usporediti koncentracije fenilalanina i slobodnog karnitina u uzorcima suhe kapi plazme i suhe kapi krvi te uzorcima suhe kapi plazme i uzorcima plazme, a u svrhu poboljšanja dijagnostike i praćenja pacijenata s nasljednim metaboličkim poremećajima. Koncentracije fenilalanina i slobodnog karnitina mjerene su komercijalnim kompletom reagensa tvrtke *Recipe* na tandemskom spektrometru masa tvrtke *Shimadzu*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Ispitanici

U ispitivanju je sudjelovalo 26 ispitanika (9 ženskih i 17 muških).

3.2. Uzorci

Uzorci su analizirani na tandemskom spektrometra masa, UPLC Nexera-MS8050, *Shimadzu* u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb.

Uzorci suhe kapi krvi dobiveni su kapanjem 50 μL EDTA krvi ostatnih uzoraka bolesnika nakon rutinske hematološke obrade na Whatman 903TM filter papir. Uzorci su pohranjeni na sobnoj temperaturi do analize.

Uzorci plazme dobiveni su centrifugiranjem EDTA krvi ostatnih uzoraka. Uzorci su pohranjeni na -18°C jer pohrana na sobnoj temperaturi uzrokuje razgradnju acilkarnitina.

Uzorci suhe kapi plazme dobiveni su kapanjem 60 μL EDTA krvi ostatnih uzoraka bolesnika nakon rutinske hematološke obrade na NoviplexTM Duo Plasma Prep Cards, čime se dobiju dva uzorka po 3,8 μL suhe kapi plazme. Uzorci su pohranjeni na sobnoj temperaturi do analize.

3.3. Materijali

Za usporedbu koncentracija aminokiselina i acilkarnitina iz uzoraka suhe kapi krvi, plazme i suhe kapi plazme korišten je ClinSpot® komercijalni komplet reagensa, namijenjen semikvantitativnom određivanju aminokiselina i acilkarnitina tandemskom spektrometrijom masa. Kontrola kvalitete provedena je pomoću komercijalnih kontrolnih uzoraka suhe kapi krvi ClinChek® u dvije koncentracijske razine. Uzorci su pripremljeni prema uputama proizvođača i analizirani na HPLC-MS/MS Nexera-MS8050, *Shimadzu*.

3.3.1. Kemikalije

- Otopina za ispiranje
- Mobilna faza

- Interni standard, liofilizirani
- Reagens A
- Reagens B (derivatizirajući reagens)
- Reagens C

3.3.2. Oprema

- Mikrotitarska pločica (96 jažica) s poklopcem/ zaštitnom folijom
- Eppendorf epruvete
- Komercijalne ClinChek® kontrole u dva koncentracijska područja
- Automatske pipete i nastavci
- Odmjerna tikvica od 25 mL
- Pinceta

3.3.3. Instrumenti

- Uređaj za izrezivanje isječaka uzoraka suhe kapi krvi na filter papiru (veličine 3,2 mm) Perkin Elmer DBS Puncher
- Mikrocentrifuga Eppendorf
- Temostabilna miješalica (Termoshaker)
- Sušilo
- Digestor
- UPLC Nexera –MS8050 (Shimadzu; Shimadzu)

3.4. Priprema uzoraka

Priprema uzoraka za analizu aminokiselina i acilkarnitina uključuje ekstrakciju analita iz uzoraka suhe kapi krvi i suhe kapi plazme s otopinom metanola koja sadrži interne standarde. Za pripremu uzoraka plazme, potrebno je obilježiti Eppendorf epruvete oznakama uzoraka i posložiti ih u stalak. Uzorke, koji se čuvaju u ledenici, potrebno je prvo temperirati do sobne temperature prije daljnjeg postupka.

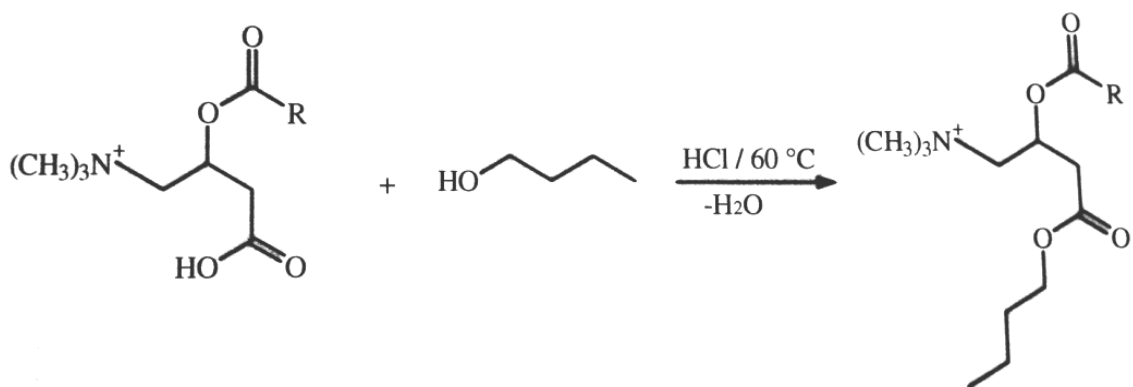
Priprema internog standarda (IS): ClinSpot® komercijalni komplet reagensa podrazumijeva pripremu otopine internog standarda za analizu aminokiselina i acilkarnitina. U bočice s liofiliziranim internim standardom (bočica 1 – acilkarnitini; bočica 2 – aminokiseline) doda se

3 mL regensa A, bočice se zatvore i ostave 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 i 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. Uzorke suhe plazme nije potrebno izrezivati, nego se cijeli disk suhe plazme prebaci u jažicu mikrotitarske pločice pomoću pincete. Prethodno je potrebno označiti mikrotitarske pločice rednim brojevima te izraditi radnu listu na kojoj su uzorci, kontrolni uzorci i slijepa probe postavljeni određenim redoslijedom. Slijepa proba je disk praznog filter papira ili se mjesto u jažici ostavlja prazno. Svaka pločica sadrži kontrolne uzorke u dva koncentracijska područja u triplikatu, na početku, sredini i kraju pločice. Za uzorke plazme potrebno je pipetirati 3 µL uzorka u Eppendorf epruvete. U svaku jažicu/Eppendorf epruvetu se zatim pipetira 100 µL internog standarda; pločica se prekrije poklopcem ili zaštitnom folijom te inkubira na miješalici (Thermoshaker), na sobnoj temperaturi i 700 rpm-a tijekom 20 minuta. Uzorci plazme se centrifugiraju 15 minuta na 3500 okretaja.

Prijenos uzoraka i sušenje: Po inkubaciji je potrebno pažljivo ukloniti poklopac/zaštitnu foliju te supernatant prebaciti u novu mikrotitarsku pločicu (pločica 2), poštujući pritom redoslijed uzoraka iz prve pločice. Za uzorke plazme supernatant iz Eppendorf epruveta se prebacuje u prethodno označenu mikrotitarsku pločicu. 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 uparavanja 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 µL 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 uparavanje do suhoga u digestoru, uz korištenje sušila za kosu. Derivatizacijom se aminokiseline prevode u svoje n-butil estere.



Slika 1. Derivatizacija acilkarnitina butanolom u butiril estere (R = alkilni ogranak)

Rekonstitucija: Nakon uparivanja, u svaku se jažicu dodaje 100 μL 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 μL supernatanta.

Uzorci pripremljeni na ovaj način stabilni su na sobnoj temperaturi do 7 dana.

3.5. Analiza

Aminokiseline i acilkarnitini koje je moguće odrediti semikvantitativno korištenjem *ClinSpot*® kompleta reagensa navedeni su u Tablici 1.

Aminokiseline		Acilkarnitini (C0-C18 karnitini)	
Ala	Alanin	C0	Slobodni karnitin
Arg	Arginin	C2	Acetilkarnitin
Asp	Aspartat	C3	Propionilkarnitin
Cit	Citrulin	C4	Butilkarnitin
Glu	Glutamat	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® kompleta reagensa.

Identifikacija pojedinih aminokiselina u uzorku omogućena je njihovim karakterističnim masenim prijelazima; svakoj aminokiselini i acilkarnitinu i pripadajućem internom standardu pridružene su određene očekivane vrijednosti omjera mase i naboja njihovih produktnih i prekursorskih iona. Maseni prijelazi korišteni u analizi aminokiselina ClinSpot® kompleta reagensa prikazani su u Tablici 2.

Analit	Prekursor ion (m/z)	Produkt ion (m/z)	Interni standard (IS)	Prekursor ion (m/z)	Produkt ion (m/z)
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	26	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
Fenilalanin	222	120	$^{13}\text{C}_6$ – Fenilalanin	228	126
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
C0- karnitin	218	85	$^2\text{H}_9$ - karnitin	227	85
C2- karnitin	260	85	$^2\text{H}_3$ -C2- karnitin	263	85
C3- karnitin	274	85	$^2\text{H}_3$ -C3- karnitin	277	85
C4- karnitin	288	85	$^2\text{H}_3$ -C4- karnitin	291	85
C5- karnitin	302	85	$^2\text{H}_9$ -C5- karnitin	311	85
C5DC- karnitin	388	85	$^2\text{H}_9$ -C5DC- karnitin	397	85

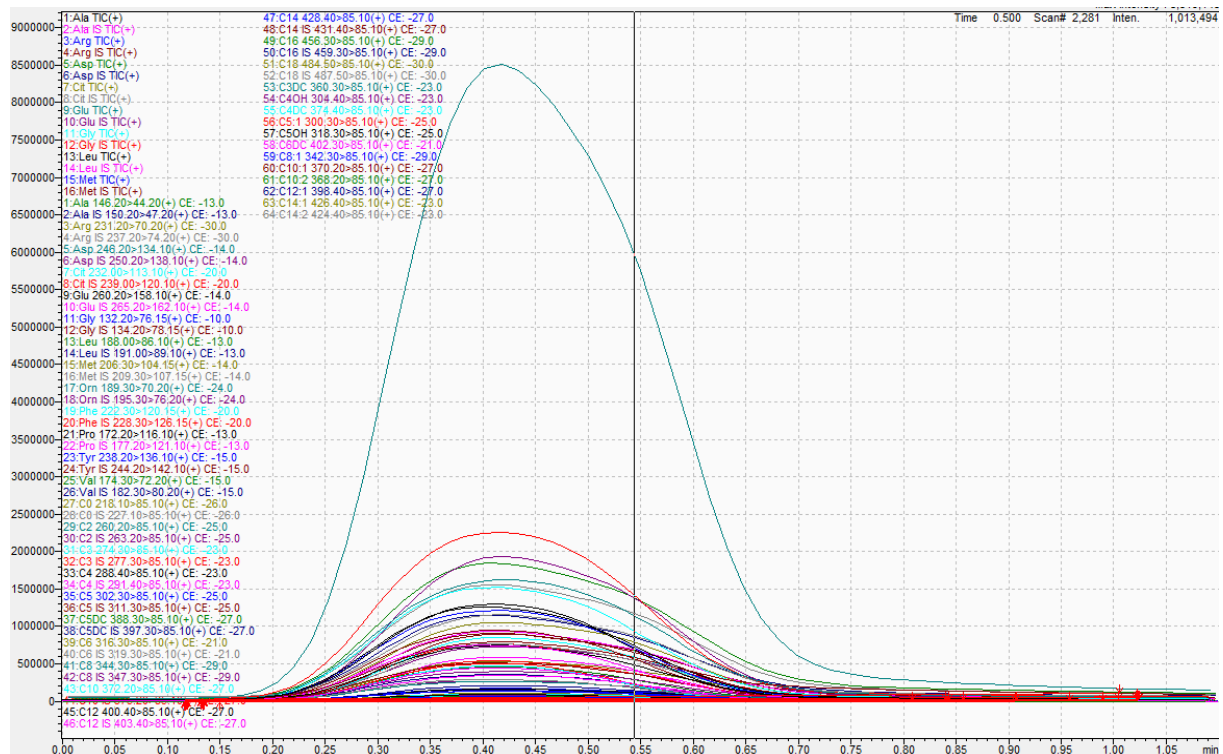
C6- karnitin	316	85	² H ₃ -C6- karnitin	319	85
C8- karnitin	344	85	² H ₃ -C8- karnitin	347	85
C10- karnitin	372	85	² H ₃ -C10- karnitin	375	85
C12- karnitin	400	85	² H ₃ -C12- karnitin	403	85
C14- karnitin	428	85	² H ₃ -C14- karnitin	431	85
C16- karnitin	456	85	² H ₃ -C16- karnitin	459	85
C18- karnitin	484	85	² H ₃ -C18- karnitin	487	85
C3DC- karnitin	360	85	² H ₃ -C3- karnitin	277	85
C4OH- karnitin	304	85	² H ₃ -C4- karnitin	291	85
C4DC- karnitin	374	85	² H ₃ -C4- karnitin	291	85
C5:1- karnitin	300	85	² H ₃ -C5- karnitin	311	85
C5OH- karnitin	318	85	² H ₃ -C5- karnitin	311	85
C10:1- karnitin	370	85	² H ₃ -C10- karnitin	375	85
C14:2- karnitin	424	85	² H ₃ -C12- karnitin	431	85
C14:1- karnitin	426	85	² H ₃ -C14- karnitin	431	85
C14OH- karnitin	444	85	² H ₃ -C14- karnitin	431	85
C16:1- karnitin	454	85	² H ₃ -C14- karnitin	459	85
C16:1OH- karnitin	470	85	² H ₃ -C16- karnitin	459	85
C16OH- karnitin	472	85	² H ₃ -C16- karnitin	459	85
C18:2- karnitin	480	85	² H ₃ -C18- karnitin	487	85
C18:1- karnitin	482	85	² H ₃ -C18- karnitin	487	85
C18:1OH- karnitin	498	85	² H ₃ -C18- karnitin	487	85
C18OH- karnitin	500	85	² H ₃ -C18- karnitin	487	85

Tablica 2. Karakteristični maseni prijelazi pojedinih aminokiselina, acilkarnitina i hidroksiacilkarnitina i njihovih internih standarda unutar ClinSpot® kompleta reagensa.

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). Uz pomoć računalnog programa, iz TIC-a je moguće generirati

kromatograme pojedinačnih analita, ili kromatograme više analita istovremeno. Takvi se kromatogrami nazivaju ekstrahirani ionski kromatogrami (www.waters.com).

Na Slici 2. prikazani su ekstrahirani ionski kromatogrami aminokiselina i acilkarnitina dobiveni analizom uzorka suhe kapi krvi novorođenčadi na uređaju UPLC Nexera– MS8050.



Slika 2. 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.

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

Koncentracija aminokiselina i acilkarnitina iz uzorka izračunava se prema sljedećoj formuli,

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

pri čemu je

C (analit): Koncentracija analita u uzorku

A (analit): Površina ispod vrška za pojedini analit

C (IS): Koncentracija pojedinog izotopno obilježenog analita iz internog standarda

A (IS): Površina ispod vrška izotopno – obilježenog analita

V (IS): Volumen internog standarda

V (A): Volumen uzorka

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

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

pri čemu je

C (IS, uzorak): Koncentracija izotopno obilježenog analita u uzorku.

Pojednostavljeni izračun temelji se na poznatom volumenu internog standarda od 100 μL te definiranom promjeru diska uzorka suhe kapi krvi na filter papiru koji iznosi 3,2 mm.

Pomoću ovih parametara koncentracija izotopno obilježenih aminokiselina i acilkarnitina iz internog standarda preračunava se u koncentraciju izotopno obilježene aminokiseline i acilkarnitina u ispitivanom uzorku. Srednji pretpostavljeni volumen uzorka iznosi 3,1 μL , a izračunat je na temelju kontrolnog uzorka suhe kapi krvi na filter papiru promjera 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 koncentracije fenilalanina u pacijenata s fenilketonurijom.

Program korišten za izračunavanje koncentracija aminokiselina i acilkarnitina je Neonatal Solution® povezan s UPLC Nexera-MS8050, Shimadzu.

3.6. Statistička obrada

Za statističku obradu podataka u usporedbi koncentracija fenilalanina (engl. *phenylalanine*, Phe) i slobodnog karnitina (C0) u uzorcima suhe kapi krvi (engl. *dried blood spots*, DBS), suhe kapi plazme (Noviplex) i plazme korišten je parni t-test *Medcalc*-a, za koji je prvo ispitana normalnost razdiobe podataka. Podaci su zavisni i brojevi.

Parni t-test je statistički postupak korišten za određivanje je li srednja razlika između dva seta aritmetičkih sredina uzoraka jednaka nuli. U parnom t-testu, za svaku vrstu uzoraka se rade po dva mjerenja.

Kao kod mnogih statističkih postupaka, parni t-test ima dvije hipoteze, nultu hipotezu i alternativnu hipotezu. Nulta hipoteza (H_0) pretpostavlja da je srednja razlika između parova aritmetičkih sredina uzoraka (μ_d) jednaka nuli, odnosno da nema razlike između dva mjerenja. Sve primjetne razlike se objašnjavaju slučajnom varijacijom. Alternativna hipoteza (H_1) pretpostavlja da je srednja razlika između parova aritmetičkih sredina uzoraka (μ_d) različita od nule, odnosno da postoji razlika između dva mjerenja.

Parni t-test ima četiri temeljne pretpostavke: ovisna varijabla mora biti kontinuirana, mjerenja moraju biti neovisna jedna o drugom, ovisna varijabla treba biti raspodijeljena po normalnoj raspodjeli i ovisna varijabla ne bi trebala sadržavati stršeće vrijednosti (tzv. *outliere*). Parni t-test zahtijeva rezultate mjerenja koji su numerički i kontinuirani jer se zasniva na normalnoj raspodjeli. Kontinuirani podaci mogu poprimiti bilo koju vrijednost u određenom rasponu. Neovisnost mjerenja se najčešće ne može provjeriti, ali se pretpostavlja da proces analize daje rezultate neovisne jedne o drugima. Normalnost razdiobe se najjednostavnije određuje vizualno, koristeći alate poput histograma (<https://www.statisticssolutions.com/>).

Normalna (Gaussova) raspodjela je statistička raspodjela funkcije vjerojatnosti. Iz Gaussove krivulje možemo za svaku vrijednost nekog skupa podataka očitati pripadajuću vjerojatnost. Normalna je raspodjela kontinuirana, zvonolika, simetrična s obzirom na aritmetičku sredinu i nikada ne dodiruje os x (asimptota). Nadalje, normalna je raspodjela u potpunosti definirana aritmetičkom sredinom i standardnom devijacijom. Dvije standardne devijacije obuhvaćaju 95% svih rezultata, a unutar tri standardne devijacije nalaze se gotovo svi podaci nekog skupa (99,7%). Podatak o normalnosti raspodjele je iznimno važan, jer uvjetuje izbor statističkog testa. Normalno raspodijeljene skupine podataka testiramo tzv. parametrijskim testovima, a one raspodjele koje nisu normalne testiramo neparametrijskim testovima (Šimundić, 2006).

Outlieri ili stršeće vrijednosti su vrijednosti koje iskaču od svih ostalih podataka. One mogu predstavljati odstupanje (engl. *bias*) u rezultatima i potencijalno dovesti do krivih zaključaka. Jedna od metoda kojom se nosi sa stršećim vrijednostima je da se jednostavno zanemare. Ipak, uklanjanje određenih podataka može uvesti druge tipove odstupanja u rezultate analize i dovesti do gubitka ključnih informacija. Ako se čini da stršeće vrijednosti puno utječu na rezultate analize, može se koristiti neparametrijski test poput Wilcoxonovog testa.

Statistička značajnost se određuje pomoću vrijednosti p koja daje vjerojatnost promatranja rezultata testa pod nultom hipotezom. Što je niža p vrijednost, niža je vjerojatnost dobivanja

rezultata kao što je onaj koji se ispitivao ako je nulta hipoteza točna. Granična vrijednost za određivanje statističke značajnosti u biomedicini je najčešće 0,05. To odgovara 5%-tnoj vjerojatnosti za dobivanje rezultata koji je promatran ako je nulta hipoteza istinita (<https://www.statisticssolutions.com/>).

Wilcoxonov test je neparametrijski analog parnog t-testa i koristi se kada se želi usporediti postoji li razlika u srednjim vrijednostima između dvije serije parova međusobno zavisnih podataka. Uvjet je da raspodjela nije normalna, da su podaci zavisni i ne mogu se transformirati u normalnu raspodjelu (npr. logaritmiranjem) (Šimundić, ured., 2008).

4. REZULTATI

Rezultati mjerenja koncentracije fenilalanina prikazani su u tablici 3. a rezultati mjerenja slobodnog karnitina prikazani su u tablici 4.

Phe			
Redni broj uzorka	Noviplex	DBS	Plazma
1	44,04	47,05	78,26
2	26,74	51,49	74,26
3	23,12	47,87	76,84
4	37,08	32,98	62,07
5	98,38	70,25	125,34
6	50,73	53,99	86,41
7	36,31	51,86	75,24
8	30,38	37,32	55,56
9	30,87	45,39	59,49
10	21,77	47,38	83,98
11	39,99	35,80	62,02
12	58,00	37,18	69,83
13	24,55	28,19	49,17
14	56,03	41,66	60,80
15	25,92	77,24	123,89
16	25,05	59,11	93,11
17	82,12	81,22	102,31
18	44,94	62,31	83,47
19	25,50	47,40	59,23
20	63,14	86,34	114,09
21	98,82	99,06	142,80
22	69,01	52,46	83,45
23	52,77	55,40	87,03
24	32,59	51,12	66,00
25	39,24	46,49	72,13
26	29,96	64,42	98,69

Tablica 3. Prikaz rezultata mjerenja fenilalanina (Phe) u uzorcima suhe kapi plazme (Noviplex), suhe kapi krvi (DBS) i plazme.

C0			
Redni broj uzorka	Noviplex	DBS	Plazma
1	48,70	44,03	53,89
2	20,97	50,06	34,62
3	22,97	59,51	46,98
4	39,67	92,80	50,42
5	42,80	41,52	35,56
6	49,25	69,86	53,93
7	32,44	78,45	51,93
8	23,34	33,83	34,82
9	10,00	21,35	19,25
10	21,97	41,86	52,07
11	35,13	42,74	39,33
12	52,02	41,23	59,39
13	14,56	25,69	22,69
14	39,66	56,16	36,81
15	28,62	71,61	77,67
16	19,87	43,71	59,82
17	25,98	33,91	27,76
18	27,30	34,90	51,66
19	26,70	35,88	28,68
20	21,26	32,72	31,28
21	36,25	45,27	41,78
22	41,74	40,62	40,14
23	50,08	38,54	39,00
24	44,37	41,45	44,99
25	17,21	26,94	26,99
26	36,49	39,86	44,66

Tablica 4. Prikaz rezultata mjerenja slobodnog karnitina (C0) u uzorcima suhe kapi plazme (Noviplex), suhe kapi krvi (DBS) i plazme.

Prije odabira statističkog testa za dobivene vrijednosti fenilalanina i slobodnog karinitina ispitali smo normalnost raspodjele podataka dobivenih u uzorcima suhe kapi krvi, suhe kapi plazme i plazme. Svi podaci su zavisni i brožčani. Normalnost razdiobe pokazuju: koncentracija fenilalanina u suhoj kapi plazme, suhoj kapi krvi i uzorcima plazme. Za ispitivanje razlike između koncentracije fenilalanina u suhoj kapi plazme i suhoj kapi krvi korišten je parni t-test (Slika 3. i Slika 4.). Isti statistički test, parni t-test, korišten je za

ispitivanje razlike između koncentracije Phe u uzorcima suhe kapi plazme i uzorcima plazme.
(Slika 5. i Slika 6.)

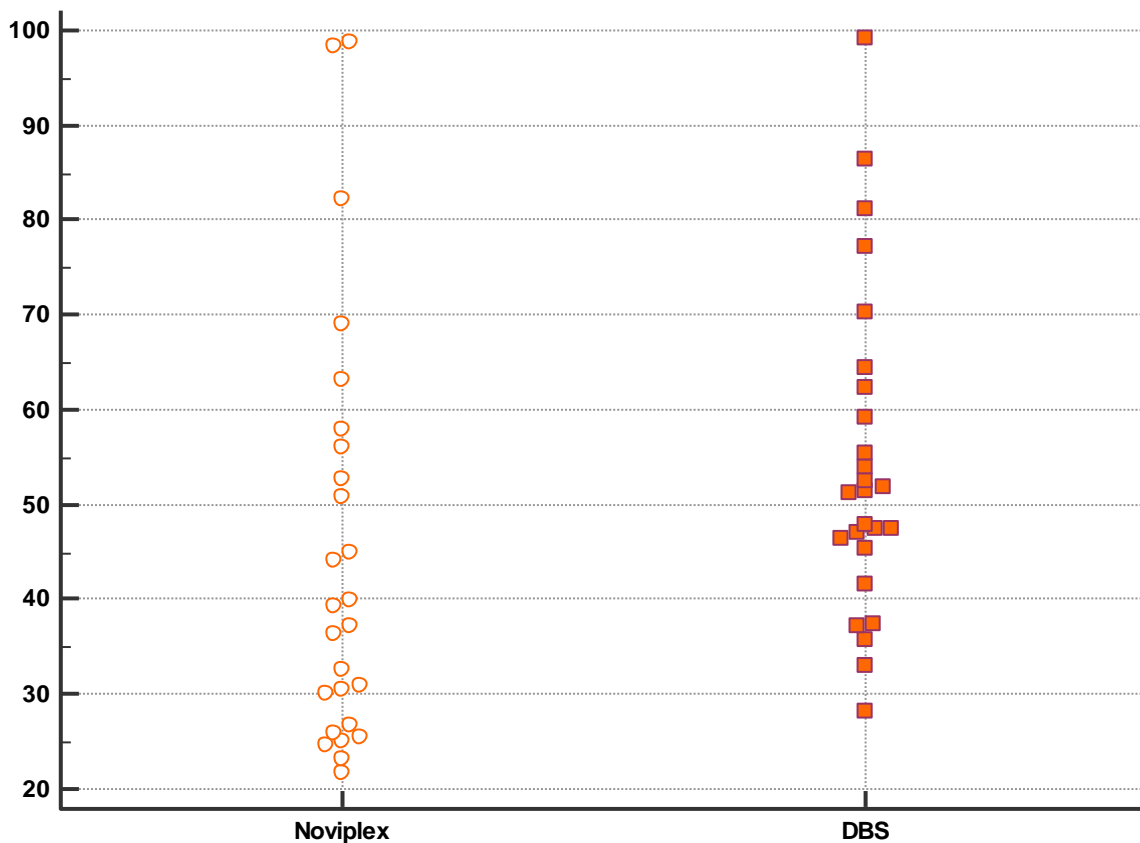
Paired samples t-test

Sample 1	Noviplex	
Sample 2	DBS	
	Sample 1	Sample 2
Sample size	26	26
Arithmetic mean	44,8865	54,2685
95% CI for the mean	35,9215 to 53,8516	47,3650 to 61,1720
Variance	492,6534	292,1275
Standard deviation	22,1958	17,0917
Standard error of the mean	4,3530	3,3520

Paired samples t-test

Mean difference	9,3819
Standard deviation of mean difference	18,5152
Standard error of mean difference	3,6311
95% CI	1,9035 to 16,8604
Test statistic t	2,584
Degrees of Freedom (DF)	25
Two-tailed probability	P = 0,0160

Slika 3. Parni t-test za ispitivanje razlike između koncentracije Phe u uzorcima suhe kapi plazme (Noviplex) i suhe kapi krvi (DBS).



Slika 4. Grafički prikaz koncentracije Phe u suhoj kapi plazme i suhe kapi krvi.

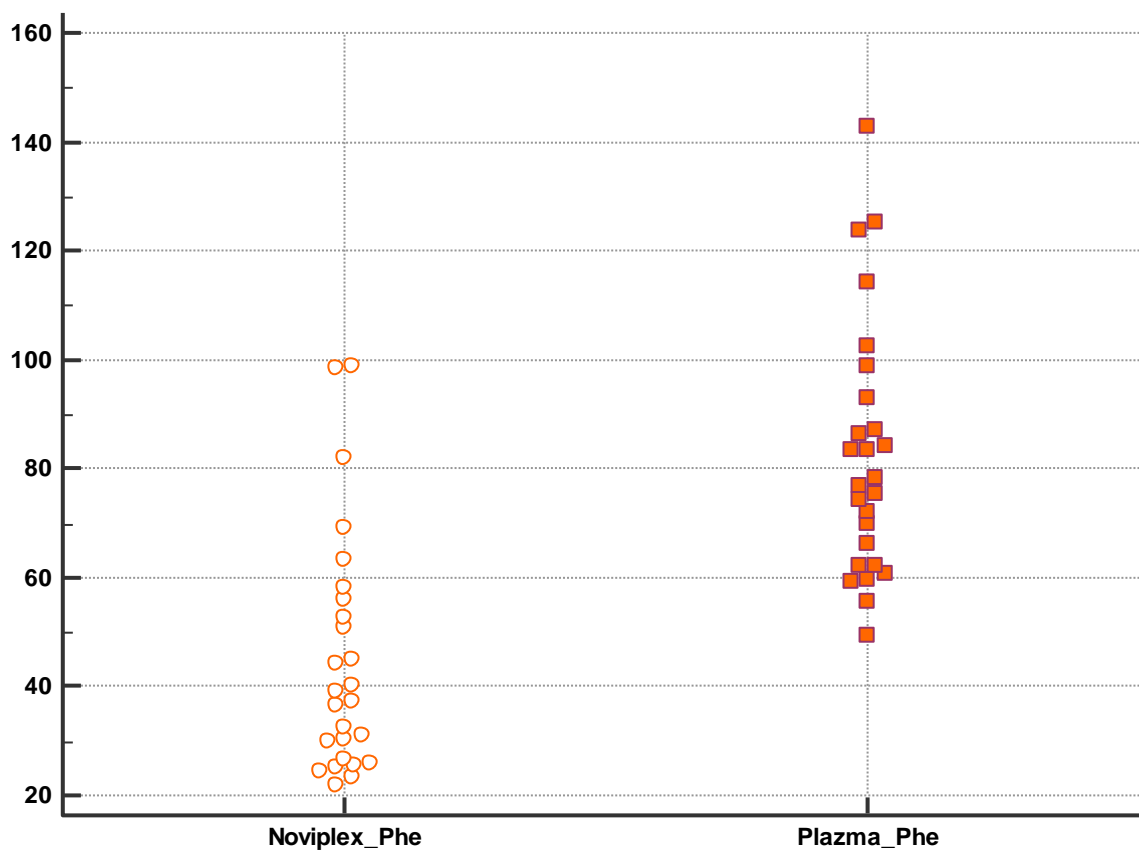
Paired samples t-test

Sample 1	Noviplex_Phe	Sample 2	Plazma_Phe
Sample size	26	Sample 2	26
Arithmetic mean	44,8865	Arithmetic mean	82,5181
95% CI for the mean	35,9215 to 53,8516	95% CI for the mean	72,9887 to 92,0475
Variance	492,6534	Variance	556,6248
Standard deviation	22,1958	Standard deviation	23,5929
Standard error of the mean	4,3530	Standard error of the mean	4,6269

Paired samples t-test

Mean difference	37,6315
Standard deviation of mean difference	20,3050
Standard error of mean difference	3,9821
95% CI	29,4302 to 45,8329
Test statistic t	9,450
Degrees of Freedom (DF)	25
Two-tailed probability	P < 0,0001

Slika 5. Parni t-test za ispitivanje razlike između koncentracije Phe u uzorcima suhe kapi plazme (Noviplex) i plazme.



Slika 6. Grafički prikaz koncentracije Phe u suhoj kapi plazme i plazme.

Normalnost razdiobe pokazuju podaci za slobodni karnitin u uzorcima suhe kapi plazme, a podaci slobodnog karnitina u uzorcima suhe kapi krvi ne podliježu normalnoj raspodijeli. Za usporedbu ta dva skupa podataka korišten je Wilcoxonov parni test (Slika 7. i Slika 8.).

Koncentracije C0 u uzorcima plazme pokazuju normalnost razdiobe te je za usporedbu skupa podataka koncentracije slobodnog karnitina u uzorcima suhe kapi plazme i uzorcima plazme korišten parni t-test (Slika 9.).

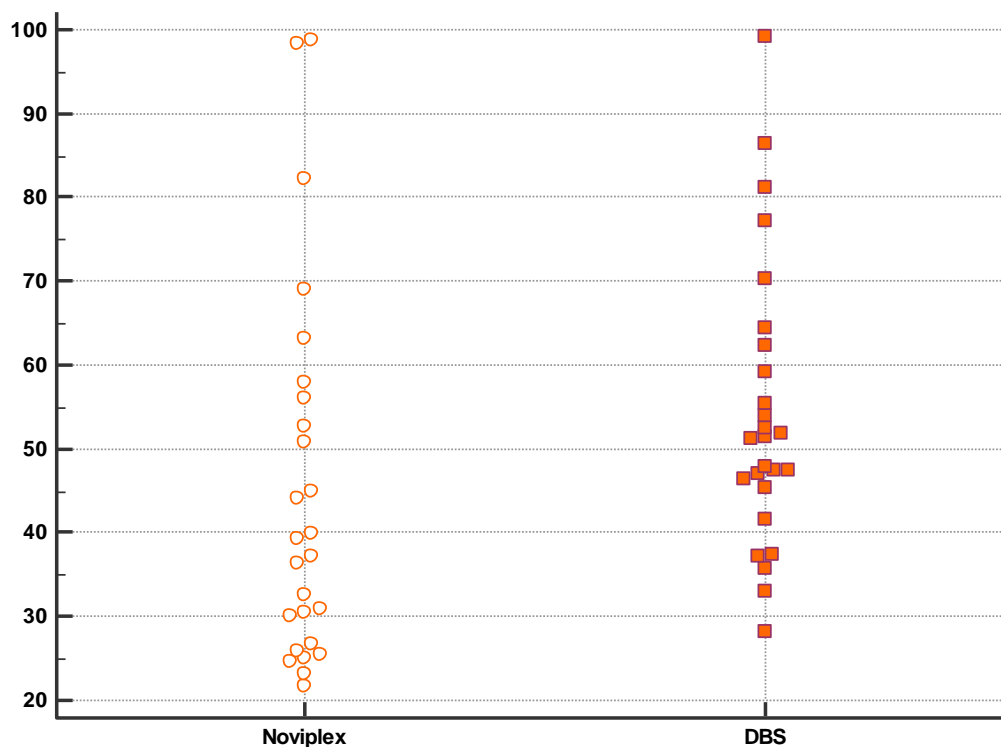
Wilcoxon test (paired samples)

Sample 1	Noviplex_C0	
Sample 2	DBS_C0	
	Sample 1	Sample 2
Sample size	26	26
Lowest value	10,0000	21,3500
Highest value	52,0200	92,8000
Median	30,5300	41,4850
95% CI for the median	23,1731 to 39,6645	37,3398 to 44,5895
Interquartile range	21,9700 to 41,7400	34,9000 to 50,0600

Wilcoxon test (paired samples)

Number of positive differences	20
Number of negative differences	6
Large sample test statistic Z	-3,416028
Two-tailed probability	P = 0,0006

Slika 7. Parni Wilcoxonov test usporedbe koncentracija slobodnog karnitina u uzorcima suhe kapi plazme (Noviplex) i suhe kapi krvi (DBS).



Slika 8. Grafički prikaz koncentracije slobodnog karnitina u suhoj kapi plazme i suhoj kapi krvi.

Paired samples t-test

Sample 1	Noviplex_C0	
Sample 2	Plazma_C0	
	Sample 1	Sample 2
Sample size	26	26
Arithmetic mean	31,8981	42,5431
95% CI for the mean	27,0646 to 36,7316	37,1979 to 47,8883
Variance	143,2055	175,1320
Standard deviation	11,9668	13,2337
Standard error of the mean	2,3469	2,5954

Paired samples t-test

Mean difference	10,6450
Standard deviation of mean difference	13,7176
Standard error of mean difference	2,6902
95% CI	5,1044 to 16,1856
Test statistic t	3,957
Degrees of Freedom (DF)	25
Two-tailed probability	P = 0,0006

Slika 9. Parni t-test usporedbe koncentracija slobodnog karnitina (C0) u uzorcima suhe kapi plazme (Noviplex) i plazme.

5. RASPRAVA

Pri usporedbi koncentracija fenilalanina u uzorcima suhe kapi plazme i suhe kapi krvi statističkim testom (parni t-test) pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika između koncentracija fenilalanina u uzorcima suhe kapi plazme i suhe kapi krvi ($p=0,016$, 95% CI 35,9 – 53,9 za Phe u suhoj kapi plazme, 95% CI 47,4 – 61,2 za Phe u suhoj kapi krvi). Iako je p vrijednost manja od 0,05, 95% intervali pouzdanosti se poklapaju za ova dva skupa podataka iz čega se može zaključiti da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji fenilalanina u ove dvije vrste uzoraka.

Usporedbom koncentracije fenilalanina u uzorcima suhe kapi plazme i plazme statističkim testom (parni t-test) pokazano je da postoji statistički značajna razlika između ta dva skupa podataka ($p=0,0001$, 95% CI 35,9 – 53,9 za Phe u suhoj kapi plazme, 95% CI 72,9 – 92,1 za Phe u suhoj kapi krvi). P vrijednost je manja od 0,05, a 95% intervali pouzdanosti se ne poklapaju.

Za usporedbu koncentracija slobodnog karnitina u uzorcima suhe kapi plazme i suhe kapi krvi statističkim testom (Wilcoxonov parni test) pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika između ta dva skupa podataka ($p= 0,0006$, 95% CI 23,2 – 39,7 za slobodni karnitin u suhoj kapi plazme, 95% CI 37,3 – 44,6 za slobodni karnitin u suhoj kapi krvi). Iako je p vrijednost manja od 0,05, 95% intervali pouzdanosti se poklapaju za ova dva skupa podataka iz čega se može zaključiti da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji slobodnog karnitina u ove dvije vrste uzoraka.

Usporedbom koncentracija slobodnog karnitina u uzorcima suhe kapi plazme i uzorcima plazme statističkim testom pokazano je da postoji statistički značajna razlika između ta dva skupa podataka ($p= 0,0006$, 95% CI 27,1 – 36,7 za slobodni karnitin u suhoj kapi plazme, 95% CI 37,2 – 47,9 za slobodni karnitin u plazmi).

6. ZAKLJUČAK

Suha kap plazme postaje sve zanimljiviji uzorak u području biomedicine. Osim u farmakokinetici, farmakologiji i toksikologiji, primjena ove vrste uzorka u budućnosti bi mogla biti i u mjerenja koncentracija različitih biomarkera i metabolita, odnosno u praćenju tijeka liječenja pacijenata s različitim patološkim stanjima. Njezina prednost pred uzorkom plazme je: jednostavno rukovanje (pacijenti mogu sami provoditi uzorkovanje), jednostavna pohrana i jeftin transport (uzorke je moguće slati običnom poštom na sobnoj temperaturi), a u usporedbi sa suhom kapi krvi, suha kap plazme pokazuje veću stabilnost u koncentraciji analita.

Statističkim testovima pokazano je da ne postoji značajna razlika u koncentraciji fenilalanina mjerenog u uzorcima suhe kapi plazme i uzorcima suhe kapi krvi u rasponu 21,8 $\mu\text{mol/L}$ – 99,1 $\mu\text{mol/L}$.

Statističkim testovima pokazano je da postoji razlika u koncentraciji fenilalanina izmjenjenog u uzorcima suhe kapi plazme i uzorcima plazme u rasponu 21,8 $\mu\text{mol/L}$ – 142,8 $\mu\text{mol/L}$. Statističkim testom pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji slobodnog karnitina u uzorcima suhe kapi plazme i suhe kapi krvi u rasponu 10,0 $\mu\text{mol/L}$ – 92,8 $\mu\text{mol/L}$.

Statističkim testovima pokazano je da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji slobodnog karnitina u uzorcima suhe kapi plazme i uzorcima plazme u rasponu 10,0 $\mu\text{mol/L}$ – 77,8 $\mu\text{mol/L}$.

Navedene podatke potrebno je provjeriti na većem broju ispitanika i većem rasponu koncentracija fenilalanina i slobodnog karnitina. Najzanimljivije slaganje ispitivanih vrsta uzoraka za oba analita svakako je područje graničnih vrijednosti koje se koriste u novorođenačkom probiru u Republici Hrvatskoj za postavljanje sumnje na fenilketonuriju i nedostatak karnitinskog nosača. Također bi se prošireno ispitivanje trebalo provesti ne samo na odrasloj populaciji, nego i na novorođenačkoj i adolescentskoj populaciji oba spola.

Uz uključivanje većeg broja ispitanika i većeg raspona koncentracija, korisno bi bilo ispitati i različite načine ekstrakcije analita iz uzorka suhe kapi plazme i plazme. Naime, do tog zaključka navode nas neslaganja u koncentracijama fenilalanina i slobodnog karnitina između uzoraka suhe kapi plazme i uzoraka plazma, dok uzorci suhe kapi krvi i suhe kapi plazme pokazuju zadovoljavajuće rezultate.

7. LITERATURA

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.

Blau N, van Spronsen FJ, Levy HL. Phenylketonuria. *Lancet*, 376, 1417–1427.

Čvorišćec D, Čepelak I. Štrausova medicinska biokemija. Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 162-165, 534-537, 543-546, 548-550.

Grüner N, Stambouli O, Ross RS. Dried Blood Spots - Preparing and Processing for Use in Immunoassays and in Molecular Techniques. *Journal of Visualized Experiments*, 97, e52619, 1-9.

Hall EM, Flores SR, De Jesús VR. Influence of Hematocrit and Total-Spot Volume on Performance Characteristics of Dried Blood Spots for Newborn Screening. *Int J Neonatal Screen*, 2015, 1(2), 69–78.

Holub M, Tuschl K, Ratschmann R, Strnadová KA, Mühl A, Heinze G, Sperl W, Bodamer OA. Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 2006, 373, 27–31.

Hvozda LF, Christianson CD, Schlabach T, Regnier F. The Evaluation of Noviplex Plasma Prep Cards for Regulated Bioanalysis. AAPS Annual Meeting, Denver, 2016, 1-2.

Li Y, Henion J, Abbott R, Wang P. The use of a membrane filtration device to form dried plasma spots for the quantitative determination of guanfacine in whole blood. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2012, 26, 1208.

Longo N, Amat Di San Filippo C, Pasquali M. Disorders of Carnitine Transport and the Carnitine Cycle. *American Journal of Medical Genetics*, 2006, 142C, 77–85.

Mass Data Terminology, Consideration, And Interpretation, 2020, <http://www.waters.com>, pristupljeno 14.6.2020.

Miller IV JH. A New Approach to Dried Blood Spot Analysis for Newborn Screening Using High Resolution Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry, Richmond, Virginia Commonwealth University, 2012, str. 2-6, 8-11, 33, 42.

Moat SJ, George RS, Carling RS. Use of Dried Blood Spot Specimens to Monitor Patients with Inherited Metabolic Disorders. *Int. J. Neonatal Screen*, 2020, 6, 26, 1-17.

Paired samples t-test, 2020, <https://www.medcalc.org/>, pristupljeno 13.7.2020.

Paired Sample T-Test, 2020, <https://www.statisticssolutions.com/>, pristupljeno 13.7.2020.

Petković Ramadža D, Sarnavka V, Škaričić A, Fumić K, Barić I. Novorođenački skrining u Hrvatskoj i u svijetu. *Paediatr Croat*, 2013, 57, 350–357.

Pitt JJ. Principles and Applications of Liquid Chromatography – Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin Biochem Rev*, 2009, 30, 1, 19-34.

Šimundić AM. Osnove biostatistike u svakodnevnoj praksi. Zagreb, Medicinska naklada, 2008, str. 1-94.

Šimundić AM. Tipovi podataka i raspodjela. *Acta Medica Croatica*, 2006, 60, 17-35.

The microsampling blog by Neoteryx, 2019, <https://www.neoteryx.com/microsampling-blog>, pristupljeno 9.7.2020.

Total Ion Chromatogram (TIC), 2020, www.shimadzu.com, pristupljeno 14.6.2020.

What is a rare disease?, 2020, <http://www.eurordis.org>, pristupljeno 1.6.2020.

Yuan X, Lu Y, Xiao C, Zhu J, Zhang W, Yu C, Li S. Application of a micro plasma collection card for the detection of homocysteine by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 2018, 41, 22, 4167-4176.

8. SAŽETAK

U svrhu provođenja novorođenačkog probira u uzorcima suhe kapi krvi određuje se profil aminokiselina i acilkarnitina. Prednost suhe kapi krvi i suhe kapi plazme u odnosu na uzorak plazme/seruma je manji volumen uzorkovanja, stabilnost analita na sobnoj temperaturi, lakši transport i pohrana. Međutim, faktori koji utječu na kvantitativni rezultat analize izrezanog isječka iz uzorka suhe kapi krvi su volumen krvi koji se aplicira na filter papir, hematokrit, distribucija analita u suhoj kapi zbog utjecaja eritrocita i postupak ekstrakcije analita. Za pacijente s potvrđenim metaboličkim poremećajima koji se kontinuirano prate, velika je prednost što uzorke suhe kapi krvi koju mogu poslati poštom u laboratorij i smanjiti učestalost i invazivnost venepunkcije stalnih pretraga. Međutim, za većinu testova koji se koriste u praćenju metaboličkih pacijenata primarni uzorak izbora je plazma.

Cilj ovog rada bio je usporediti koncentracije fenilalanina i slobodnog karnitina u uzorcima suhe kapi plazme (Noviplex®) i suhe kapi krvi te uzorcima suhe kapi plazme i uzorcima plazme, a u svrhu poboljšanja dijagnostike i praćenja pacijenata s nasljednim metaboličkim poremećajima. Koncentracije fenilalanina i slobodnog karnitina mjerene su komercijalnim kompletom reagensa tvrtke *Recipe* na tandemskom spektrometru masa tvrtke *Shimadzu*.

Statističkim testovima pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji fenilalanina, kao ni u koncentraciji slobodnog karnitina, u uzorcima suhe kapi plazme i uzorcima suhe kapi krvi, dok je pokazano da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji fenilalanina kao i u koncentraciji slobodnog karnitina u uzorcima suhe kapi plazme i uzorcima plazme.

Uz uključivanje većeg broja ispitanika i većeg raspona koncentracija, trebalo bi ispitati i različite načine ekstrakcije analita iz uzorka suhe kapi plazme i plazme. Naime, do tog zaključka navode nas neslaganja u koncentracijama fenilalanina i slobodnog karnitina između uzoraka suhe kapi plazme i uzoraka plazma, dok uzorci suhe kapi krvi i suhe kapi plazme pokazuju zadovoljavajuće rezultate.

9. SUMMARY

Amino acid and acylcarnitine profiles are determined from dried blood samples in purpose of newborn screening. The advantages of dried blood spots and dried plasma spots in comparison with plasma/serum samples are lesser volume used in sampling, room temperature analyte stability, easier transport and storage. However, factors which influence the quantitative result analysis of the cut-out disk from dried blood sample are blood volume applied on the filter paper, hematocrit, analyte distribution affected by erythrocytes and analyte extraction process. Metabolic disorders patients are required continuous testing, and for them it is convenient to send dried blood samples by mail and decrease the number of hospital visits and invasiveness of venipuncture. However, most of the tests used for metabolic patients require a plasma sample.

The aim of this study was to compare concentrations of phenylalanine and free carnitine in dried plasma spots (Noviplex®) and dried blood spots as well as dried plasma spots and plasma samples, in purpose of improvements in diagnostics and monitoring metabolic disorders patients. Phenylalanine and free carnitine concentrations were measured using commercial reagent kits made by *Recipe* on tandem mass spectrometer by *Shimadzu*.

Statistic tests have shown no significant statistical difference in phenylalanine concentrations, as well as free carnitine concentrations in dried plasma spots and dried blood spots. However, there has been statistically significant difference in phenylalanine concentrations as well as free carnitine concentrations in dried plasma spots and regular plasma samples.

Along with including a higher number of participants and a wider concentration range, different methods for extracting analytes from dried plasma spots and regular plasma samples should be tested. Namely, disagreement in phenylalanine and free carnitine concentrations between dried plasma spots and regular plasma samples lead to this conclusion, while dried blood spots and dried plasma spots show satisfying results.

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 i slobodnog karnitina u uzorcima suhe kapi krvi, plazme i suhe kapi plazme na tandemskom spektrometru masa

Željka Šarčević

SAŽETAK

U svrhu provođenja novorođenačkog probira u uzorcima suhe kapi krvi određuje se profil aminokiselina i acilkarnitina. Prednost suhe kapi krvi i suhe kapi plazme u odnosu na uzorak plazme/seruma je manji volumen uzorkovanja, stabilnost analita na sobnoj temperaturi, lakši transport i pohrana. Međutim, faktori koji utječu na kvantitativni rezultat analize izrezanog isječka iz uzorka suhe kapi krvi su volumen krvi koji se aplicira na filtar papir, hematokrit, distribucija analita u suhoj kapi zbog utjecaja eritrocita i postupak ekstrakcije analita. Za pacijente s potvrđenim metaboličkim poremećajima koji se kontinuirano prate, velika je prednost što uzorke suhe kapi krvi koju mogu poslati poštom u laboratorij i smanjiti učestalost i invazivnost venepunkcije stalnih pretraga. Međutim, za većinu testova koji se koriste u praćenju metaboličkih pacijenata primarni uzorak izbora je plazma.

Cilj ovog rada bio je usporediti koncentracije fenilalanina i slobodnog karnitina u uzorcima suhe kapi plazme (Noviplex®) i suhe kapi krvi te uzorcima suhe kapi plazme i uzorcima plazme, a u svrhu poboljšanja dijagnostike i praćenja pacijenata s nasljednim metaboličkim poremećajima. Koncentracije fenilalanina i slobodnog karnitina mjerene su komercijalnim kompletom reagensa tvrtke Recipe na tandemskom spektrometru masa tvrtke Shimadzu.

Statističkim testovima pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika u koncentraciji fenilalanina, kao ni u koncentraciji slobodnog karnitina, u uzorcima suhe kapi plazme i uzorcima suhe kapi krvi, dok je pokazano da postoji statistički značajna razlika u koncentraciji fenilalanina kao i u koncentraciji slobodnog karnitina u uzorcima suhe kapi plazme i uzorcima plazme.

Uz uključivanje većeg broja ispitanika i većeg raspona koncentracija, trebalo bi ispitati i različite načine ekstrakcije analita iz uzorka suhe kapi plazme i plazme. Naime, do tog zaključka navode nas neslaganja u koncentracijama fenilalanina i slobodnog karnitina između uzoraka suhe kapi plazme i uzoraka plazma, dok uzorci suhe kapi krvi i suhe kapi plazme pokazuju zadovoljavajuće rezultate.

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

Rad sadrži: 39 stranica, 9 grafičkih prikaza, 4 tablice i 22 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: Fenilalanin, slobodni karnitin, suha kap krvi, suha kap plazme, hematokrit, tandemski spektrometar masa

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. Petra Turčić, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Dr. sc. Olga Gornik Kljaić, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2020.

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 free carnitine concentrations in dried blood spots, plasma and dried plasma spots using tandem mass spectrometry

Željka Šarčević

SUMMARY

Amino acid and acylcarnitine profiles are determined from dried blood samples in purpose of newborn screening. The advantages of dried blood spots and dried plasma spots in comparison with plasma/serum samples are lesser volume used in sampling, room temperature analyte stability, easier transport and storage. However, factors which influence the quantitative result analysis of the cut-out disk from dried blood sample are blood volume applied on the filter paper, hematocrit, analyte distribution affected by erythrocytes and analyte extraction process. Metabolic disorders patients are required continuous testing, and for them it is convenient to send dried blood samples by mail and decrease the number of hospital visits and invasiveness of venipuncture. However, most of the tests used for metabolic patients require a plasma sample.

The aim of this study was to compare concentrations of phenylalanine and free carnitine in dried plasma spots (Noviplex®) and dried blood spots as well as dried plasma spots and plasma samples, in purpose of improvements in diagnostics and monitoring metabolic disorders patients. Phenylalanine and free carnitine concentrations were measured using commercial reagent kits made by Recipe on tandem mass spectrometer by Shimadzu.

Statistic tests have shown no significant statistical difference in phenylalanine concentrations, as well as free carnitine concentrations in dried plasma spots and dried blood spots. However, there has been statistically significant difference in phenylalanine concentrations as well as free carnitine concentrations in dried plasma spots and regular plasma samples.

Along with including a higher number of participants and a wider concentration range, different methods for extracting analytes from dried plasma spots and regular plasma samples should be tested. Namely, disagreement in phenylalanine and free carnitine concentrations between dried plasma spots and regular plasma samples lead to this conclusion, while dried blood spots and dried plasma spots show satisfying results.

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

Thesis includes: 39 pages, 9 figures, 4 tables and 22 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Phenylalanine, free carnitine, dried blood spots, dried plasma spots, hematocrit, tandem mass spectrometry

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
Petra Turčić, Ph.D. Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Olga Gornik Kljaić, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: September 2020.

