

# Verifikacija metode za određivanje homocisteina iz suhe kapi krvi na filtarskom papiru primjenom tehnologije tandemske spektrometrije masa

---

**Andrašić, Petra**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2022**

*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:163:158988>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-09-01**



*Repository / Repozitorij:*

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



**Petra Andrašić**

**Verifikacija metode za određivanje homocisteina  
iz suhe kapi krvi na filtarskom papiru primjenom  
tehnologije tandemске spektrometrije masa**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2022.

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 prof. dr. sc. Ksenije Fumić.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici, prof. dr. sc. Kseniji Fumić na prenesenom znanju te uloženom vremenu i trudu prilikom izrade ovoga rada.*

*Velika hvala i djelatnicama Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb Ivani Križić, Korani Lipovac, Ani Škaričić i Ivi Bilandžiji Kuš na pomoći i savjetima pri izvođenju eksperimentalnog dijela i pisanju diplomskoga rada.*

*Posebno se zahvaljujem mojoj obitelji, na ogromnoj podršci i svemu što ste mi pružili tijekom školovanja te što ste uvijek vjerovali u mene.*

*Hvala svim prijateljima koji su bili uz mene, dijelili sa mnom i radost i tugu te mi uljepšali studentske dane.*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
1.1. Aminokiseline .....	1
1.1.1. Homocistein .....	2
1.1.2. Laboratorijsko određivanje aminokiselina/homocisteina.....	6
1.2. Nasljedni metabolički poremećaji i novorođenački probir .....	7
1.2.1. Poremećaji metioninskog ciklusa .....	8
1.3. Suha kap krvi na filtarskom papiru .....	10
1.4. Tandemska spektrometrija masa .....	11
1.5. Kratka analitička validacija kvantitativnih metoda.....	13
<b>2. OBRAZLOŽENJE METODE .....</b>	<b>15</b>
<b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>	<b>16</b>
3.1. Uzorci pacijenata.....	16
3.2. Materijali .....	16
3.2.1. Kemikalije .....	17
3.2.2. Oprema i uređaji.....	17
3.3. HPLC/MS-MS metoda .....	17
3.3.1. Predanalitička faza .....	17
3.3.2. Analitička faza .....	19
3.3.3. Poslijeanalitička faza .....	20
3.4. Statistička obrada podataka .....	20
3.4.1. Preciznost .....	20
3.4.2. Točnost .....	22
3.4.3. Analitička osjetljivost .....	22
3.4.4. Linearnost .....	23
3.4.5. Usporedivost.....	24

<b>4. REZULTATI I RASPRAVA</b> .....	<b>26</b>
4.1. REZULTATI .....	26
4.1.1. Izrada kalibracijske krivulje .....	26
4.1.2. Procjena preciznosti, točnosti, analitičke osjetljivosti I linearnosti .....	28
4.1.3. Usporedivost rezultata .....	32
4.2. RASPRAVA.....	36
<b>5. ZAKLJUČAK</b> .....	<b>38</b>
<b>6. LITERATURA</b> .....	<b>39</b>
<b>7. SAŽETAK/SUMMARY</b> .....	<b>45</b>

## POPIS KRATICA

BHMT – betain homocistein metiltransferaza (engl. *betaine homocysteine methyltransferase*)

CBS – cistationin- $\beta$ -sintaza (engl. *cystathionine beta-synthase*)

CLIA – kemiluminiscentni imunokemijski test (engl. *chemiluminescent immunoassay*)

CLSI – Institut za kliničke i laboratorijske standarde (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*)

CTH – cistationin- $\gamma$ -liaza (engl. *cystathionine gamma-lyase*)

DBS – suha kap krvi (engl. *dried blood spot*)

EDTA – etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*)

EIA – enzimski imunokemijski test (engl. *enzyme immunoassay*)

eNOS – endotelna sintaza dušikova oksida (engl. *endothelial nitric oxide synthase*)

ESI – elektrosprej ionizacija (engl. *electrospray ionisation*)

FPIA – imunokemijski test fluorescentne polarizacije (engl. *fluorescence polarization immunoassay*)

GC-MS – plinska kromatografija spektrometrija masa (engl. *gas chromatography mass spectrometry*)

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*)

IS – interni standard (engl. *internal standard*)

LC-MS/MS – tekućinska kromatografija tandemska spektrometrija masa (engl. *liquid chromatography tandem mass spectrometry*)

LOB – granica slijepe probe (engl. *limit of blank*)

LOD – granica detekcije (engl. *limit of detection*)

LOQ – granica kvatifikacije (engl. *limit of quantitation*)

MAT I/III – metionin adenziltransferaza I/III (engl. *methionine adenosyltransferase I/III*)

MS – metionin sintaza (engl. *methionine synthase*)

MTHFR – 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza (engl. *5,10-methylenetetrahydrofolate reductase*)

NBS – novorođenački probir (engl. *newborn screening*)

NO – dušikov (II) oksid (engl. *nitric oxide*)

pI – izoelektrična točka (engl. *isoelectric point*)

SAH – S-adenozilhomocistein (engl. *S-adenosylhomocysteine*)

SAM – S-adenozilmetionin (engl. *S-adenosylmethionine*)

# 1. UVOD

## 1.1. Aminokiseline

Aminokiseline su organske molekule koje sadrže središnji  $\alpha$ -ugljikov atom na kojega je vezana amino-skupina ( $-\text{NH}_2$ ), karboksilna skupina ( $-\text{COOH}$ ), vodikov atom i specifični bočni ogranak – R. Varijacije u bočnom ogranku uzrok su izrazito različitih biokemijskih svojstava i funkcija aminokiselina.

Sve aminokiseline, izuzev najjednostavnije aminokiseline glicin, su kiralne molekule koje posjeduju optičku aktivnost - sposobnost zakretanja ravnine polarizirane svjetlosti. To znači da im je  $\alpha$ -ugljikov atom asimetričan te da se mogu naći u dvama stereoizomernim oblicima, L- i D- izoformama koje imaju ista fizikalno-kemijska obilježja, no različitu biološku aktivnost. Iako su proteini građeni isključivo od L-aminokiselina, uočeno je da se starenjem u organizmu formiraju i pojedini D-izomeri koji narušavaju funkciju proteina i sudjeluju u nastanku različitih patoloških procesa (Fuji N i sur., 2018). Zbog postojanja karboksilne i amino-skupine, aminokiseline su amfoterni spojevi - u kiselj sredini amino-skupina prima vodikov ion pa imaju ulogu baze, dok u alkalnoj sredini vodikov ion disocira iz karboksilne skupine te se ponašaju kao kiseline. Kada disociraju obje skupine, aminokiselina se nalazi u dipolarnom, *zwitterion* obliku čiji je ukupan naboj nula, a pH vrijednost pri kojoj se postiže takav oblik naziva se izoelektrična točka (pI). pI ovisi o kemijskoj strukturi bočnog ogranka prema kojemu dijelimo aminokiseline na nepolarne i polarne, a polarne još mogu biti kisele i bazne.

U prirodi postoji više od 300 aminokiselina, ali samo njih 20 izgrađuje proteine pa ih zovemo proteinogenima. Dodatno, te aminokiseline dijelimo ovisno o tome moraju li se unositi putem prehrane (esencijalne) ili se mogu same sintetizirati transaminacijom iz ketokiselina (neesencijalne). Transaminacija je reverzibilni proces u kojemu aminokiselina, donor amino-skupine, prelazi u ketokiselinu, a iz ketokiseline koja je primila amino-skupinu nastaje odgovarajuća aminokiselina. Na taj se način isprepliću metabolizmi aminokiselina, ugljikohidrata i lipida. Postoje i uvjetno esencijalne aminokiseline koje se inače mogu sintetizirati u organizmu u dovoljnim količinama, ali da bi se zadovoljile potrebe organizma u specifičnim uvjetima kada je iskorištenje veće od sinteze, potrebno ih je osigurati putem prehrane. Aminokiseline se međusobno povezuju tzv. peptidnom vezom između amino-

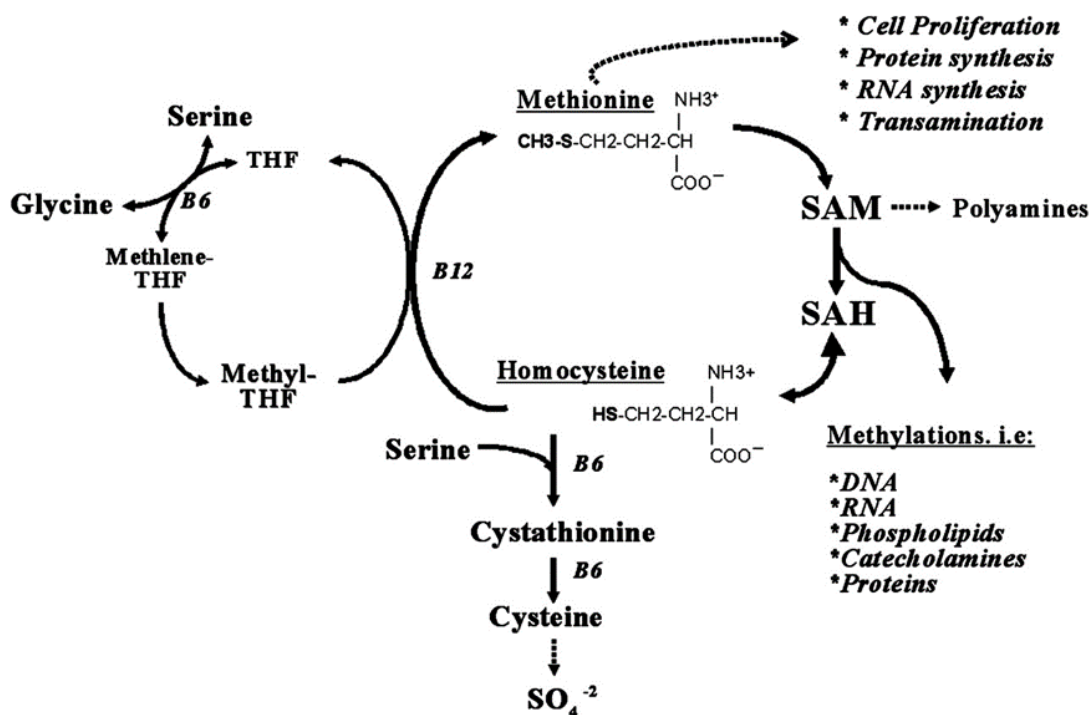


skupine jedne aminokiseline i karboksilne skupine druge aminokiseline pri čemu nastaju peptidi, polipeptidi i u konačnici proteini (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009a; Wu, 2009).

Osim što su gradivne jedinice proteina, aminokiseline imaju važnu ulogu u regulaciji metaboličkih puteva koji su neophodni za održavanje, rast, reprodukciju i imunitet organizma. Primjerice, prekursori su brojnih hormona, neurotransmitera i metabolita, zatim izravno sudjeluju u staničnoj signalizaciji te reguliraju gensku ekspresiju (Wu, 2009). Budući da poremećaji metabolizma aminokiselina ometaju rast i razvoj te narušavaju homeostazu cijelog organizma, klinički je značajno njihovo određivanje kako bi se uspostavila točna i pravodobna dijagnoza.

### 1.1.1. Homocistein

Homocistein (Hcy) je neproteinogena aminokiselina koja sadrži tiolnu skupinu (-SH). Ne unosi se hranom, već u organizmu nastaje isključivo iz esencijalne aminokiseline metionin, u metioninskom ciklusu kao međuprodukt u procesu demetilacije metionina (Koklesova i sur., 2021).



Slika 1: Metioninski ciklus (preuzeto i prilagođeno od Troen i sur., 2003)

Prvi korak u metabolizmu metionina je prevođenje metionina u S-adenozilmetionin (SAM) pomoću enzima ATP-L-metionin S-adenoziltransferaze, a reakcija ovisi o samoj koncentraciji SAM-a unutar stanice. SAM je, zahvaljujući sulfonijevom kationu u svojoj strukturi, jedan od ključnih donora metilne skupine u reakcijama biološke transmetilacije koje imaju važnu ulogu u regulaciji i ekspresiji gena te sudjeluju u sintezi mnogih spojeva kao što su kreatin, fosfatidilkolin i neurotransmiteri. Pri prijenosu metilne skupine na molekule akceptora, uključujući nukleinske kiseline, proteine i lipide, nastaje S-adenozilhomocistein (SAH). Nadalje, SAH se u reverzibilnoj reakciji hidrolize djelovanjem enzima S-adenozilhomocistein-hidrolaza prevodi u homocistein i adozin, no zbog brzog uklanjanja produkata u fiziološkim uvjetima, prednost ima obrnuta reakcija. Ovisno o količini metionina i potrebama stanice, homocistein se dalje može metabolizirati putem transulfuracije pri čemu nastaje cistein ili remetilirati natrag u metionin.

Transulfuracijom se homocistein ireverzibilno razgrađuje, a reakcija se pretežno odvija u jetri i bubrezima. Ovisna je o piridoksal fosfatu (aktivnom obliku vitamina B6) koji služi kao kofaktor enzimima. Prvotno se događa kondenzacija homocisteina i serina koju katalizira cistationin  $\beta$ -sintaza (CBS) te nastaje cistation. Potom se cistation hidrolizira na cistein i  $\alpha$ -oksobutirat u prisustvu enzima cistationin  $\gamma$ -liaza (CTH). Cistein, pored toga što sudjeluje u sintezi brojnih proteina, služi za pretvorbu u taurin, piruvat ili u jedan od najznačajnijih staničnih antioksidansa – glutation.

Remetilacija homocisteina u metionin zadnji je korak u metioninskom ciklusu, čime se nadomješta mogući nedostatak metionina. Remetilacija se može odvijati na dva različita načina; ovisno je li donor metilne skupine 5-metiltetrahidrofolata (5-metilTHF) koji je povezan s metabolizmom folata (vitamin B9) ili betain. U prvom i češćem slučaju, reakciju katalizira enzim metionin sintaza (MS) kojemu je potreban kofaktor metilkobalamin (oblik vitamina B12). Osim vitamina B12 i B9, važna je i dostupnost 5-metilTHF-a koji se stvara iz ireverzibilne redukcije 5,10-metilentetrahidrofolata djelovanjem enzima 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaze (MTHFR) te oblik vitamina B2 (flavin adenin dinukleotid) kojega MTHFR upotrebljava kao kofaktor. Remetilacija koja koristi betain dobiven oksidacijom kolina, ograničena je na jetru i bubrege, a katalizira ju enzim betain homocistein metiltransferaza (BHMT) (Esse R i sur., 2019; Schalinske i Smazal, 2012).

Iako homocistein nije izravno uključen u sintezu proteina, proteini mogu sadržavati homocisteinske ostatke. Jedan od takvih primjera je N-homocisteinilacija, posttranslacijska

modifikacija proteina specifično vezana uz homocistein, koja mijenja strukturu i funkciju proteina. Naime, zbog strukturne sličnosti s metioninom, homocistein se pomoću enzima metionil tRNA sintetaze uključuje u biosintezu proteina, a prilikom ispravka te pogreške, putem ciklizacije, nastaje toksični metabolit homocistein tiolakton. Homocistein tiolakton stvara izopeptidnu vezu, oštećuje proteine i dovodi do nastanka novih antigena koji pokreću upalne procese, a stupanjem u interakciju s LDL-om, uzrokuje agregaciju, povećanje gustoće i tvorbu pjenastih stanica (Jakubowski H, 2019; Kumar i sur., 2017).

U krvnoj plazmi homocistein se većinom nalazi u oksidiranom obliku, najviše vezan na proteine plazme poput albumina (70-80%). Ako nije vezan na proteine plazme, može se spajati s drugim homocisteinom ili drugim tiolima tvoreći disulfide (20-30%), a samo 1% cirkulira u reduciranom obliku kao slobodni tiol. Općenito, koncentracija homocisteina raste s dobi pa su tako vrijednosti niže kod djece, ali i kod žena prije menopauze te trudnica. Koncentracija homocisteina u krvi smatra se povišenom ako je iznad 15  $\mu\text{mol/L}$  i takvo stanje naziva se hiperhomocisteinemija. Međutim, moždani udar, kognitivno oštećenje ili demencija primjeri su kod kojih je dokazano da vrijednosti već iznad 11  $\mu\text{mol/L}$  u odrasloj dobi mogu dovesti do štetnih učinaka. Osim zbog fizioloških karakteristika, povišene vrijednosti mogu se javiti uslijed genskih poremećaja što rezultira manjkom ili potpunom odsutnošću enzima uključenih u metioninski ciklus. U čimbenike rizika ubraja se još pušenje, konzumacija lijekova, nedostatak vitamina B2, B6, B9 i B12, hipotireoza i disfunkcija bubrega (Dai C i sur., 2021; Koklesova i sur., 2021; Smith i Refsum, 2021).

Hiperhomocisteinemija se povezuje uz mnoga stanja uključujući kardiovaskularne bolesti s aterosklerozom u pozadini, neurodegenerativne bolesti, maligne bolesti, komplikacije u trudnoći, inzulinsku rezistenciju i dijabetes i osteoporozi (Kim i sur., 2018; Koklesova i sur., 2021). Uz to, povišena koncentracija ukupnog homocisteina povezuje se s većom stopom mortaliteta kod navedenih bolesti (Smith i Refsum, 2021). Homocistein sudjeluje u patogenzi kardiovaskularnih bolesti tako što narušava funkciju endotela, odnosno onemogućava endotelu da regulira vaskularni tonus. Radi održavanja ravnoteže između vazokonstrikcije i vazodilatacije, endotelne stanice oslobađaju medijatore poput dušikovog oksida (NO), prostaciklina, endotelina-1 i tromboksana, a homocistein djelujući inhibitorno na endotelnu sintazu dušikovog oksida (eNOS) smanjuje biorasploživost vazodilatatora NO. Neuravnotežena proizvodnja NO dovodi do aterotrombogeneze, a zbog reaktivne sulfhidrilne skupine na homocisteinu povećan je nastanak reaktivnih kisikovih vrsta što može potaknuti ekspresiju citokina i adhezijskih molekula putem proteinskog transkripcijskog faktora NF- $\kappa$ B

u stanicama endotela. Homocistein ima značajan učinak na povećano stvaranje vazokonstriktora tromboksana te aktivaciju i agregaciju trombocita koji oslobađanjem kemokina pridonose endotelnoj disfunkciji. U mitohondrijima hiperhomocisteinemija utječe na smanjenje aktivnosti lanca prijenosa elektrona i proizvodnju adenozin trifosfata u procesu oksidativne fosforilacije što može dovesti do poremećaja staničnog disanja i bolesti poput infarkta miokarda, moždanog udara, zatajenja srca i demencije (Koklesova i sur., 2021; Kaplan P i sur., 2020; Esse R i sur., 2019). Istodobno, utvrđena je pozitivna korelacija između povišenih vrijednosti homocisteina i Parkinsonove i Alzheimerove bolesti. Uočene su promjene u propusnosti krvno-moždane i krvno-retinalne barijere, povećana je ekspresija gena proupalnih biljega interleukina-1b i faktora tumorske nekroze  $\alpha$  u mikroglijama, dok je u neuronima pojačana ekspresija kinaza koje mogu hiperfosforilirati tau-protein, jedan od biomarkera Alzheimerove bolesti. Autooksidacijom homocisteina dolazi do oksidacijskog stresa pri čemu se oslobađaju slobodni radikali koji izazivaju neuroinflamaciju i staničnu smrt. Kod starijih osoba često je smanjeno stvaranje endogenog hormona melatonina koji ima sposobnost uklanjanja slobodnih radikala pa su učinci još izraženiji. Oštećenje neurona i veze među neuronima posljedica su još jednog mehanizma u kojemu homocistein ima ulogu agonista, tj. aktivatora N-metil-D-aspartatnih i metabotropnih glutamatnih receptora (Tawfik i sur., 2021; Al Mutairi, 2020; Fan i sur., 2020). Između ostalog, poznat je mehanizam kojim homocistein remeti inzulinsku signalizaciju što posljedično uzrokuje inzulinsku rezistenciju koja prethodi šećernoj bolesti tipa 2. Ometajući fosforilaciju inzulinskih receptora, homocistein utječe na nizvodnu signalnu kaskadu i smanjuje translokaciju GLUT4 transportera na staničnu membranu, a time i unos glukoze. Oštećenje signalizacije popraćeno je i povećanom proizvodnjom rezistina, peptidnog hormona koji se povezuje s pretilošću i dijabetesom. (Kumar i sur., 2017). Homocistein se smatra dobrim biljekom za lokalizirane tumore jer je dokazano da mu koncentracija raste kod brze proliferacije tumorskih stanica. U prilog tome, postoje indicije da tumorsko tkivo remeti metabolizam homocisteina zbog nedostatka folata (Kim i sur., 2018). Snižavanjem vrijednosti ukupnog homocisteina pomoću suplementacije vitaminima B skupine (B6, B9, B12, B2) moguće je djelomično spriječiti neke bolesti, uključujući defekte neuralne cijevi, oslabljen kognitivni razvoj u djetinjstvu, moždani udar, makularnu degeneraciju i kognitivno oštećenje kod starijih osoba (Smith i Refsum, 2021).

### *1.1.2. Laboratorijsko određivanje aminokiselina/homocisteina*

Budući da su aminokiseline male molekule koje pomoću specifičnih prijenosnika prolaze različite membrane, moguće je njihovo određivanje u raznim tjelesnim tekućinama. Za što točnije nalaze važno je ispuniti predanalitičke uvjete, a to su: pripremiti pacijenta za uzimanje uzoraka (uzimajući u obzir vrijeme uzorkovanja i prehranu), pravilno uzimanje uzoraka (izbjegavati hemolizu stanica koliko god je to moguće) i dostava uzoraka u laboratorij u preporučenom vremenu i pod određenim uvjetima. Ukoliko u praksi nije moguće pridržavati se ovih preporuka, bitno je prilikom tumačenja rezultata uzeti u obzir navedene faktore. Nadalje, plazmu ili serum potrebno je centrifugiranjem odvojiti od stanica najkasnije unutar dva do tri sata nakon vađenja krvi te deproteinizirati kako bi se dobio stabilan uzorak. Za određivanje homocisteina preporučeni uzorak je plazma. Nakon uzimanja uzoraka, epruvetu je potrebno uroniti u led kako bi se prekinuo metabolizam eritrocita i centrifugirati unutar jednog sata. Ukoliko se ne poštuju navedeni uvjeti može doći do povećanja koncentracije homocisteina u plazmi za oko 10 % po satu na sobnoj temperaturi. Zbog navedenog homocistein se ne bi trebao određivati u serumu. Na koncentraciju homocisteina u krvi utječu količine vitamina B6, B9 i B12 i sadržaj proteina u prehrani, stoga se preporučuje prikupljanje uzorka natašte ili najkasnije tri sata nakon doručka i lagane večere dan prije.

Za određivanje aminokiselina, laboratorijima su kvalitativne analize (razne metode tankoslojne kromatografije) lako pristupačne i mogu poslužiti za usmjeravanje daljnje dijagnostike, međutim ne otkrivaju blago povišene ili snižene vrijednosti aminokiselina. Koncentracije pojedinih aminokiselina određuju se kvantitativnim metodama koje su znatno osjetljivije, ali i skuplje. Od kvantitativnih metoda najčešće se koriste tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) te masena spektrometrija plinske i tekućinske kromatografije (Xu i sur., 2020; Fumić i Bilić, 2009). Ukupna koncentracija homocisteina osjetljiviji je dijagnostički parametar za hiperhomocisteinemiju od koncentracije samo slobodnog homocisteina pa sve analitičke metode za mjerenje ukupnog homocisteina zahtijevaju korak redukcije u kojemu dolazi do cijepanja disulfidnih veza (Rasmussen i Møller, 2000). Metode za određivanje ukupnog homocisteina mogu biti kromatografske (tekućinske kromatografije u kombinaciji s tandemskom spektrometrijom masa (LC-MS/MS), plinske kromatografije s masenom spektrometrijom (GC-MS) ili HPLC-a s fluorescentnom detekcijom) ili imunokemijske (imunokemijske metode koje za detekciju primjenjuju enzime (EIA), fluorescentnu polarizaciju (FPIA) ili kemiluminiscenciju (CLIA) (Paprotny i sur.,

2020). Imunokemijski testovi za određivanje homocisteina su dovoljno osjetljivi, međutim nedovoljno specifični zbog čega se sve više zamjenjuju kromatografskim tehnikama kao što je LC-MS/MS. LC-MS/MS metoda s elektrosprej ionizacijom je referentna metoda u kliničkim laboratorijima za određivanje koncentracije homocisteina (Paprotny i sur., 2020; Alam i sur., 2019; Ubbink, 2000).

### *1.2. Nasljedni metabolički poremećaji i novorođenački probir*

Do danas je poznato više od 1400 nasljednih metaboličkih poremećaja koji su posljedica mutacija pojedinačnoga gena što dovodi do nedovoljne sinteze proteina ili sinteze nefunkcionalnog proteina, najčešće enzima (Ferreira i van Karnebeek, 2019). Stvaranjem nefunkcionalnog enzima dolazi do promjena u metaboličkom putu i prekomjernog nakupljanja specifičnih metabolita. Većina se nasljednih metaboličkih bolesti nasljeđuje prema Mendelovim zakonima nasljeđivanja (dominantno ili recesivno te autosomno ili X-vezano), a manji broj mitohondrijskim nasljeđivanjem (Shrestha, ured., 2017; Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009b). Incidencija pojedinih bolesti je niska, ali zajedno ti poremećaji zahvaćaju najmanje 1% sve novorođenčadi te se mogu javiti i u kasnijoj životnoj dobi. Veliki izazov u medicini predstavlja razumijevanje samih mehanizama bolesti, kao i činjenica da uglavnom ne postoji povezanost između genotipa i fenotipa. Zbog velikog broja mutacija, klinička slika je izrazito heterogena što dodatno otežava dijagnozu bolesti, a pravovremeno prepoznavanje bolesti i laboratorijska potvrda dijagnoze preduvjeti su uspješnog liječenja.

Ovisno o načinu organizacije, u laboratorijskoj dijagnostici nasljednih metaboličkih poremećaja razlikuju se dva pristupa – sustavno i selektivno traganje. Selektivno traganje obuhvaća laboratorijsku obradu simptomatskih bolesnika na temelju anamneze, osnovnih laboratorijskih pretraga i kliničke slike, a sustavno traganje se još naziva i novorođenačkim probirom (engl. *newborn screening*, NBS) (Ferreira i van Karnebeek, 2019; Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009b).

Probir novorođenčadi podrazumijeva ispitivanje na neke prirođene bolesti u određenoj novorođenačkoj populaciji s ciljem njihovog prepoznavanja, prije nego prouzroče trajne posljedice po zdravlje djeteta (<https://www.kbc-zagreb.hr/informacije-javnosti-o-novorodjenackom-probiru.aspx>). Takav složeni dijagnostički pristup najčešće je organiziran tako da jedan laboratorij pokriva područje neke regije ili države. U odnosu na njegove

početke, program novorođenačkog probira znatno je proširen i neprestano se razvija čemu pridonosi i razvoj novih tehnologija (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009b). Glavni kriteriji za uvrštavanje neke bolesti u program novorođenačkog probira su nemogućnost ranog prepoznavanja, dostupnost liječenju, postojanje dovoljno osjetljivog i specifičnog laboratorijskog testa i razmjerno velika pojavnost, a potrebno je razmotriti i etičke i ekonomske aspekte svakog proširenja. Temeljem navedenih mjerila, u Republici Hrvatskoj u program je zasad uključeno osam bolesti: fenilketonurija, konatalna hipotireoza, nedostatak acil-CoA-dehidrogenaze srednjih lanaca, nedostatak 3-OH-acil-CoA-dehidrogenaze dugih lanaca (izoliran ili kao dio manjka trifunkcionalnog proteina), nedostatak acil-CoA-dehidrogenaze vrlo dugih lanaca, nedostatak karnitinskog nosača, izovalerička acidurija i glutarna acidurija tipa I. Novorođenački probir na ove bolesti radi se iz uzorka suhe kapi krvi, a uspješnost njegova provođenja uvelike ovisi o odgovarajućem i pravodobnom prikupljanju uzoraka. Uzorak se uzima između 48 i 72 sata djetetova života jer se tada očekuju karakteristične promjene analita za bolesti koje se pretražuju te pritom treba paziti da ne dođe do zagađenja uzorka. Nakon što se krv nakapa na sva četiri iscrtana kruga na standardiziranom filtarskom papiru, uzorak se suši najmanje četiri sata na ravnoj i čistoj podlozi, bez izravnog utjecaja topline i sunčeve svjetlosti (Bilandžija i sur., 2018). Procjenjuje se da u ovoj metodi dozvoljena pogreška pri korištenju uzorka suhe kapi krvi na filtarskom papiru za novorođenački probir može biti +/- 30 % (Lehotay i sur., 2011).

#### *Poremećaji metioninskog ciklusa*

Povišene vrijednosti homocisteina najčešće su posljedica urođenih grešaka u metabolizmu metionina i homocisteina. Visoka koncentracija homocisteina i niska koncentracija metionina upućuju na mutaciju u koraku remetilacije, dok visoke koncentracije i homocisteina i metionina ukazuju na poremećaj u putu transulfuracije. Najteži slučajevi uzrokovani su homozigotnom ili složenom heterozigotnom mutacijom gena za enzime 5,10-metilentetrahidrofolat reduktazu (MTHFR) i cistation- $\beta$ -sintazu (CBS) ili mutacijom gena u metabolizmu kobalamina. Kod nedostatka ili smanjene sinteze drugih enzima uključenih u metioninski ciklus javljaju se manje ozbiljni fenotipski oblici (Iacobazzi i sur., 2014).

Klasična homocistinurija, odnosno nedostatak CBS enzima, uzrokovana je bialelnim patogenim mutacijama u *CBS* genu. Nasljeđuje se autosomno-recesivno što znači da prilikom začeća postoji 25% šanse da osoba bude pogođena bolešću, 50% šanse da bude asimptomatski

nositelj i 25% šanse da osoba bude zdrava. Biokemijska obilježja su izrazito visoka koncentracija homocisteina i obično metionina što je popraćeno niskim koncentracijama cisteina i cistationa u cirkulaciji. Simptomi bolesti mogu biti različiti i zahvaćaju okularni, skeletni, vaskularni i središnji živčani sustav (Al Mutairi, 2020; Sacharow i sur., 2017). Kod bolesnika nerijetko dolazi do zaostajanja u razvoju uz snižen kvocijent inteligencije, ektopija leće, miopiju, tromboemboliju i skeletne abnormalnosti poput prekomjerne visine, skolioze i dugih nogu što podsjeća na Marfanov sindrom, samo bez hiperomobilnosti zglobova. Tromboembolija može biti jedini simptom, a ujedno je i vodeći uzrok rane smrti i morbiditeta. Kako bi se smanjio rizik od tromboembolije u trudnoći, trudnicama s dijagnozom homocistinurije preporuča se primjena profilaktičke antikoagulantne terapije niskomolekularnim heparinom tijekom trećeg tromjesečja i nakon poroda (Sacharow i sur., 2017). Liječenje učinkovito smanjuje morbiditet, posebice kada se započne rano, a mogući oblici liječenja su restriksijska dijeta bez metionina i suplementacija folata i vitamina B12 te terapija piridoksinom i betainom. Blaži oblici bolesti, posebno oni koji zbog specifičnih mutacija pozitivno reagiraju na terapiju piridoksinom, mogu se manifestirati tek u kasnijoj, odrasloj dobi. Bolesnici koji ne reagiraju na piridoksin u pravilu razvijaju teži oblik bolesti. Kod pacijenata kojima se bolest ustanovi novorođenačkim probirom, uz pridržavanje terapije, moguća je prevencija tjelesnih komplikacija i normalan kognitivni razvoj. U sklopu novorođenačkog probira na klasičnu homocistinuriju se može posumnjati kada su vrijednosti metionina iznad dogovorene granične vrijednosti. Međutim, metionin nije dovoljno specifičan te je u sklopu probira na klasičnu homocistinuriju potrebno napraviti drugostupanjske testove kod sve novorođenčadi s vrijednostima metionina iznad granične vrijednosti. Uvođenjem drugostupanjskih testova smanjuje se udio lažno pozitivnih nalaza. Povišena koncentracija metionina u krvi nije specifična za nedostatak CBS-a, već se javlja i kod bolesti jetre, manjka enzima metionin adenoziltransferaze I/III (MAT I/III), manjka piridoksina i nekoliko drugih urođenih poremećaja metabolizma. Jedno od rješenja kojim se može poboljšati specifičnost je određivanje ukupnog homocisteina kao sekundarnog biljega u probiru, a izračunavanje omjera metionina i homocisteina može olakšati razlikovanje pacijenata s nedostatkom CBS-a od onih s manjkom MAT I/III. Potvrda nedostatka CBS-a uz laboratorijsku dijagnostiku podrazumijeva opravdanu kliničku sumnju i isključivanje drugih uzroka hiperhomocisteinemije (Morris i sur., 2017).

Nedostatak MTHFR enzima je autosomno-recesivna bolest, a polimorfizmi *MTHFR* gena koji uzrokuju neispravnu metilaciju, manjak folata i razne bolesti učestali su i razlikuju



se među etničkim skupinama. Procjenjuje se da je 10% svjetske populacije homozigotno, a u nekim sredinama taj postotak raste i do 25%. Polimorfizam C677T izaziva probleme s kardiovaskularnom funkcijom, regulacijom DNA i proizvodnjom glutaciona, dok polimorfizam A1298C smanjuje koncentraciju tetrahidrobiopterina i veže se uz proizvodnju dušikovog oksida (NO) (Al Mutairi, 2020; Iacobazzi i sur., 2014). Kliničke se manifestacije razlikuju, ali za teži oblik bolesti karakteristični su akutni neurološki poremećaj i progresivna encefalopatija u ranom djetinjstvu, dok adolescenti i odrasli mogu razviti psihijatrijske simptome, neuropatiju ili vensku trombozu (Huemer i sur., 2015).

Poremećaji metabolizma kobalamina su mnogobrojni i mogu utjecati na njegovu apsorpciju (manjak unutarnjeg faktora, Imerslund-Gräsbeckov sindrom) ili transport (manjak transkobalamina) (Al Mutairi, 2020). Ipak, najrašireniji je poremećaj kobalamina C u kojemu je smanjena pretvorba prehrambenog oblika kobalamina u dva aktivna oblika, metilkobalamin i adenzilkobalamin. Smatra se da toksično nakupljanje homocisteina zajedno sa S-adenzilhomocisteinom (SAH) i nedostatak metabolita nizvodno u putu imaju sinergistički učinak na razvoj bolesti. (Iacobazzi i sur., 2014). Klinička slika je vrlo raznolika, a najčešći simptomi su megaloblastična anemija, panicitopenija, optička neuropatija i slabiji kognitivni razvoj. Kasno dijagnosticiranje može biti popraćeno ireverzibilnim neurološkim nedostacima, stoga terapiju treba uvesti pravovremeno. Iz istog razloga predloženo je određivanje u sklopu novorođenačkog probira i mjerenje homocisteina u drugostupanjskim testovima (Huemer i Baumgartner, 2019).

Svim poremećajima zajedničko je da su rijetki zbog čega su istraživanja ograničena na mali broj ispitanika s različitim genotipovima, a istovremeno klinička slika i vrsta terapije uvelike variraju. Unatoč tome, za određene poremećaje metioninskog ciklusa dokazana je uspješnost terapije, ishodi su bolji kod ranog liječenja zbog čega su navedene bolesti kandidati za programe novorođenačkog probira širom svijeta (Huemer i sur., 2015).

#### *1.4. Suha kap krvi na filtarskom papiru*

Suha kap krvi (engl. *dried blood spot*, DBS) je uzorak koji se dobiva kapanjem kapljice krvi iz pete, prsta ili uške na poseban, standardiziran filtarski papir. Prije uzimanja uzorka, pacijenta je potrebno pripremiti za uzorkovanje, ne dirati filtarski papir na koji se nanosi uzorak, odabrati i dezinficirati mjesto uboda, obrisati prvu kap, pričekati da se formira

sljedeća velika kap krvi i prisloniti je na filtarski papir. Karticu je potrebno sušiti minimalno 4 sata na sobnoj temperaturi u horizontalnom položaju. Nakon što se krv osuši, uzorak se može transportirati u laboratorij ili skladištiti tjednima na sobnoj temperaturi ili mjesecima na -20°C. Osim što se koristi za probir novorođenčadi, DBS nalazi primjenu i u brojnim drugim područjima kliničke kemije: određivanje peptida, proteina i metabolita, procjenu razine hormona, probir virusa, izolaciju DNA, otkrivanje genskih poremećaja te u farmakološkim i toksikološkim analizama. U usporedbi s venepunkcijom, brojne su prednosti ovakvog uzorkovanja: minimalno je invazivno i potreban je mali volumen krvi, jednostavno sušenje i pohrana, jednostavan i jeftin transport te jednostavno zbrinjavanje otpada (Malsagova i sur., 2020; McClendon-Weary i sur., 2020). Najveći nedostatak suhe kapi krvi je hematokrit jer može bitno utjecati na rezultate. Uzorak krvi s visokim hematokritom ima veću viskoznost zbog čega se krv ne širi homogeno, odnosno krv sporije putuje po filtarskom papiru što može dovesti do varijacija analita u mjerenju. Još jedan od potencijalnih problema je kromatografski učinak, odnosno način na koji određeni analit putuje kroz filtarski papir, a da bi se taj učinak umanjio, razvijene su kartice filtarskog papira s matriksom koji omogućuje jednako putovanje krvi duž cijelog iscrtanog kruga na filtarskom papiru (Lim, 2018; McClendon-Weary i sur., 2020; Zakaria i sur., 2016).

#### *1.4. Tandemska spektrometrija masa*

Spektrometrija masa je napredna analitička tehnika koja se koristi za identifikaciju i kvantifikaciju spojeva. Temelji se na pretvorbi uzorka u ionizirano stanje, s fragmentacijom ili bez nje, a nastali ioni potom se odvajaju pod utjecajem električnog i magnetskog polja, te detektiraju pomoću grafičkog prikaza. Instrument se sastoji od: ionizacijskog izvora, prvog masenog analizatora (MS1), kolizijske ćelije, drugog masenog analizatora (MS2) i detektora. (Caballero i sur., ured., 2016). Vakuumskim sustavom obuhvaćena su središnja tri dijela instrumenta kako bi se održavao nizak tlak koji onemogućava reakciju između iona i molekule (Sharmin i Zafar, ured., 2017). Uzorak koji želimo analizirati prevodi se u plinovito stanje i ionizira elektrosprej ionizacijom (ESI) pri atmosferskom tlaku, a uključuje tri koraka: stvaranje i raspršivanje nabijenih kapljica, isparavanje otapala i izbacivanje iona iz visoko nabijenih kapljica. Prenoseći relativno malo energije analitu, dolazi do slabe fragmentacije, stoga je ESI izrazito pogodna za analizu metabolita, ksenobiotika i peptida. ESI omogućuje osjetljivu analizu nehlapljivih i termolabilnih analita u niskim koncentracijama (Pitt, 2009).

Nastali aerosol sastavljen je od nabijenih kapljica čiji je naboj jednoliko raspoređen po površini kako bi se minimalizirala potencijalna energija. U nabijenim kapljicama suprotno djeluju dvije sile - površinska napetost kapljice koja pokušava zadržati sferni oblik i Coulombova odbojna sila. Po izlasku iz metalne kapilare, otapalo isparava primjenom visoke temperature, a nabijene kapljice neprestano se smanjuju sve dok ne dosegnu tzv. Rayleighovu granicu, tj. do trena kada se površinska napetost više ne može suprotstaviti Coulombovoj sili pa se kapljice raspadaju na mnoštvo manjih, tvoreći u konačnici ionizirani analit u plinovitoj fazi (Banerjee i Mazumdar, 2012). Tandemska spektrometrija masa sadrži barem dva povezana masena analizatora, kvadrupola, koje odvaja kolizijska ćelija. Kvadrupolni analizator se sastoji od četiri elektrode suprotnih naboja. Na osnovu specifičnog omjera mase i naboja ( $m/z$ ) samo određeni ioni mogu zadržati putanju i proći analizator. Prošavši kroz prvi kvadrupol, ioni odabranog omjera  $m/z$  se u kolizijskoj ćeliji bombardiraju inertnim plinom i dodatno fragmentiraju prije nego prođu kroz drugi analizator. Takav način omogućuje ispitivanje fragmenata pojedinih iona u smjesi, a postupak se može ponoviti i do nekoliko puta u svrhu dobivanja što preciznijih očitavanja (Mittal, 2015; Cindrić i sur., 2009).

U masenoj spektrometriji široko je rasprostranjena uporaba internih standarda (IS) za postizanje točnih i pouzdanih kvantitativnih rezultata. Osim što korigiraju odstupanja nastala tijekom pripreme uzorka, koriste se za kompenziranje varijacija u intenzitetu signala uslijed supresije iona koja može utjecati na učinkovitost ionizacije, a uzrokovana je komponentama matrice (Jeanne Dit Fouque i sur., 2018). Stupanj supresije iona također ovisi o kemijskoj strukturi analita što znači da ako analit i interni standard nisu dovoljno slični u strukturi, rezultati se mogu razlikovati. Iz tog su razloga interni standardi u kvantitativnim bioanalitičkim LC-MS/MS analizama strukturni analozi analita ili analozi analita obilježeni stabilnim izotopom (Stokvis i sur., 2005).

Primjena ovakve tehnologije u kliničkim laboratorijima sve je više zastupljena i ulazi u svakodnevnu rutinu. Tandemska spektrometrija masa omogućuje brzo mjerenje velikog broja metabolita iz uzorka suhe kapi krvi ili izravno iz bioloških tekućina. Odlikuje se visokom osjetljivošću i specifičnošću, a sposobnost detekcije i mjerenja metabolita s vrlo niskom molekularnom masom u vrlo niskim rasponima koncentracija unaprijedilo je mnoge analize. Osim u laboratorijskoj dijagnostici primjenjuje se u farmaceutskoj industriji, kliničkoj mikrobiologiji, fitokemiji, sudskoj medicini i istraživanjima u području -omika (genomika, proteomika, metabolomika...) (Sharmin i Zafar, ured., 2017; Ombrone i sur., 2015).

### 1.5. Kratka analitička validacija kvantitativnih metoda

Kako bi se smanjila mogućnost analitičke pogreške i osiguralo permanentno izdavanje brzih, točnih i pouzdanih rezultata laboratorijskih pretraga, laboratoriji trebaju ispuniti definirane standarde kvalitete. Za medicinsko-biokemijske laboratorije u Republici Hrvatskoj akreditacijski zahtjevi kvalitete usklađeni su s međunarodnom normom ISO 15189:2012, a propisuje ih Hrvatska komora medicinskih biokemičara (HKMB) temeljem javnih ovlasti (Pašalić, ured., 2018; Galjanić i sur., ured., 2010). Proces akreditacije obuhvaća upravljačke i tehničke sposobnosti laboratorija, a uključuje postupak validacije metode, verifikaciju i osiguranje kvalitete. Primarna svrha validacije i verifikacije metode je procjena pogreške, to jest utvrđivanje svih mogućih pogrešaka u rezultatima te u kojoj mjeri one mogu utjecati na klinička tumačenja (Abdel i El-Masry, 2021).

Validacija metode je postupak kojim se dokazuje da je određena metoda prikladna za namjeravanu uporabu i najčešće ju izvodi proizvođač. Svakoj metodi pristupa se individualno te ovisno o vrsti metode i je li ona kvalitativna ili kvantitativna, razlikuju se postupci ispitivanja (Lazarić, 2012). Verifikacija se u radnim uvjetima laboratorija provodi za već validirane metode kako bi se potvrdila prikladnost i primjenjivost postupka. Na primjer, izvodi se uoči prve upotrebe validirane metode u laboratoriju ili kod promjene nekih uvjeta u laboratoriju koji utječu na metodu. Najprije ide upoznavanje s analitičkim sustavom, a potom slijedi ispitivanje izvedbenih značajki validacije ili verifikacije, od kojih su neke: procjena točnosti i preciznosti, linearnost, analitička osjetljivost, referentni intervali i ako je moguća, usporedba (Grgić, 2019; Topić i sur., 2015). Kriteriji prihvatljivosti unaprijed su definirani i opravdani u planu validacije ili verifikacije (Roelofsen-de Beer i sur., 2020).

Preciznost je bliskost slaganja između ponovljenih rezultata mjerenja dobivenih iz istog homogenog uzorka pod određenim uvjetima, a razlikuju se preciznost u seriji (ponovljivost) i međupreciznost (Lazarić, 2012). Točnost predstavlja bliskost slaganja rezultata između izmjerene vrijednosti i stvarne vrijednosti. Numerički se izražava kao procjena sustavne pogreške (engl. *bias*), a izračunava se razlikom između srednjeg rezultata ispitivane metode i vrijednosti dobivene usporednom metodom ili poznate vrijednosti certificiranog referentnog materijala. Linearnost se definira kao raspon koncentracija u kojemu postoji izravan proporcionalni odnos između koncentracije analita i mjernog signala. Izvedbene karakteristike metode koje opisuju najnižu koncentraciju mjerne veličine koja se može pouzdano izmjeriti analitičkim postupkom obuhvaćene su pojmom analitička

osjetljivost, i to su granica slijepe probe (engl. *limit of blank*, LOB), granica detekcije (engl. *limit of detection*, LOD) i granica kvantifikacije (engl. *limit of quantitation*, LOQ) (Pum, 2019). Ukoliko se referentni intervali ne preuzimaju iz literature ili od proizvođača zbog njihove neprikladnosti, provjera se vrši ispitivanjem 20 referentnih pojedinaca iz populacije kojoj je referentni interval namijenjen. U slučaju da manje od 10% ispitanika ima vrijednosti izvan prethodno utvrđenog intervala, interval se prihvaća ili u suprotnome, postupak se mora ponoviti (Topić i sur., 2015). Usporedivost je slaganje rezultata dobivenih za određeni analit korištenjem različitih mjernih postupaka; različitih metoda ili različitih instrumenata. Za usporedbu kvantitativnih metoda neke od preporučenih statističkih analiza su Passing-Bablokova regresija i Bland-Altmanov dijagram (Abdel i El-Masry, 2021; Pum, 2019).

Postupkom kratke analitičke validacije dobiveni rezultati uspoređuju se s kriterijima prihvatljivosti. Za određivanje biomarkera iz uzorka suhe kapi krvi, spomenuti kriteriji prihvatljivosti preuzeti su iz literature te za procjenu nepreciznosti i točnosti iznose  $\leq 15\%$ , odnosno  $< \pm 15\%$  (Moat i sur., 2020).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Određivanje homocisteina do sada je bilo moguće jedino iz uzorka plazme. Međutim zbog niza predanalitičkih čimbenika (pripremu pacijenta, venepunkciju, centrifugiranje unutar jednog sata od uzimanja uzorka, dostava uzoraka u laboratorij u preporučenom vremenu i pod određenim uvjetima) uzorak suhe kapi krvi pokazao se bitno praktičniji za rutinsko određivanje homocisteina.

Prije uvođenja nove metode u rutinski rad laboratorija potrebno je provesti postupak kratke analitičke validacije (verifikacije) čime bi se potvrdile analitičke značajke metode dane od strane proizvođača.

Cilj ovoga rada je provesti kratku verifikaciju određivanja homocisteina u uzorku suhe kapi krvi primjenom tandemske spektrometrije masa. U tu svrhu ispitani su sljedeći parametri: preciznost (ponovljivost i međupreciznost), točnost, analitička osjetljivost (LOB i LOD) i usporedivost.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Uzorci pacijenata

U ovom radu su korišteni uzorci suhe kapi krvi 30 ispitanika u dobi 1-76 godina, od toga 12 muških i 18 ženskih. Uzorci suhe kapi krvi dobiveni su kapanjem 60 µL EDTA krvi na standardizirani sterilni filtarski papir Whatman903®.

#### 3.2. Materijali

Za izračun preciznosti i točnosti korišteni su komercijalni kontrolni uzorci ClinCheck® -Control (MS2182) njemačke tvrtke Recipe dostupni u dvije koncentracijske razine.

Tablica 1. Koncentracijsko područje komercijalnih kontrolnih uzoraka (MS2182)

<b>KONTROLA LOT 1329</b>	<b>METODA ANALIZE</b>	<b>SREDNJA VRIJEDNOST KONCENTRACIJE [µmol/L]</b>	<b>KONCENTRACIJSKO PODRUČJE [µmol/L]</b>
<b>Razina I</b>	LC-	18.0	12.6 - 23.4
<b>Razina II</b>	MS/MS	44.5	31.2 - 57.9

Pomoću seta kalibratora ClinCal® - Calibrator (MS2113) njemačke tvrtke Recipe vrši se kalibracija analitičkog sustava. Set je dostupan u četiri koncentracijske razine, a kalibratori su dobiveni koristeći humanu svježnu krv nakapanu na standardizirani filtarski papir.

Kontrole i kalibratori za analizu pripremaju se jednako kao i uzorci pacijenata.

Tablica 2. Koncentracijsko područje kalibratora (MS2113)

<b>KALIBRATOR LOT 1329</b>	<b>METODA ANALIZE</b>	<b>KONCENTRACIJA [µmol/L]</b>
<b>Razina 0</b>	LC- MS/MS	10.0
<b>Razina 1</b>		15.7
<b>Razina 2</b>		32.0
<b>Razina 3</b>		44.8

Tijekom provođenja analize korišten je ClinSpot® komercijalni komplet reagensa njemačke tvrtke Recipe namijenjen za kvantitativno određivanje ukupne koncentracije homocisteina u uzorku suhe kapi krvi tehnologijom tandemске spektrometrije masa.

### *3.2.1. Kemikalije*

Komplet reagensa tvrtke Recipe ClinSpot® za kvantitativno određivanje ukupne koncentracije homocisteina u uzorku suhe kapi krvi (MS2100).

Sadržaj kompleta reagensa:

- Otopina za ispiranje, MS2005
- Mobilna faza, MS2010
- Interni standard (IS), liofilizirani, MS2112
- Reagens A za redukciju, MS2021
- Reagens B za precipitaciju, MS2022

### *3.2.2. Oprema i uređaji*

- Mjerni instrument: HPLC (Nexera) –MSMS (8050), (Shimadzu; Shimadzu)
- Eppendorf epruvete
- Varijabilne automatske pipete i nastavci: 10-100 µL; 20-200 µL
- Staklene bočice s mikroinsertima za uzorkovanje (Thermo Scientific, Chromacol 03-FISV, 300 µL)
- Ručni uređaj za izrezivanje isječaka uzoraka suhe kapi krvi na filtarskom papiru (promjera 3.1 milimetar)
- Vrtložna miješalica Biosan
- Tresilica Biosan
- Mikrocentrifuga Eppendorf 5430

## *3.3. HPLC- MS/MS metoda*

### *3.3.1. Predanalitička faza*



Za dobivanje uzorka suhe kapi krvi u svrhu određivanja homocisteina koristila se venska krv s K3-EDTA kao antikoagulansom. Uzorkovanje je izvedeno prema međunarodnim CLSI (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) smjernicama (Instruction Manual, 2018). Uzorci suhe kapi krvi pohranjeni su na temperaturi 2 – 8 °C do analize.

a. Priprema uzorka

Priprema uzorka uključivala je: redukciju analita kako bi se svi oblici homocisteina preveli u slobodni homocistein, dodavanje internog standarda radi identifikacije šiljka homocisteina i taloženje proteina. Budući da se uzorci suhe kapi krvi trebaju zaštititi od vlage, ohlađeni uzorci najprije se temperiraju do sobne temperature zbog kondenzirane vode.

Interni standard koji se koristi za određivanje homocisteina je d8-homocistein, no kako dolazi do redukcije prilikom pripreme uzorka detektira se kao d4-homocistein. Liofilizirani interni standard potrebno je otopiti u 5,0 mL HPLC vode te lagano miješati, a alikvoti se zamrzavaju i skladište na -18°C.

Reagens A unutar ClinSpot ® komercijalnog kompleta reagensa dolazi u bočici u obliku liofilizata. Prije upotrebe potrebno je pripremiti redukcijsku otopinu dodavanjem 5,0 mL HPLC vode u bočicu s proizvodom te pričekati dok se potpuno ne otopi (približno pet minuta) uz povremeno, lagano rotiranje bočice. Pohranjuje se na 2 – 8°C te je stabilan do četiri tjedna pri toj temperaturi. Reagens B u kompletu dolazi u obliku otopine i služi za precipitaciju, a pohranjuje se na sobnoj temperaturi.

Za pripremu uzorka najprije sam obilježila Eppendorf epruvete oznakama uzoraka i posložila ih u stalak za epruvete. U svaku Eppendorf epruvetu ubacila sam isječak suhe kapi krvi promjera 3.1 milimetar dobiven pomoću ručnog uređaja za uzimanje isječaka suhe kapi krvi na filtarskom papiru te dodala 15µL internog standarda i 15µL reagensa A. Potom sam svaku epruvetu držala po 30 sekundi na vrtložnoj miješalici kako bi se sadržaj epruvete izmiješao. Za precipitaciju sam u svaki reducirani uzorak dodala 100 µL reagensa B te stavila da se miješa deset minuta na tresilici, a zatim premjestila epruvete u centrifugu i podesila da se centrifugira pet minuta na 3 000 x g. Supernatant sam odvojila od taloga i prenijela u prethodno označene bočice iz kojih automatski dio za uzorkovanje (engl. *Autosampler*) na LC-MS/MS uzima po 1 µL uzorka u postupak.

### 3.3.2. Analitička faza

Analiza pripremljenih uzoraka provedena je na sustavu tekućinske kromatografije visokog učinka-tandemske spektrometrije masa (HPLC-MS/MS, engl. *high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry*), Nexera –LCMSMS 8050, Shimadzu na Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku KBC-a Zagreb.

Nakon odabiranja željene metode i ispiranja sustava, potrebno je postaviti kolonu (paziti da strelica koja označava smjer bude okrenuta u pravom smjeru) i ekvilibrirati ju s protokom 0,7mL/min s 5 mL mobilne faze. Nakon ekvilibriranja kolone i uspostavljanja svih potrebnih uvjeta na LC-MS/MS-u može se pokrenuti analiza uzoraka. Prilikom analize uzorka, potrebno je pratiti i zabilježiti kromatografske uvjete. Potrebni kromatografski uvjeti navedeni su u Tablici 3.

Tablica 3. Potrebni kromatografski uvjeti (vrijeme, pritisak (bar/psi), protok u mL/min)

<b>Minute</b>	<b>Pritisak</b>	<b>Pumpa A</b>
0 min	98 bar ~ 1421 psi	A=0.700
1 min	98 bar ~ 1421 psi	A=0.700

Nakon kromatografskog razdvajanja pomoću HPLC-a analiti se ioniziraju elektrosprej ionizacijom (ESI). Tijekom ESI uzorci se prevode u plinovito stanje. Na LC-MS/MS-u postoji mogućnost primjene različitih modova rada, ovisno o načinu fragmentacije ioniziranih analita. MRM (engl. *Multiple Reaction Monitoring*) mod rada odabire ione određenog omjera mase i naboja ( $m/z$ ) (engl. *Precursor ions*) (Tablica 4. Prijelazi masa) i propušta samo njih u prvom kvadrupolu. Nakon prvog kvadrupola dolaze do kolizijske ćelije gdje se ioni dodatno fragmentiraju pomoću inertnog plina. Nastali fragmenti određenog  $m/z$  (engl. *Product ions*) (Tablica 4. Prijelazi masa) prolaze kroz kvadrupol i padaju na detektor. Svaki nastali ionizirani fragment karakteriziran je specifičnim retencijskim vremenom.

Tablica 4. Prijelazi masa

<b>Analit</b>	<b>Precursor ions</b>	<b>Product ions</b>
Homocistein (Quantifier)	136.1	90.1
Homocistein (Qualifier)	136.1	56.1
Homocistein – d4 (Quantifier)	140.1	94.1

### 3.3.3. Poslijeanalitička faza

Program LabSolutions automatski izrađuje kalibracijsku krivulju iz koje izračunava koncentraciju homocisteina u svakom uzorku. Na osnovu dobivenih podataka određeni su sljedeći parametri validacije: preciznost u seriji (ponovljivost), preciznost iz dana u dan (međupreciznost), točnost, analitička osjetljivost i usporedba koncentracija homocisteina u uzorku suhe kapi krvi i plazme.

### 3.4. Statistička obrada podataka

Statistička obrada podataka napravljena je pomoću računalnih programa *Microsoft Office Excel 365* i *MedCalc*.

#### 3.4.1. Preciznost

Preciznost je određena mjerenjem kontrolnih uzoraka proizvođača u dvije koncentracijske razine (ukupno dva uzorka) u petroplikatu kroz pet dana što daje 25 rezultata za svaki uzorak. Razlikujemo preciznost u seriji (ponovljivost) i preciznost iz dana u dan (Topić i sur., 2015).

Za procjenu preciznosti potrebno je izračunati standardnu devijaciju ( $s$ ) koja označava mjeru varijabilnosti pokazuje prosječno odstupanje rezultata od aritmetičke sredine te koeficijent varijabilnosti ( $K_v$ ) koji govoreći o odnosu standardne devijacije prema aritmetičkoj sredini nudi mogućnost usporedbe varijabilnosti dvaju skupova podataka (Šimundić, 2006). Formule prema kojima se računa aritmetička sredina, standardna devijacija i koeficijent varijacije su sljedeće:

$$\bar{x} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N x_i \quad (1)$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}} \quad (2)$$

$$K_v = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100\% \quad (3)$$

a. Ponovljivost (preciznost u seriji)

Ponovljivost se procjenjuje preko skupne standardne devijacije, tj. ukupnog standardnog odstupanje za 5 dana ( $S_r$ ) i koeficijenta varijacije.

$$\bar{\bar{x}} = \frac{1}{D} \sum_{i=1}^D \bar{x}_i \quad (4)$$

$$S_r = \sqrt{\frac{s_1^2 + s_2^2 + s_3^2 + s_4^2 + s_5^2}{D}} \quad (5)$$

$$K_v = \frac{S_r}{\bar{\bar{x}}} \cdot 100\% \quad (6)$$

Pritom je  $D$  ukupan broj dana,  $s_1, s_2, s_3, s_4, s_5$  su standardna odstupanja za svaku seriju od pet mjerenja, a  $\bar{\bar{x}}$  je srednja vrijednost svih srednjih vrijednosti mjerenja kroz 5 dana (engl. *grand mean*).

b. Međupreciznost (preciznost iz dana u dan)

Međupreciznost se procjenjuje izračunom standardne devijacije aritmetičkih sredina dobivenih za svaki dan (seriju) mjerenja ( $S_b$ ) te koeficijenta varijacije.

$$S_b = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D (\bar{x}_d - \bar{\bar{x}})^2}{D - 1}} \quad (7)$$

$$K_v = \frac{S_b}{\bar{\bar{x}}} \cdot 100\% \quad (8)$$

### 3.4.2. Točnost

Za određivanje točnosti korišteni su komercijalni kontrolni uzorci; dva referentna materijala poznate koncentracije te su analizirani u peteroplikatu u pet serija. Točnost se procjenjuje usporedbom dobivenih rezultata s ciljnim vrijednostima kontrola danih od strane proizvođača. Međusoban odnos prikazuje se kroz apsolutno i relativno odstupanje (engl. *bias*) izračunato prema sljedećim formulama:

$$bias(abs) = |\bar{\bar{x}} - x_c| \quad (9)$$

$$bias(rel) = \left| \frac{\bar{\bar{x}} - x_c}{x_c} \right| \cdot 100\% \quad (10)$$

gdje  $x_c$  označava ciljnu koncentraciju analitu dobivenu od proizvođača čije su kontrole korištene, a  $\bar{\bar{x}}$  predstavlja srednju vrijednost svih srednjih vrijednosti mjerenja kroz 5 dana (engl. *grand mean*).

### 3.4.3. Analitička osjetljivost

Donja analitička granica mjernog područja verificira se kada je od dijagnostičke važnosti.

a. Granica slijepe probe (engl. *limit of blank*, LOB)

Granica slijepe probe je najveća prepoznatljiva koncentracija analita koja se očekuje naći prilikom mjerenja uzoraka koji ne sadrže analit. Uzorak slijepe probe analizira se u 10 ponovljenih mjerenja. Kao uzorak za određivanje LOB-a korišten je prazan isječak standardiziranog filtarskog papira.

Najprije je potrebno izračunati aritmetičku sredinu i standardnu devijaciju ( $s$ ) slijepe probe prema formulama 1 i 2, a potom se LOB računa prema sljedećoj formuli (Armbruster i Pry, 2008):

$$LOB = \bar{x}_{slijepe\ probe} + 1,645 \cdot s_{slijepe\ probe} \quad (11)$$

b. Granica detekcije (engl. *limit of detection*, LOD)

Granica detekcije je najniža koncentracija analita koja se može detektirati, tj. pouzdano razlikovati od šuma bazne linije spektra. U kromatografiji, prema omjeru signala i šuma (S/N), granicom detekcije smatra se injektirana količina analita koja rezultira šiljkom koji je najmanje dva do tri puta viši od šuma bazne linije (S/N = 3).

LOD se određuje korištenjem izmjerenog LOB-a prema sljedećoj formuli:

$$LOD = LOB + 3 \cdot s_{slijepe\ probe} \quad (12)$$

#### 3.4.4. Linearnost

Linearnost se procjenjuje tako da se najmanje pet uzoraka različitih i poznatih koncentracija razrjeđuje i mjeri u duplikatu. Zatim je potrebno konstruirati dijagram raspršenja i linearnu regresiju u odnosu na koncentraciju pri čemu su srednje izmjerene vrijednosti nanosene na os apscisu, a očekivane vrijednosti na os ordinatu. Osim vizualne procjene, analiziraju se podatci o nagibu, presjeku i koeficijentu korelacije (Abdel i El-Masry, 2021; Theodorsson, 2012).

### 3.4.5. Usporedivost

Cilj usporedivosti je procijeniti razliku između dviju metoda te ako je ona mala i klinički prihvatljiva obje se metode mogu koristiti istovremeno. Za statističku obradu rezultata u usporedbi koncentracija homocisteina u uzorku suhe kapi krvi i plazme najprije je ispitana normalnost razdiobe podataka te su korišteni Wilcoxonov test, Spearmanova korelacija i Passing-Bablok regresija.

Normalnost razdiobe može se ispitati vizualnom procjenom nakon izrade histograma frekvencije ili računski pomoću statističkih testova kao što su Kolmogorov-Smirnovljev test ili Shapiro-Wilkov test. Takav podatak važan je pri odabiru statističkog testa jer normalno raspodjeljene skupine rezultata testiraju se parametrijskim testovima, a raspodjele koje nisu normalne testiraju se neparametrijskim testovima. Normalna (Gaussova) razdioba je kontinuirana, simetrična u odnosu na aritmetičku sredinu, zvonolikog oblika te nikad ne dodiruje os  $x$ . Definirana je aritmetičkom sredinom ( $\bar{x}$ ) i standardnom devijacijom ( $s$ ) što znači da u slučaju normalne raspodjele podataka, 68 % svih rezultata nalazi se unutar intervala  $\bar{x} \pm 1s$ , dok interval s dvije standardne devijacije obuhvaća 95 % svih rezultata (Šimundić, 2006).

Wilcoxonov test (engl. *Wilcoxon Signed Rank test* ili *paired samples Wilcoxon test*) je neparametarski statistički test koji ispituje postoji li statistički značajna razlika između skupova parova međusobno zavisnih uzoraka. Koristi se za usporedbu dva skupa rezultata od istih sudionika te kao alternativa parnom t-testu kada raspodjela podataka nije normalna. Također mnogo je robusniji u odnosu na stršeće vrijednosti, a nulta hipoteza mu je da su medijani dvaju uzoraka jednaki (<https://www.statisticssolutions.com/>). Ukoliko je P vrijednost mala ( $P < 0,05$ ), tada se tumači da se razlika između skupova parova statistički značajno razlikuje od nule (0). (<https://www.medcalc.org/>). U biomedicinskim istraživanjima za određivanje statističke značajnosti najčešće se uzima prag od 0,05 što znači da postoji 5 % šanse da će rezultat koji podržava hipotezu biti neistinit u cijeloj populaciji (Serdar i sur., 2021).

Spearmanov koeficijent korelacije ili korelacija ranga je neparametarska korelacija koja se koristi kada su podatci kategorički ili numerički ali odstupaju od normalne razdiobe. Temelji se na uspoređivanju rangova i nije osjetljiva na stršeće vrijednosti, a može se računati i na manjim uzorcima ( $N < 35$ ). Vrijednosti blizu -1 ili +1 predstavljaju značajniju povezanost

od vrijednosti bliže nuli, dok dobivena nula (0) ukazuje na to da povezanosti među varijablama uistinu nema (Udovičić i sur., 2007). Postojanje korelacije između ispitivanih varijabli ujedno je jedan od uvjeta za izračunavanje regresije.

Passing-Bablok regresija daje informaciju o slaganju dviju analitičkih metoda i mogućoj sustavnoj pogrešci između njih. Ovakva regresijska analiza nije ovisna o vrsti raspodjele i nije osjetljiva na stršće vrijednosti. Preduvjeti su kontinuirano distribuirani podatci, tj. da pokrivaju širok raspon koncentracija i linearan odnos između izmjerenih podataka. Rezultati uključuju dijagram raspršenja s pravcem regresije te jednadžbu regresijske linije ( $y = a + bx$ ) iz dva skupa podataka koja otkriva konstanto i proporcionalno odstupanje. Ukoliko interval pouzdanosti od 95 % (95 % CI) za odsječak  $a$  na pravcu ne uključuje vrijednost nula (0), postoji konstantna razlika između metoda. Odnosno, ako 95 % CI za nagib  $b$  regresijske linije ne uključuje vrijednost jedan (1) to ukazuje na proporcionalnu razliku među metodama (Bilić-Zulle, 2011).

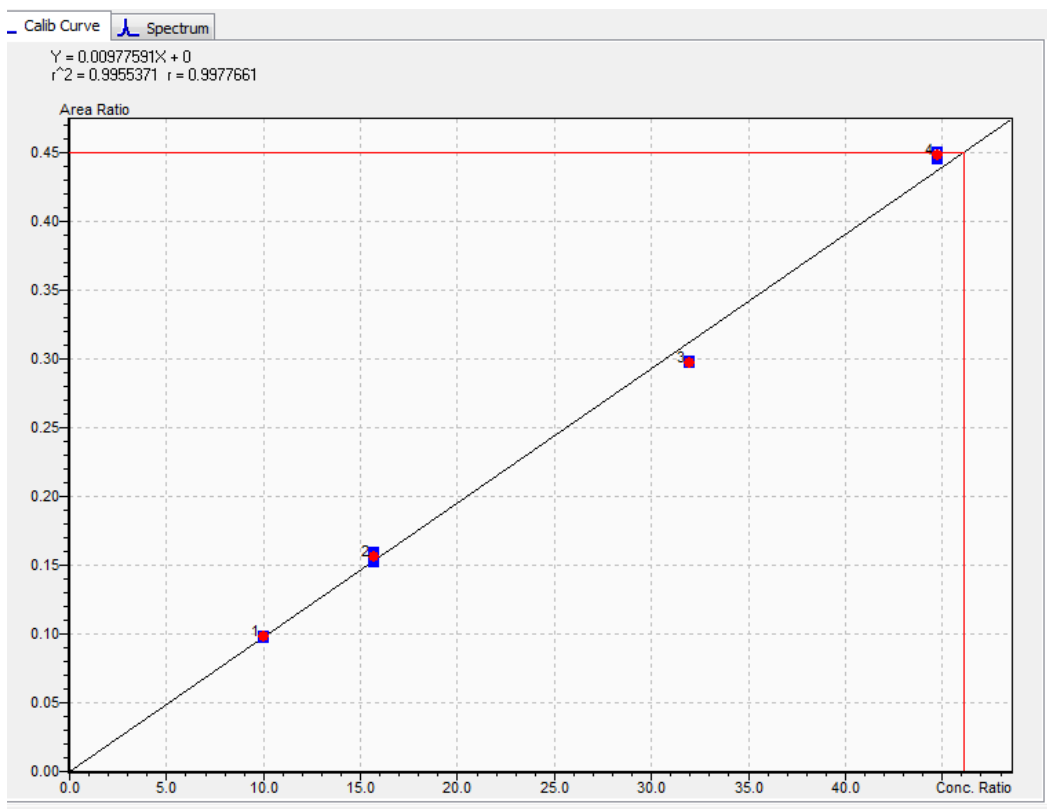


## 4. REZULTATI I RASPRAVA

### 4.1. REZULTATI

#### 4.1.1. Izrada kalibracijske krivulje

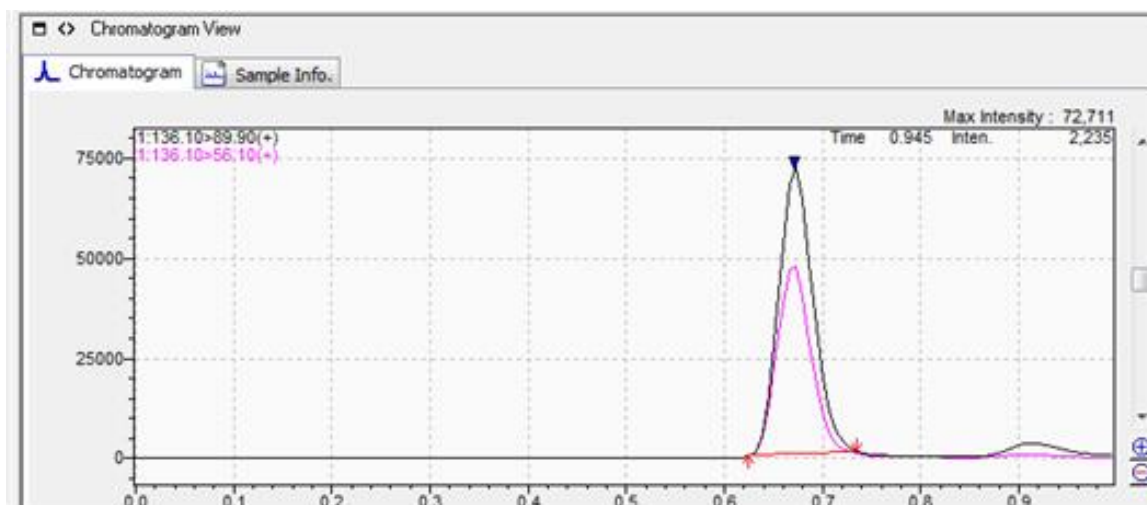
Program LabSolution analizatora Nexera –LCMSMS 8050, tvrtke Shimadzu pomoću uzoraka poznatih koncentracija (kalibracijskih standarda) i modelom linearne regresije automatski izrađuje kalibracijsku krivulju temeljem koje se kvantitativno određuje analit od interesa. Osnovu kvantifikacije čini usporedba omjera površina ispod vršaka analita, u ovom slučaju homocisteina, i površina odgovarajućeg internog standarda (Zhao Y i sur., 2014; Seger i Griesmacher, 2007).



Slika 2: Prikaz kalibracijske krivulje za homocistein.

Jednadžba kalibracijskog pravca:  $Y = (0.00977591)X + 0$

$R^2 = 0.997$ , pri čemu R označava koeficijent korelacije te zadovoljava kriterij prihvatljivosti ( $R > 0,995$ )



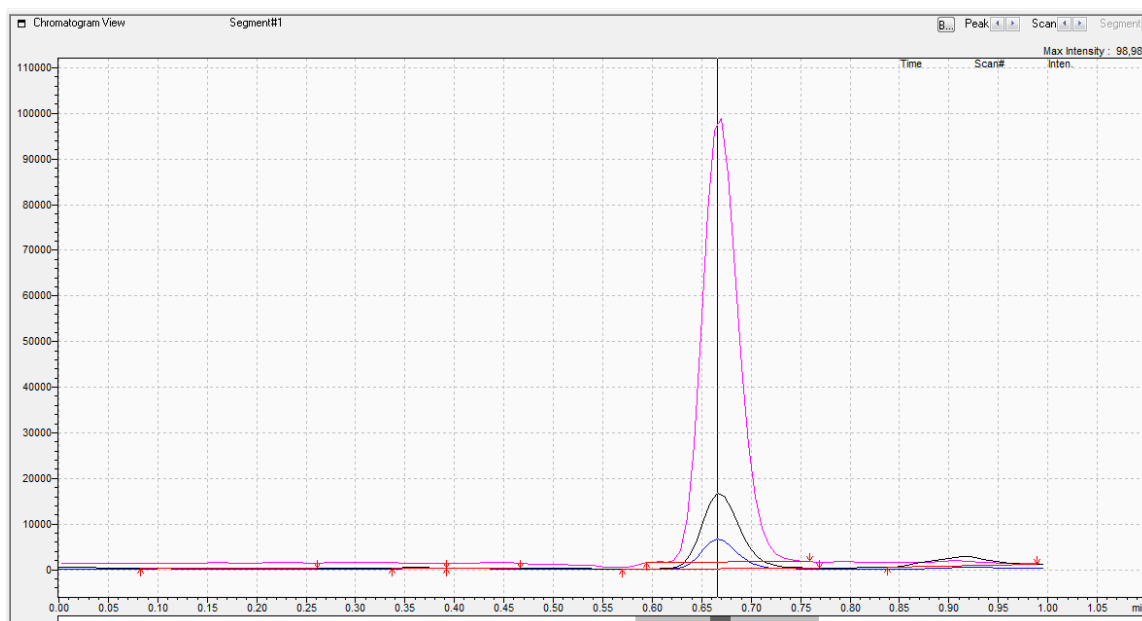
*Slika 3: Kromatogram s dva vrška*

Na slici broj 3 nalazi se kromatogram s dva vrška. Vršak crne boje označava prijelaz 136.1 → 89.90 i služi za identifikaciju i kvantifikaciju homocisteina, a vršak roze boje označava prijelaz 136.1 → 56.1 i služi za identifikaciju homocisteina u uzorku pacijenata.



*Slika 4: Kromatogram internog standarda homocisteina*

Na slici broj 4 prikazan je kromatogram internog standarda homocisteina, prijelaz 140.1 → 94.1, i koristi se za identifikaciju homocisteina u uzorku pacijenata.



Slika 5: Kromatogram dobiven analizom uzorka homocisteina iz suhe kapi krvi

#### 4.1.2. Procjena preciznosti, točnosti, analitičke osjetljivosti i linearnosti

Rezultati za izračun preciznosti, točnosti i analitičke osjetljivosti dobiveni su sljedeći proceduru za određivanje homocisteina u uzorku suhe kapi krvi tandemskom spektrometrijom masa koja je opisana u poglavlju 3.3. *HPLC- MS/MS metoda*. Vrijednosti su prikazane tablično. Korišten je program *MS Office Excel 365* kako je opisano u poglavlju 3.4. *Statistička obrada podatka*.

##### a. Preciznost

Za izračun sljedećih vrijednosti u sklopu procjene preciznosti korištene su formule 1-8 navedene u poglavlju 3.4. *Statistička obrada podataka*.

Tablica 5. Rezultati procjene preciznosti korištenjem kontrole *ClinCheck*® - *Control level 1* u peteroplikatu tijekom pet dana.

dan	1	2	3	4	5
mjerenje 1	17.114	18.328	16.105	20.724	20.785
mjerenje 2	18.307	21.278	15.352	20.078	23.100
mjerenje 3	19.465	16.545	16.856	18.069	22.424

<b>mjerenje 4</b>	19.109	17.948	16.331	19.850	20.714
<b>mjerenje 5</b>	18.722	16.934	16.695	16.847	20.271

Izračun

$\bar{x}$	18.5434	18.2066	16.2678	19.1136	21.4588
$\bar{\bar{x}}$	18.7180				
S	0.9083	1.8638	0.5911	1.6042	1.2293

Nepreciznost u seriji (ponovljivost)

$S_r$	1.3216
$K_v$	<b>7.0606 %</b>

Nepreciznost između serija/ iz dana u dan (međupreciznost)

$S_b$	1.8684
$K_v$	<b>9.9819 %</b>

Za kontrolni uzorak *ClinCheck*® - *Control* razina 1 nepreciznost u seriji iznosi **7,0606 %**, a nepreciznost iz dana u dan **9,9819 %**. Rezultati dobiveni kratkom analitičkom validacijom unutar su kriterija prihvatljivosti za nepreciznost kod određivanja iz uzorka suhe kapi krvi ( $\leq 15 \%$ ).

Tablica 6. Rezultati procjene preciznosti korištenjem kontrole *ClinCheck*® - *Control level 2* u peteroplikatu tijekom pet dana.

<b>dan</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>mjerenje 1</b>	39.200	43.291	42.663	46.536	44.925
<b>mjerenje 2</b>	42.255	40.976	41.745	48.869	47.237
<b>mjerenje 3</b>	40.793	40.009	41.879	44.019	45.758
<b>mjerenje 4</b>	41.566	38.298	38.558	46.572	51.355
<b>mjerenje 5</b>	38.946	38.841	38.741	46.636	54.643

Izračun

$\bar{x}$	40.5520	40.2830	40.7172	46.5264	48.7836
$\bar{\bar{x}}$	43.3724				
S	1.4486	1.9763	1.9209	1.7168	4.1043

Nepreciznost u seriji (ponovljivost)

$S_r$	2.4284
$K_v$	<b>5.5990 %</b>

Nepreciznost između serija/ iz dana u dan (međupreciznost)

$S_b$	3.9931
$K_v$	<b>9.2064 %</b>

Za kontrolni uzorak *ClinCheck*® - *Control* razina 2 nepreciznost u seriji iznosi **5,599 %**, a nepreciznost iz dana u dan **9,2064 %**. Dobiveni rezultati su unutar kriterija prihvatljivosti za nepreciznost kod uzorka suhe kapi krvi ( $\leq 15 \%$ ).

b. Točnost

Za izračun sljedećih vrijednosti upotrijebljene su formule 9 i 10 navedene u poglavlju 3.4. *Statistička obrada podataka*.

Tablica 7. Rezultati procjene točnosti korištenjem kontrole *ClinCheck*® - *Control* u obje koncentracijske razine u peteroplikatu tijekom pet dana.

	Kontrola razina 1	Kontrola razina 2
$x_c$	18.0	44.5
$\bar{\bar{x}}$	18.7180	43.3724
<i>Bias (apsolutni)</i>	0.7180	1.1276
<i>Bias (relativni)</i>	<b>3.9891 %</b>	<b>2.5338 %</b>

Točnost, iskazana kroz odnos dobivene prema ciljnoj koncentraciji, za kontrolni uzorak *ClinCheck*® - *Control* razina 1 iznosi **3,9891 %**, a za kontrolni uzorak *ClinCheck*® - *Control* razina 2 iznosi **2,5338 %**. Dobiveni rezultati su unutar kriterija prihvatljivosti za točnost kod uzorka suhe kapi krvi ( $< +/- 15 \%$ ).

c. Analitička osjetljivost

Za izračun LOB-a i LOD-a korištene su formule 11 i 12 navedene u poglavlju 3.4.

*Statistička obrada podataka.*

Tablica 8. Rezultati procjene analitičke osjetljivosti; izračun LOB-a i LOD-a.

<b>broj replikata</b>	<b>koncentracija Hcy [<math>\mu\text{mol/L}</math>]</b>
1	0.309
2	0.049
3	0.094
4	0.769
5	0.023
6	0.036
7	0.034
8	0.032
9	0.014
10	0.016

$\bar{x}_{\text{slijepe probe}}$	0.138
$S_{\text{slijepe probe}}$	0.239
<b>LOB</b>	<b>0.530</b>
<b>LOD</b>	<b>1.247</b>

d. Linearnost

Referentni materijal korišten u verifikaciji nije imao dovoljno visoku koncentraciju homocisteina koju bi mogli razrijediti te nije bilo moguće odrediti gornju granicu mjernog područja. Stoga su podaci o linearnosti preuzeti od proizvođača (Instruction Manual, 2018).

Gornja granica analitičkog mjernog područja za mjerenje homocisteina u uzorku suhe kapi krvi navedena od strane proizvođača iznosi **104  $\mu\text{mol/L}$** .

#### 4.1.3. Usporedivost rezultata

Rezultati mjerenja koncentracije homocisteina u uzorku suhe kapi krvi dobiveni su prema postupku opisanom u poglavlju 3.3. *HPLC- MS/MS metoda* te uspoređeni s već izmjerenim vrijednostima koncentracije homocisteina u plazmi. Sve vrijednosti su prikazane tablično (Tablica 9.), a za statističku obradu podataka korišteni su programi *Microsoft Office Excel 365* i *MedCalc* kako je opisano u poglavlju 3.4. *Statistička obrada podatka*.

Tablica 9. Prikaz rezultata mjerenja homocisteina u uzorku suhe kapi krvi i plazme.

Redni broj uzorka	REZULTAT HCY	REZULTAT HCY
	DBS [ $\mu\text{mol/L}$ ]	plazma [ $\mu\text{mol/L}$ ]
1	5,1	11,3
2	6,9	12,2
3	5,2	7,8
4	6,4	8,3
5	3,0	6,6
6	57,3	58,5
7	8,2	10,5
8	3,9	5,2
9	7,6	9,9
10	6,9	10,5
11	11,3	12,0
12	12,5	8,9
13	14,2	12,1
14	13,8	11,6
15	6,8	5,1
16	8,1	6,7
17	24,9	26,0
18	9,2	6,6
19	13,0	13,4
20	9,4	10,9

21	5,4	10,8
22	8,4	15,9
23	1,4	6,0
24	5,2	10,4
25	9,2	17,8
26	5,6	10,0
27	4,1	10,1
28	3,8	7,7
29	2,9	7,2
30	2,7	5,4

a. Wilcoxonov test

Prije odabira statističkog testa za usporedbu dobivenih vrijednosti homocisteina u uzorku suhe kapi krvi i u plazmi, ispitana je normalnost raspodjele podataka. Svi podaci su zavisni i bročani, a temeljem vizualne procjene i pomoću Kolmogorov-Smirnovljeva testa utvrđeno je da koncentracije homocisteina izmjerene u uzorku suhe kapi krvi, kao i u plazmi, odstupaju od normalne razdiobe. Iz tog razloga, za ispitivanje razlike korišten je Wilcoxonov parni test (Slika 6 i Slika 7).

**Wilcoxon test (paired samples)**

Sample 1	HCYplazma	
Sample 2	HCYDBS	
	Sample 1	Sample 2
Sample size	30	30
Lowest value	5,1000	1,4000
Highest value	58,5000	57,3000
Median	10,2500	6,9000
95% CI for the median	7,8875 to 11,2300	5,2350 to 9,0600
Interquartile range	7,2000 to 12,0000	5,1000 to 9,4000

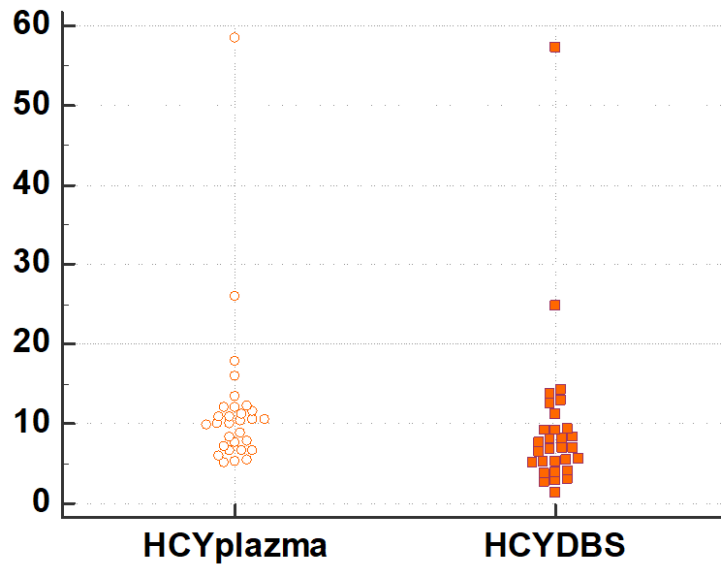
**Wilcoxon test (paired samples)**

Number of positive differences	6
Number of negative differences	24
Large sample test statistic Z	3,393776
Two-tailed probability	P = 0,0007

Slika 6: Wilcoxonov test usporedbe koncentracija homocisteina u uzorku suhe kapi krvi (DBS) i plazme

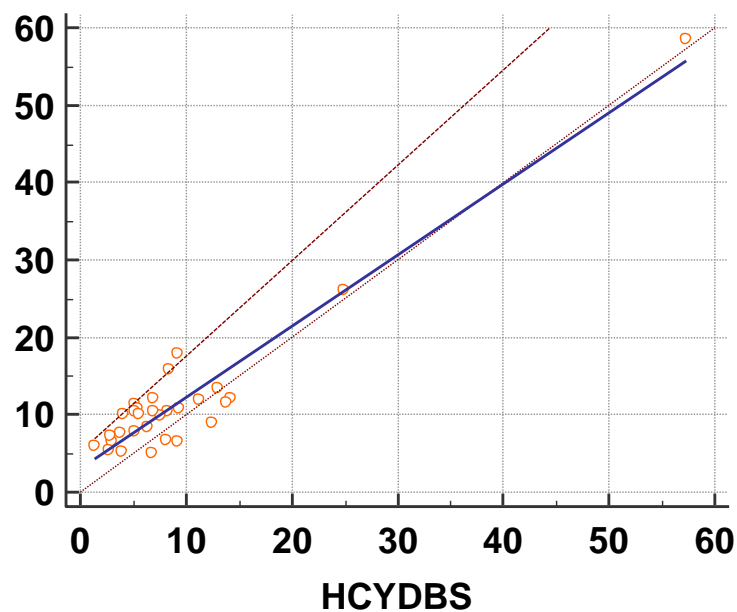


P vrijednost iznosi 0,0007. 95 % interval pouzdanosti za homocistein u plazmi iznosi 7,8875 – 11,2300, dok za homocistein u suhoj kapi krvi iznosi 5,2350 – 9,0600. Iako je P vrijednost manja od 0,05, intervali pouzdanosti ovih dvaju skupova podataka se preklapaju što ukazuje na nepostojanje statistički značajne razlike među njima.



Slika 7: Grafički prikaz koncentracije homocisteina u uzorku suhe kapi krvi i plazmi

b. Passing-Bablok regresijska analiza



Slika 8: Prikaz Passing-Bablokove regresijske analize

Na slici broj 8 prikazana je Passing-Bablokova regresijska analiza. Plavom linijom označena je regresijska linija, a iscrtkano područje predstavlja intervale pouzdanosti. Na osi x prikazane su vrijednosti homocisteina u uzorku suhe kapi krvi, a na y osi izmjerene vrijednosti homocisteina u plazmi.

Jednadžba pravca dobivena Passing-Bablokovom regresijskom analizom glasi:  $y = 3,067919 + 0,919075 x$ .

Intervali pouzdanosti od 95 % za odsječak  $a$  i nagib  $b$  prikazani su tablično (Tablica 10). Testom linearnosti (engl. *Cusum test for linearity*) ustanovljeno je da nema značajnijih odstupanja od linearnosti (P vrijednost = 0,91).

Tablica 10. 95 % CI za odsječak  $a$  i nagib  $b$  dobiveni Passing-Bablok regresijskom analizom

	<b>odsječak <math>a</math></b>	<b>nagib <math>b</math></b>
<b>srednja vrijednost</b>	3,0679	0,9191
<b>95 % CI</b>	0,9616 – 5,1710	0,6290 – 1,2326

95 %-tni interval pouzdanosti za odsječak  $a$  ne uključuje nulu (0) što upućuje na postojanje konstantnog odstupanja između rezultata, dok 95 %-tni interval pouzdanosti za nagib  $b$  uključuje vrijednost jedan (1) što znači da ne postoji proporcionalna razlika između rezultata.

#### c. Spearmanov koeficijent korelacije

Obzirom na mali broj uzoraka ( $N=30$ ,  $N < 35$ ) i na činjenicu da podaci ne prate normalnu razdiobu, korištena je Spearmanova korelacija. Spearmanov koeficijent korelacije iznosi **0,691** što ukazuje na umjerenu do dobru povezanost između metoda. Također dobivena P vrijednost manja je od 0,0001 ( $P < 0,0001$ ). Iz rezultata se može zaključiti postojanje pozitivne korelacije između dobivenih koncentracija homocisteina u uzorku suhe kapi krvi s koncentracijama homocisteina dobivenim u plazmi jer je P vrijednost manja od dozvoljenog praga ( $\alpha = 0,05$ ).

## 4.2. RASPRAVA

Glavne prednosti korištenja suhe kapi krvi (DBS) u odnosu na plazmu su manja invazivnost uzimanja uzorka, manji volumen krvi potreban za analizu, stabilnost uzorka, transport i skladištenje. Zbog navedenog uporaba suhe kapi krvi kao uzorka za određivanje homocisteina nudi kliničke, praktične i financijske prednosti u usporedbi s konvencionalnim metodama prikupljanja krvi. Korištenjem vezanog sustava tekućinske kromatografije visokog učinka sa spektrometrijom masa omogućena je rutinska analiza DBS uzoraka s visokom osjetljivošću i specifičnošću (Moat i sur., 2020; McCann i sur., 2003). Jedini nedostatak DBS-a je hematokrit za koji se samo pretpostavlja da je unutar referentnog intervala, stoga bi određivanje homocisteina u plazmi i dalje služilo za konačnu potvrdu rezultata.

Istraživanja pokazuju da su koncentracije mnogih analita, uključujući i homocistein, niže u uzorcima suhe kapi krvi u odnosu na plazmu (Moat i sur., 2020; McCann i sur., 2003). Razlike u koncentraciji su posljedica nekoliko čimbenika: raspodjele analita između plazme i eritrocita, pripreme i derivatizacije uzorka, učinkovitosti ekstrakcije iz DBS-a i metodoloških odstupanja u ispitivanju. Temeljem navedenog, neophodno je da klinički laboratoriji provedu validaciju/verifikaciju metoda suhe kapi krvi i plazme kako bi procijenili razliku u koncentraciji analita između ta dva uzorka i odredili referentne raspone (Moat i sur., 2020).

Cilj ovog rada bio je napraviti kratku analitičku validaciju metode određivanja homocisteina u uzorcima suhe kapi krvi u skladu s kriterijima upravljanja kvalitetom koji su propisani normom HR EN ISO 15189. Kratkom analitičkom validacijom ispitano je nekoliko analitičkih značajki metode: preciznost, točnost, analitička osjetljivost (LOB i LOD) i usporedba.

Rezultati ispitivanja preciznosti prikazani su kao nepreciznost u seriji (ponovljivost) i nepreciznost iz dana u dan (međupreciznost). Sve dobivene vrijednosti zadovoljavaju kriterije prihvatljivosti preuzete iz literature. Za interpretaciju rezultata potrebno je napomenuti kako preciznost ovisi isključivo o distribuciji slučajne pogreške koja je rezultat nesavršenog mjerenja i izvođenja analize te na daje informaciju o točnosti i stvarnoj koncentraciji analita u uzorku. Više vrijednosti standardnog odstupanja ( $s$ ) i koeficijenta varijacije ( $K_v$ ) ukazuju i na veću nepreciznost mjerenja. Dobiveni rezultati za točnost također su unutar navedenih kriterija prihvatljivosti. U nedostatku referentnog materijala dovoljno visoke koncentracije, gornja granica analitičkog mjernog područja preuzeta je od proizvođača (104  $\mu\text{mol/L}$ ), a za

donju granicu mjernog područja izračunate su granica slijepe probe (LOB) i granica detekcije (LOD) koje iznose 0,530  $\mu\text{mol/L}$ , odnosno 1,247  $\mu\text{mol/L}$ .

Za usporedbu koncentracija homocisteina u uzorku suhe kapi krvi i u plazmi koje su mjerene komercijalnim kompletom reagensa tvrtke Recipe® na tandemskom spektrometru masa tvrtke Shimadzu korišten je statistički test, Wilcoxonov parni test te Spearmanov koeficijent korelacije i Passing-Bablok regresija. Wilcoxonovim testom pokazano je da ne postoji statistički značajna razlika između ta dva skupa podataka što je zaključeno na osnovu preklapajućih intervala pouzdanosti od 95 % (95 % CI) dok je dobivena P vrijednost manja od 0,05. Korelacija ranga pokazuje statistički značajnu pozitivnu korelaciju ( $P < 0,05$ ), a dobivena vrijednost Spearmanovog koeficijenta korelacije upućuje na umjereno do dobro slaganje rezultata. Passing-Bablok regresijskom analizom dobivena je jednadžba pravca iz kojeg je vidljivo da 95 % CI za odsječak  $a$  ne uključuje nulu (0), a 95 % CI za nagib  $b$  uključuje jedinicu (1). Slijedom toga, utvrđeno je postojanje konstantnog odstupanja, ali nema proporcionalne razlike između rezultata. To je važan podatak za kliničku praksu prilikom tumačenja rezultata te kako se rezultati dobiveni iz različitih uzoraka ne bi longitudinalno uspoređivali.

Pregledom dostupnih literaturnih podataka, dobivene vrijednosti uspoređene su s rezultatima iz rada *Development of a novel approach for the second-tier estimation of homocysteine in dried blood spot using tandem mass spectrometry* (Varughese i sur., 2021: 32-37) u kojemu je ispitano kvantitativno određivanje homocisteina iz uzorka suhe kapi krvi tandemskom spektrometrijom masa. Rezultati su se pokazali sukladnima. Preciznost i točnost zadovoljavaju kriterije prihvatljivosti, a linearni raspon od 2  $\mu\text{mol/L}$  do 100  $\mu\text{mol/L}$  sličan je našim podacima. U navedenom radu nije učinjena usporedba rezultata DBS uzorka s plazmom.

## **5. ZAKLJUČAK**

Temeljem rezultata dobivenih kratkom analitičkom validacijom može se zaključiti da je metoda određivanja homocisteina u uzorcima suhe kapi krvi primjenjiva za rutinski rad. Navedena metoda koristit će se kao drugostupanjski test novorođenačkog probira na homocistinuriju.

## 6. LITERATURA

1. Abdel GMT, El-Masry MI. Verification of quantitative analytical methods in medical laboratories. *J Med Biochem*, 2021, 40(3), 225-236.
2. Alam SF, Kumar S, Ganguly P. Measurement of homocysteine: a historical perspective. *J Clin Biochem Nutr*, 2019, 65(3), 171-177.
3. Al Mutairi F. Hyperhomocysteinemia: Clinical Insights. *Journal of central nervous system disease*, 2020, 12, 1179573520962230.
4. Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev*, 2008, 29, S49-52.
5. Banarjee S, Mazumdar S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int J Anal Chem*, 2012, 2012, 282574, doi:10.1155/2012/282574.
6. 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 (Supl 1), 10-14.
7. Bilić-Zulle L. Comparison of method: Passing and Bablok regression. *Biochem Med*, 2011, 21, 49-52.
8. Cindrić M, Marković A, Horvatić A. Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene. *Medicina Fluminensis*, 2009, 45(3), 218-232.
9. Dai C, Fei Y, Li J, Shi Y, Yang X. A Novel Review of Homocysteine and Pregnancy Complications. *Biomed Res Int*, 2021, doi:10.1155/2021/6652231
10. Esse R, Barroso M, Tavares de Almeida I, Castro R. The Contribution of Homocysteine Metabolism Disruption to Endothelial Dysfunction: State-of-the-Art. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(4), 867.
11. Fan X, Zhang L, Li H, Chen G, Qi G, Ma X, Jin Y. Role of homocysteine in the development and progression of Parkinson's disease. *Ann Clin Transl Neurol*, 2020, 7(11), 2332-2338.
12. Ferreira CR, van Karnebeek CDM. Inborn errors of metabolism. *Handb Clin Neurol*, 2019, 162, 449-481.

13. Flegar-Meštrić Z. Postupci ispitivanja (5.5) – kratka analitička validacija. U: Akreditacija medicinsko-biokemijskog laboratorija. Galjanić S, Vukasović I, Flegar-Meštrić Z, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 123-134.
14. Fujii N, Takata T, Fujii N, Aki K, Sakaue H. D-Amino acids in protein: The mirror of life as a molecular index of aging. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2018, 1866(7), 840-847.
15. Fumić K, Bilić K. Što bi pedijatar trebao znati o aminokiselinama i kada ne bi smio propustiti njihovo mjerenje. *Paediatr Croat*, 2009, 53, 127-132.
16. Fumić K. Nasljedni metabolički poremećaji. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, urednici, Zagreb, Medicinska naklada, 2009b, str. 534-546.
17. Grgić Z. Odabir, verifikacija i validacija laboratorijskih metoda. *Svijet po mjeri*, 2019, str. 3-6.
18. Huemer M, Baumgartner MR. The clinical presentation of cobalamin-related disorders: From acquired deficiencies to inborn errors of absorption and intracellular pathways. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 2019, 42(4), 686-705.
19. Huemer M, Kožich V, Rinaldo P, Baumgartner MR, Merinero B, Pasquini E, Ribes A, Blom HJ. Newborn screening for homocystinurias and methylation disorders: systematic review and proposed guidelines. *J Inherit Metab Dis*, 2015, 38(6), 1007-1019.
20. Iacobazzi V, Infantino V, Castegna A, Andria G. Hyperhomocysteinemia: Related genetic diseases and congenital defects, abnormal DNA methylation and newborn screening issues. *Molecular Genetics and Metabolism*, 2014, 113(1-2), 27-33.
21. Informacije javnosti o novorođenačkom probiru, 2017., <https://www.kbc-zagreb.hr/informacije-javnosti-o-novorodjenackom-probiru.aspx>, pristupljeno 25.4.2022.
22. Instruction Manual. Homocysteine – in Plasma/Serum, – in Dried Blood Spots (DBS). Recipe Chemicals, Njemačka, 2018.
23. Jakubowski H. Homocysteine Modification in Protein Structure/Function and Human Disease. *Physiological reviews*, 2019, 99(1), 555-604.
24. Jeanne Dit Fouque D, Maroto A, and Memboeuf A. Internal Standard Quantification Using Tandem Mass Spectrometry of a Tryptic Peptide in the Presence of an Isobaric Interference. *Analytical Chemistry*, 2018, 90(24), 14126-14130.

25. Kaklamanos G, Aprea E, Theodoridis G. Mass Spectrometry: Principles and Instrumentation. U: Encyclopedia of Food and Health. Caballero B, Finglas PM, Toldrá F, urednici, Kidlington Oxford; Waltham, Academic Press Elsevier, 2016, str. 661-668,
26. Kaplan P, Tatarkova Z, Sivonova MK, Racay P, Lehotsky J. Homocysteine and Mitochondria in Cardiovascular and Cerebrovascular Systems. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20), 7698.
27. Kim J, Kim H, Roh H, Kwon Y. Causes of hyperhomocysteinemia and its pathological significance. *Archives of Pharmacal Research*, 2018, 41(4), 372–383.
28. Koklesova L, Mazurakova A, Samec M, Biringer K, Samuel SM, Büsselberg D, Kubatka P, Golubnitschaja O. Homocysteine metabolism as the target for predictive medical approach, disease prevention, prognosis, and treatments tailored to the person. *EPMA J*, 2021, 12(4), 1-29.
29. Kumar A, Palfrey HA, Pathak R, Kadowitz PJ, Gettys TW, Murthy SN. The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health. *Nutr Metab (Lond)*, 2017, 14, 78.
30. Lazarić K. Validacija analitičkih metoda – osnovna načela. *Svijet po mjeri 1*, 2012, str. 61-64.
31. Lehotay DC, Hall P, Lepage J, Eichhorst JC, Etter ML, Greenberg CR. LC-MS/MS progress in newborn screening. *Clin Biochem*, 2011, 44(1), 21-31.
32. Lim MD. Dried Blood Spots for Global Health Diagnostics and Surveillance: Opportunities and Challenges. *Am J Trop Med Hyg*, 2018, 99(2), 256-265.
33. Malsagova K, Kopylov A, Stepanov A, Butkova T, Izotov A, Kaysheva A. Dried Blood Spot in Laboratory: Directions and Prospects. *Diagnostics (Basel)*, 2020, 10(4), 248.
34. McCann SJ, Gillingwater S, Keevil BG, Cooper DP, Morris MR. Measurement of total homocysteine in plasma and blood spots using liquid chromatography–tandem mass spectrometry: comparison with the plasma Abbott IMx method. *Ann Clin Biochem*, 2003, 40, 161–165.
35. McClendon-Weary B, Putnick DL, Robinson S, Yeung E. Little to Give, Much to Gain-What Can You Do With a Dried Blood Spot?. *Curr Environ Health Rep*, 2020, 7(3), 211-221.



36. Mittal RD. Tandem mass spectroscopy in diagnosis and clinical research. *Indian J Clin Biochem*, 2015, 30(2), 121-123.
37. 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(2), 26.
38. Morris AA, Kožich V, Santra S, Andria G, Ben-Omran TI, Chakrapani AB, Crushell E, Henderson MJ, Hochuli M, Huemer M, Janssen MC, Maillot F, Mayne PD, McNulty J, Morrison TM, Ogier H, O'Sullivan S, Pavlíková M, de Almeida IT, Terry A, Yap S, Blom HJ, Chapman KA. Guidelines for the diagnosis and management of cystathionine beta-synthase deficiency. *J Inherit Metab Dis*, 2017, 40(1), 49-74.
39. Neagu AN, Jayathirtha M, Baxter E, Donnelly M, Petre BA, Darie CC. Applications of Tandem Mass Spectrometry (MS/MS) in Protein Analysis for Biomedical Research. *Molecules*, 2022, 27(8), 2411.
40. Ombrone D, Giocaliere E, Forni G, Malvagia S, la Marca G. Expanded newborn screening by mass spectrometry: New tests, future perspectives. *Mass Spectrometry Reviews*, 2015, 35(1), 71–84.
41. Paprotny Ł, Wianowska D, Izdebska M, Celejewska A, Szewczak D, Solski J. Analysis of serum homocysteine in the laboratory practice - comparison of the direct chemiluminescence immunoassay and high performance liquid chromatography coupled with fluorescent detection. *Biochem Med (Zagreb)*, 2020, 30(3), 030703.
42. Pitt JJ. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin Biochem Rev*, 2009, 30(1), 19-34.
43. Pum J. A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. *Adv Clin Chem*, 2019, 90, 215-281.
44. Rasmussen K, Møller J. Total homocysteine measurement in clinical practice. *Ann Clin Biochem*, 2000, 37, 627-648.
45. Roelofsen-de Beer R, Wielders J, Boursier G, Vodnik T, Vanstapel F, Huisman W, Vukasović I, Vaubourdolle M, Sönmez Ç, Linko S, Brugnoli D, Kroupis C, Lohmander M, Šprongl L, Bernabeu-Andreu F, Meško Brguljan P, Thelen M. Validation and verification of examination procedures in medical laboratories: opinion of the EFLM Working Group Accreditation and ISO/CEN standards (WG-A/ISO) on dealing with ISO 15189:2012 demands for method verification and validation. *Clin Chem Lab Med (CCLM)*, 2020, 58(3), 361-367.

46. Sacharow SJ, Pickler JD, Levy HL. Homocystinuria caused by cystathionine beta-synthase deficiency. U: GeneReviews, Adam MP, Seattle, 1993-2022.
47. Schalinske KL, Smazal AL. Homocysteine imbalance: a pathological metabolic marker. *Adv Nutr*, 2012, 3(6), 755-762.
48. Seger C, Griesmacher A. Važni aspekti uspostave dvojne spektrometrije masa u uvjetima rutinskoga kliničkog laboratorija. *Biochem Medica*, 2007, 17, 29-51.
49. Serdar CC, Cihan M, Yücel D, Serdar MA. Sample size, power and effect size revisited: simplified and practical approaches in pre-clinical, clinical and laboratory studies. *Biochem Med (Zagreb)*, 2021, 31(1), 010502.
50. Singh Baghel U, Singh A, Singh D, Sinha M. Application of Mass Spectroscopy in Pharmaceutical and Biomedical Analysis. U: Spectroscopic Analyses - Developments and Applications. Sharmin E, Zafar F, London, IntechOpen, 2017, str. 105-121.
51. Shakya AK. Inborn Errors of Metabolism. U: Advances in Biochemistry & Applications in Medicine. Shrestha R, Las Vegas, Open Access eBooks, 2017, str. 1-32.
52. Smith AD, Refsum H. Homocysteine – from disease biomarker to disease prevention. *Journal of Internal Medicine*, 2021, 290(4), 824-854.
53. Stokvis E, Rosing H, Beijnen JH. Stable isotopically labeled internal standards in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not? *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2005, 19(3), 401-407.
54. Šimundić AM. Tipovi podataka i raspodjela. *Acta Medica Croatica*, 2006, 60, 17-35.
55. Štraus B, Barišić K. Aminokiseline. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, Zagreb, Medicinska naklada, 2009a, str. 162-168.
56. Tawfik A, Elsherbiny NM, Zaidi Y, Rajpurohit P. Homocysteine and Age-Related Central Nervous System Diseases: Role of Inflammation. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(12), 6259.
57. Theodorsson E. Validation and verification of measurement methods in clinical chemistry. *Bioanalysis*, 2012, 4(3), 305-320.
58. Topić E, Nikolac N, Panteghini M, Theodorsson E, Salvagno GL, Miler M, Šimundić AM, Infusino I, Nordin G, Westgard S. How to assess the quality of your analytical method? *Clin Chem Lab Med*, 2015, 53(11), 1707-1718.
59. Troen AR, Lutgens E, Smith DE, Rosenberg IH, Selhub J. The atherogenic effect of excess methionine intake. *PNAS*, 2003, 100(25), 15089-15094.

60. Ubbink JB. Assay Methods for the Measurement of Total Homocyst(e)ine in Plasma. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis*, 2000, 26(3), 233–242.
61. Udovičić M, Baždarić K, Bilić-Zulle L, Petrovečki M. Što treba znati kada izračunavamo koeficijent korelacije? *Biochemia Medica*, 2007, 17(1), 10–15.
62. Varughese B, Madrewa D, Kumar Polipalli S, Ramji S, Saxena A, Kapoor S. Development of a novel approach for the second-tier estimation of homocysteine in dried blood spot using tandem mass spectrometry. *Indian J Child Health*, 2021, 8(1), 32-37.
63. Vukasović I. Upravljanje kvalitetom u medicinsko-biokemijskom laboratoriju. U: 9. kongres Hrvatskog društva za medicinsku biokemiju i laboratorijsku medicinu. Pašalić D, Zagreb, *Biochemia Medica*, 2018, 28 (suppl 1), str. S47-S48.
64. Wilcoxon test (paired samples), 2022., <https://www.medcalc.org/>, pristupljeno 10.8.2022.
65. What is the Wilcoxon Sign Test? 2022., <https://www.statisticssolutions.com/>, pristupljeno 10.8.2022.
66. Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. *Amino acids*, 2009, 37(1), 1-17.
67. Xu W, Zhong C, Zou C, Wang B, Zhang N. Analytical methods for amino acid determination in organisms. *Amino Acids*, 2020, 52(8), 1071-1088.
68. Zakaria R, Allen KJ, Koplín JJ, Roche P, Greaves RF. Advantages and Challenges of Dried Blood Spot Analysis by Mass Spectrometry Across the Total Testing Process. *EJIFCC*, 2016, 27(4), 288-317.
69. Zhao Y, Liu G, Shen JX, Aubry A-F. Reasons for calibration standard curve slope variation in LC–MS assays and how to address it. *Bioanalysis*, 2014, 6(11), 1439-1443.

## 7. SAŽETAK/SUMMARY

Homocistein je aminokiselina koja u organizmu nastaje isključivo u metioninskom ciklusu. Povišena koncentracija homocisteina u krvi naziva se hiperhomocisteinemija, a povezuje se uz mnoga stanja uključujući kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti, komplikacije u trudnoći, maligne bolesti i dijabetes. Ipak, hiperhomocisteinemija najčešće se očituje kod nasljednih metaboličkih poremećaja poput klasične homocistinurije gdje je uslijed mutacije prisutan manjak ili potpuna odsutnost enzima uključenih u metioninski ciklus. Homocistein se do sada određivao iz uzorka plazme, međutim uzorak suhe kapi krvi bitno je praktičniji za rutinsko određivanje, a pokazala se i potreba za mjerenjem homocisteina u drugostupanjskim testovima novorođenačkog probira. Provedbom kratke analitičke validacije zaključeno je da je metoda određivanja homocisteina iz uzorka suhe kapi krvi tandemskom spektrometrijom masa primjenjiva za rutinski rad.

## 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

### VERIFIKACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE HOMOCISTEINA IZ SUHE KAPI KRVI NA FILTARSKOM PAPIRU PRIMJENOM TEHNOLOGIJE TANDEMSKE SPEKTROMETRIJE MASA

Petra Andrašić

#### SAŽETAK

Homocistein je aminokiselina koja u organizmu nastaje isključivo u metioninskom ciklusu. Povišena koncentracija homocisteina u krvi naziva se hiperhomocisteinemija, a povezuje se uz mnoga stanja uključujući kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti, komplikacije u trudnoći, maligne bolesti i dijabetes. Ipak, hiperhomocisteinemija najčešće se očituje kod nasljednih metaboličkih poremećaja poput klasične homocistinurije gdje je uslijed mutacije prisutan manjak ili potpuna odsutnost enzima uključenih u metioninski ciklus. Homocistein se do sada određivao iz uzorka plazme, međutim uzorak suhe kapi krvi bitno je praktičniji za rutinsko određivanje, a pokazala se i potreba za mjerenjem homocisteina u drugostupanjskim testovima novorođenačkog probira. Provedbom kratke analitičke validacije zaključeno je da je metoda određivanja homocisteina iz uzorka suhe kapi krvi tandemskom spektrometrijom masa primjenjiva za rutinski rad.

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

Rad sadrži: 45 stranica, 8 grafičkih prikaza, 10 tablica i 69 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: homocistein, poremećaji metioninskog ciklusa, suha kap krvi, verifikacija, tandemski spektrometrija masa

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ksenija Fumić**, redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Željka Vogrinc**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.  
**Dr. sc. Désirée Coen Herak**, docentica Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: rujan 2022.

## 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

### VERIFICATION OF A METHOD FOR HOMOCYSTEINE ANALYSIS IN DRIED BLOOD SPOTS USING TANDEM MASS SPECTROMETRY

**Petra Andrašić**

#### SUMMARY

Homocysteine is an amino acid that is formed only during the methionine cycle in the human body. An elevated concentration of homocysteine in the blood is called hyperhomocysteinemia, and it is associated with many conditions, including cardiovascular and neurodegenerative diseases, complications in pregnancy, malignancies, and diabetes. However, hyperhomocysteinemia is most often manifested in hereditary metabolic disorders such as classical homocystinuria. Due to the mutation, there is a deficiency or complete absence of enzymes involved in the methionine cycle. Up to now, homocysteine has been determined from a plasma sample, but a dry blood spot is significantly more practical for routine determination. Also, there is a need for measuring homocysteine in secondary newborn screening tests. During the short analytical validation, it was concluded that the method of determining homocysteine from dried blood spots by tandem mass spectrometry is applicable for routine work.

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

Thesis includes: 45 pages, 8 figures, 10 tables and 69 references. Original is in Croatian language.

Keywords: homocysteine, disorders of methionine metabolism, dried blood spot, verification, tandem mass spectrometry

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

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

The thesis was accepted: September 2022