

Drugostupanjski test pri provođenju novorođenačkog probira na klasičnu homocistinuriju

Čižmešija, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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:163:137959>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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



Marija Čizmešija

**Drugostupanjski test pri provođenju
novorođenačkog probira na klasičnu
homocistinuriju**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2024.

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.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Nasljedni metabolički poremećaji	1
1.1.1. Novorođenački probir	1
1.1.2. Suha kap krvi na filtarskom papiru	3
1.1.3. Drugostupanjski testovi u provođenju novorođenačkog probira	5
1.2. Poremećaji metabolizma aminokiselina	6
1.2.1. Poremećaji metioninskog ciklusa	7
1.2.2. Klasična homocistinurija.....	9
1.3. Homocistein	10
1.3.1. Laboratorijsko određivanje homocisteina i drugih aminokiselina.....	11
1.3.2. Drugostupanjski testovi kod određivanja homocisteina.....	13
1.4. Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS).....	14
2. OBRAZLOŽENJE TEME	16
3. MATERIJALI I METODE.....	17
3.1. Uzorci pacijenata.....	17
3.2. Materijali.....	17
3.2.1. Kemikalije	18
3.2.2. Oprema i uređaji	19
3.3. LC-MS/MS metoda	19
3.3.1. Predanalitička faza.....	19
3.3.2. Analitička faza.....	21
3.3.3. Poslijeanalitička faza	22
3.4. Statistička obrada podataka.....	22
3.4.1. Usporedivost.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	25
4.1. Rezultati.....	25
4.1.1. Usporedivost rezultata.....	25
4.2. Rasprava	33
5. ZAKLJUČAK.....	37

6. LITERATURA	38
7. SAŽETAK/ SUMMARY.....	44
7.1. Sažetak.....	44
7.2. Summary.....	45

POPIS KRATICA

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

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

CE – kapilarna elektroforeza (engl. *capillary electrophoresis*)

CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)

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

Cys - cistein

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

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

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

GC – plinska kromatografija (engl. *gas chromatography*)

GFR – brzina glomerularne filtracije (engl. *glomerular filtration rate*)

Hcy - homocistein

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

IMD – nasljedni metabolički poremećaji (engl. *Inherited Metabolic Disorders*)

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

LC-MS/MS – tekućinska kromatografija udružena s tandemskom spektrometrijom masa (engl. *liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*)

LIS – laboratorijski informacijski sustav (engl. *Laboratory Information System*)

MAT – metionin adenziltransferaza (engl. *methionine adenosyltransferase*)

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

Met – metionin

MS – maseni spektrometar (engl. *mass spectrometer*)

MTHFR - metilentetrahidrofolat reduktaza (engl. *methylenetetrahydrofolate reductase*)

MRM – praćenje višestrukih reakcija (engl. *Multiple Reaction Monitoring*)

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

Phe – fenilalanin

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

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

tHcy – ukupni homocistein

1. UVOD

1.1. Nasljedni metabolički poremećaji

Nasljedni metabolički poremećaji (engl. *Inherited Metabolic Disorders*, IMD) koji se još nazivaju prirođenim pogreškama metabolizma, većinom su uzrokovani mutacijama gena koji kodiraju enzime, transportere ili kofaktore te utječu na različite metaboličke procese (Burtis i sur., ured., 2015). Najčešće manjak enzima ili manjak funkcionalno aktivnih enzima dovodi do nakupljanja prekursora ili metabolita supstrata ili do manjka produkata enzimske reakcije. U većini slučajeva se radi o monogenkim bolestima koje su uzrokovane mutacijama jednog gena, a nasljeđuju se prema Mendelovim zakonima nasljeđivanja. To može biti recesivno ili dominantno nasljeđivanje, autosomno ili x-vezano. Poremećaji koji su posljedica mutacija mitohondrijske DNA, nasljeđuju se mitohondrijskim ili maternalnim nasljeđivanjem (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009). Monogeni poremećaji nastaju kao posljedica spontanijih (*de novo*) mutacija u očevoj ili majčinoj zametnoj liniji i obično se prenose s generacije na generaciju (Apgar i Sanders, 2022).

Poznato je više od 8000 monogenkih nasljednih bolesti, a za više od 1900 nasljednih metaboličkih poremećaja poznati su biokemijski mehanizmi nastanka (Ferreira i sur., 2021). Iako je učestalost pojedinih IMD-ova dosta niska, kao skupina ovi su poremećaji važan medicinski problem. Njihova kumulativna učestalost se približava omjeru 1:2000, pogotovo među bolesnicima dječje dobi gdje je zahvaćeno najmanje 1% sve novorođenčadi (Burtis i sur., ured., 2015). Ovisno o načinu organizacije, laboratorijska dijagnostika IMD-ova provodi se u okvirima nacionalnih programa novorođenačkog probira ili nakon postavljene kliničke sumnje, tzv. selektivnim probirom (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009).

1.1.1. Novorođenački probir

Novorođenački probir (engl. *newborn screening*, NBS) predstavlja sustavno traganje za pojedinim prirođenim bolestima kod cjelokupne novorođenačke populacije određenog područja s ciljem što ranijeg otkrivanja bolesti, prije nego nanese štetu po zdravlje (<https://www.kbc-zagreb.hr/informacije-javnosti-o-novorodjenackom-probiru.aspx>). Probir novorođenčadi prvobitno je uveden 1960-ih kada je Robert Guthrie uz pomoć svojih kolega razvio tzv. Guthrieov test za mjerenje fenilalanina iz uzorka suhe kapi krvi na filtarskom papiru (engl. *dried blood spot*, DBS). Panel poremećaja koji su uvršteni u nacionalne programe NBS-a postupno se širio

razvojem laboratorijskih metoda. U kasnim 1990-ima uvođenje tehnologije tandemске spektrometrije masa (engl. *Tandem Mass Spectrometry*, MS/MS) u laboratorije za NBS omogućilo je probir na više od 40 bolesti samo jednom analizom, mjerenjem aminokiselina i profila acilkarnitina, te njihovim međusobnim omjerima (Loeber i sur., 2021). Međutim, za uključivanje neke bolesti u novorođenački probir moraju biti zadovoljeni određeni kriteriji. Autori J. M. G. Wilson i G. Jungner postavili su nekoliko ključnih kriterija koji su se morali zadovoljiti da bi se pojedina bolest mogla uvrstiti u NBS, a to su: bolest je učestala u određenoj populaciji, dostupni su učinkoviti načini liječenja te ustanove za dijagnostiku i liječenje bolesti, nemogućnost ranog kliničkog prepoznavanja bolesti, postojanje odgovarajućeg testa za otkrivanje bolesti, osigurane informacije, povjerljivost i edukacija o nasljednoj bolesti, prihvatljivi troškovi te održivost provođenja NBS-a za određenu bolest (Petković Ramadža i sur., 2013; Wilson i Jungner, 1968).

Međutim, u Europi postoje velike razlike u broju IMD-ova na koje se provodi probir i ne postoji jedinstveni prihvaćen pristup za proširenje NBS-a. Tako se u nekim zemljama probir novorođenačadi provodi za samo jednu bolest, dok druge države imaju uključeno u nacionalne programe probira i do 30 bolesti. Razlike su prisutne i u NBS programima unutar SAD-a, gdje se programi probira razlikuju od države do države. To je dovelo do potrebe za uspostavom novog pristupa za objektivnu procjenu i određivanje prioriteta IMD-ova za uključivanje u programe NBS-a (Martínez-Morillo i sur., 2016). Algoritam je razvijen na temelju Wilsonovih i Jungnerovih klasičnih načela probira, tako da bi pojedinačne zemlje mogle strateški procijeniti prioritete poremećaja za uključivanje u svoje NBS programe uzimajući u obzir ekonomske, društvene i političke kriterije. Evaluacijski algoritam sastoji se od tri kategorije: stanje (engl. *Condition*), probir (engl. *Screening*) i liječenje (engl. *Treatment*), a svaka kategorija sadrži posebne kriterije prema kojima se boduju i procjenjuju poremećaji. Za „stanje“ se najviše može dodijeliti 6 bodova i ova kategorija se odnosi na početak, težinu i učestalost poremećaja, kategorija „probir“ odnosi se na dostupnost i izvedbu dijagnostičkih testova i mogu se dodijeliti najviše 3 boda, a za kategoriju „liječenje“ maksimalan broj bodova je 4 i označava da postoji prihvaćen terapijski postupak, dostupnost liječenja i dobar ishod. Od 48 IMD-ova procijenjenih algoritmom za procjenu NBS-a i korištenjem ocjene od 8,5 kao granične vrijednosti, pokazalo se da postoji 35 poremećaja koji najviše ispunjavaju Wilsonova i Jungnerova klasična načela probira i preporučuje se njihovo uključivanje u NBS program (Jones i sur., 2022).

U Republici Hrvatskoj NBS je centraliziran i provodi se na Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir u Kliničkom bolničkom centru Zagreb. U program novorođenačkog probira za sada je uvršteno osam bolesti: fenilketonurija, konatalna hipotireoza, manjak acil-CoA-dehidrogenaze srednjih lanaca, manjak 3-OH-acil-CoA-dehidrogenaze dugih lanaca, manjak acil-CoA-dehidrogenaze vrlo dugih lanaca, manjak karnitinskog nosača, izovalerička acidurija, glutarna acidurija tipa I. Od 1.3.2024. godine je probir na spinalnu mišićnu atrofiju uvršten u nacionalni program probira. Informacije javnosti o novorođenačkom probiru u Republici Hrvatskoj dostupne su na mrežnoj stranici: <https://www.kbc-zagreb.hr/informacije-javnosti-o-novorodjenackom-probiru.aspx>. Nasljednim metaboličkim poremećajima za koje se provodi NBS u RH dodijeljeni su bodovi prema novom postupniku i oni su navedeni u Tablici 1. Klasičnoj homocistinuriji (OMIM #236200) prema novom postupniku za NBS, dodijeljeno je ukupno 11,5 bodova što je čini dobrim kandidatom za uvođenje u prošireni NBS program (Jones i sur., 2022).

Tablica 1. Bodovi dodijeljeni nasljednim metaboličkim poremećajima uvrštenim u nacionalni program Republike Hrvatske prema prijedlogu Jones i sur., 2022.

Poremećaj	Bodovi
Fenilketonurija	11,5
Manjak acil-CoA dehidrogenaze srednjih lanaca	10
Manjak 3-OH-acil-CoA-dehidrogenaze dugih lanaca	10,5
Manjak acil-CoA-dehidrogenaze vrlo dugih lanaca	9,5
Manjak karnitinskog nosača	12,5
Izovalerička acidurija	8,5
Glutarna acidurija tipa I	11,5

1.1.2. Suha kap krvi na filtarskom papiru

Uzorak za provođenje NBS-a je suha kap krvi na standardiziranom filtarskom papiru Whatman 903TM. Uzorak se dobiva kapanjem nekoliko kapljica krvi iz pete novorođenčeta na označene dijelove standardiziranog filtarskog papira. Kartica za NBS se sastoji od dijela na kojem se ispunjavaju svi potrebni podaci o majci i djetetu, te od dijela koji je predviđen za

uzimanje krvi. Na filtarskom papiru iscrtana su 4 kruga i svaki je predviđen za jednu kap krvi koja odgovara volumenu od oko 50 μ L krvi. Važno je uzeti u obzir da se kod postupka mjerenja analita LC-MS/MS-om uzima isječak DBS-a promjera oko 3 mm za koji se smatra da sadrži 3,1 μ L krvi i to se koristi za izračun koncentracija pojedinih analita na temelju kojih se postavljaju dijagnostičke sumnje u NBS-u (Bilandžija i sur., 2018).

Prije uzimanja uzorka potrebno je pripremiti ubodno mjesto, zagrijati ga, kako bi se povećao protok krvi i potom ga dezinficirati. Prvu kap je neophodno obrisati i pričekati da se formira sljedeća kap krvi koja se prisloni na filtarski papir (Mei, 2014). Uzorak krvi novorođenčeta potrebno je uzeti između 48 i 72 sata djetetova života. Nakon što se na kartici ispune svi iscrtani krugovi, uzorak se suši minimalno 4 sata na ravnoj i čistoj površini bez izravnog utjecaja sunčeve svjetlosti i topline. Potom se stavlja u prozirnu foliju i dostavlja u laboratorij u što kraćem roku, po mogućnosti unutar 48 sati. Međunarodni CLSI (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) standardi propisuju smjernice za prikupljanje krvi na filtarskom papiru (Moat i sur., 2020). Nedonoščad, neonatalna žutica, porođajna težina, parenteralna prehrana ili transfuzija, potencijalno mogu utjecati na rezultate NBS-a. Potonje informacije bi trebale biti zabilježene na kartici i uzete u obzir prilikom tumačenja rezultata (Pitt, 2010). Za što uspješnije provođenje probira, vrlo je važno osvijestiti potrebu za odgovarajućim i pravodobnim prikupljanjem uzoraka i zbog toga, u predanalitičkom dijelu probira, ključnu ulogu imaju zdravstveni djelatnici svih rodilišta i njihova edukacija (Bilandžija i sur., 2018).

Osim za NBS, uzorak DBS-a se može koristiti i kod praćenja bolesnika s već dijagnosticiranim IMD-ovima, ali i kod starije populacije kod koje učestale kontrole i vađenja krvi mogu predstavljati poteškoće i nelagodu (Lakshmy i sur., 2014). Brojne su prednosti DBS uzoraka u usporedbi s uzorcima dobivenim venepunkcijom. Zahvaljujući jeftinijem i jednostavnijem načinu uzorkovanja uzoraka krvi na filtarski papir, omogućenom slanju uzoraka u oмотnici poštom u laboratorij i skladištenju uzoraka namijenjenih naknadnoj kliničkoj analizi, DBS uzorci postaju sve poželjniji izbor u odnosu na uzorke prikupljene venepunkcijom (Bergwerff i sur., 2017).

Važno je da laboratoriji standardiziraju kriterije uzorkovanja DBS-a i o tome educiraju djelatnike jer kvaliteta uzorka znatno utječe na analitičke rezultate. Nepravilno uzorkovanje, kao što su prevelik ili premalen volumen krvi u krugovima na filtarskom papiru, kontaminacija

filtarskog papira ili skladištenje na neodgovarajućoj temperaturi, mogu utjecati na izmjerene vrijednosti analita. Dodatni ograničavajući čimbenik je različitost hematokrita i broja stanica. Hematokrit je prepoznat kao značajan faktor koji utječe na karakteristike DBS uzoraka jer utječe na viskoznost krvi pa tako i na vrijeme sušenja, homogenost i ekstrakciju. Prilikom uzimanja isječka DBS-a, preporuka je da se isječak uzima iz središnjeg dijela kruga. Prilikom kapanja uzorka krvi na filtarski papir dolazi do gubitka homogenosti, te se eritrociti mogu koncentrirati na rub DBS-a i to može rezultirati povećanim koncentracijama analita povezanih s eritrocitima. Pokazalo se da s povećanjem vrijednosti hematokrita, raste i koncentracija aminokiselina. Također, bitno je procijeniti utjecaj duljine i uvjeta skladištenja. Primjerice, homocistein (Hcy) je stabilan do 30 dana na sobnoj temperaturi bez direktnog izlaganja sunčevoj svjetlosti (Moat i sur., 2020).

1.1.3. Drugostupanjski testovi u provođenju novorođenačkog probira

Svaki laboratorij za NBS svojim analitičkim metodama mora odrediti vlastite granične vrijednosti (engl. *cut-off value*), referentne raspone i omjere analita koji su uvršteni u novorođenački probir. Mjerenjem i analizom velikog broja uzoraka DBS-a, obično između 1000 i 2000 uzoraka zdrave populacije, određuju se optimalne granične vrijednosti za pojedine analite. Cut-off vrijednost predstavlja prag iznad ili ispod kojeg se smatra da je rezultat testa ili mjerenja pozitivan ili negativan. U kontekstu NBS-a, cut-off vrijednost označava vrijednost koja određuje hoće li se rezultat testa smatrati pozitivnim. Nakon što se dobiju podatci o zdravoj novorođenčadi, mogu se odrediti i izračunati koncentracije analita koje odgovaraju 95. percentilu. Ovo znači da se uzimaju podatci o najvišim koncentracijama koje se nalaze u gornjih 5% uzoraka zdrave populacije novorođenčadi. Na temelju dobivenih vrijednosti izračunavaju se referentne razine analita i omogućuje se određivanje granice iznad koje će se koncentracije analita smatrati povišenima. Informativni parametri u NBS-u su pozitivna prediktivna vrijednost (PPV) i negativna prediktivna vrijednost (NPV). Za njihov izračun potrebno je osigurati osjetljivost koja predstavlja vjerojatnost pozitivnog rezultata testa kod novorođenčadi s bolešću i specifičnost koja označava vjerojatnost negativnog rezultata testa kod novorođenčadi koja nema bolest. PPV je postotak novorođenčadi s abnormalnim rezultatom koja imaju tu bolest, a NPV je postotak slučajeva s normalnim nalazima koji nemaju ovu bolest (Younesi i sur., 2022).

Lažno pozitivne rezultate novorođenačkog probira u NBS programu treba nastojati izbjeći, jer uzrokuju zabrinutost roditelja, kao i dodatna financijska opterećenja zdravstvenog sustava. Kako bi se smanjio broj novorođenčadi koja zahtijeva dodatna potvrdna ispitivanja, ali i za poboljšanje PPV-a pojedinih testova, razvijeni su testovi druge razine, odnosno drugostupanjski testovi (engl. *second-tier tests*). Drugostupanjski testovi uključuju analize iz istog uzorka krvi, ali specifičnijim metodama (Burtis i sur., ured., 2015; Petković Ramadža i sur., 2013). Drugostupanjski testovi su ključna komponenta NBS-a kojima je moguće povećati osjetljivost i specifičnost probira, te značajno smanjiti nepotrebne zahtjeve za ponovnim uzorkovanjem DBS-a. Svaki drugostupanjski test povećava složenost i troškove NBS programa, stoga ih je neophodno pomno odabrati (Pitt, 2010). Uključivanje drugostupanjskih testova u NBS programe omogućuje prilagođavanje granica primarnih biljega, što rezultira manjim udjelom neotkrivenih pacijenata, bez velikog povećanja lažno pozitivnih rezultata (Keller i sur., 2019).

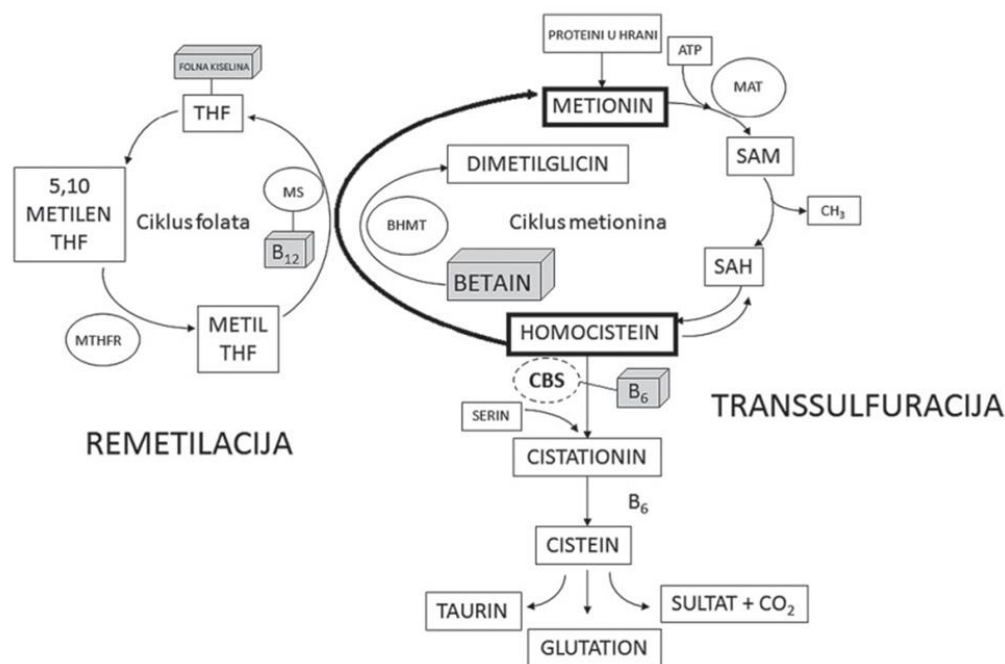
1.2. Poremećaji metabolizma aminokiselina

Aminokiseline su neophodne građevne jedinice proteina pa tako i enzima. Strukturni su elementi i izvor energije stanicama kojima je ona potrebna za normalan rast, diferencijaciju i funkcioniranje (Ling, 2023). Također, imaju važnu ulogu u regulaciji metaboličkih puteva, a tijelo ih koristi u višestrukim mehanizmima kao što su recikliranje, neurotransmisija, transaminacija te osiguravanje dovoljne količine energije kada je za to potrebno (Aliu i sur., 2018). Ukoliko je jedan od metaboličkih puteva blokiran, može doći do nakupljanja određenih aminokiselina i metabolita što dovodi do određenih metaboličkih poremećaja.

Gotovo svi poremećaji metabolizma aminokiselina prenose se autosomno recesivno i najčešće rezultiraju manjkom specifičnog enzima na metaboličkom putu aminokiseline. To dovodi do nakupljanja glavne aminokiseline, njezinih produkata ili kataboličkih produkata, ovisno o mjestu gdje je enzim blokiran. Uz najčešće poremećaje aminokiselina, poput fenilketonurije, bolesti javorovog sirupa i tirozinemije, primjer češće aminoacidopatije je i klasična homocistinurija (Burtis i sur., ured., 2015).

1.2.1. Poremećaji metioninskog ciklusa

Metionin (Met) je esencijalna proteogena aminokiselina koja sadrži sumpor, neophodna je za normalan rast i razvoj, a može se dobiti iz hrane ili gastrointestinalnih mikroba. U metioninskom ciklusu stvara se S-adenozilmetionin (SAM) koji je univerzalni donor metilne skupine, potreban za reakcije metilacije. Može donirati metilnu skupinu različitim spojevima, primjerice molekulama DNA i RNA, proteinima ili lipidima, pri čemu dolazi do nastanka S-adenozilhomocisteina (SAH) (Parkhitko i sur., 2019; Zhao i Lum, 2022). Reverzibilnom hidrolizom SAH nastaju adenzin i L-homocistein. Kako bi razine Hcy ostale strogo regulirane, nastali Hcy se može remetilirati u Met i na taj način zadržati u ciklusu metilacije ili pretvoriti u cistein (Cys) putem transulfuracije i tako povući iz ciklusa metilacije. Remetilacija Hcy odvija se uz pomoć enzima betain homocistein metiltransferaze (BHMT) ili metionin sintaze (MeSe) koja zahtijeva 5-metiltetrahydrofolat i prisutnost vitamina B12. Metiltetrahydrofolat se proizvodi u ciklusu folata redukcijom metilentetrahydrofolata koju katalizira enzim metilentetrahydrofolat reduktaza (MTHFR), enzim koji je ovisan o riboflavinu (vitamin B2) (McCaddon i Miller, 2023). U transulfuracijskom putu Hcy se metabolizira uz cistationin- β -sintazu (engl. *cystathionine beta synthase*, CBS), enzim ovisan o piridoksinu (vitamin B6). CBS sintetizira cistationin iz kondenzacije Hcy i serina, a cistationin se dalje može hidrolizirati cistationin- γ -liazom da bi se proizveo Cys (Aliu i sur., 2018; Parkhitko i sur., 2019). Hoće li se Hcy remetilirati u Met ili razgraditi transulfuracijom, djelomično ovisi o unutarstaničnim razinama SAM. SAM djeluje kao alosterički aktivator CBS-a i alosterički inhibitor MTHFR-a na način da djeluje kao „senzor“ prehrambenog Met tako da se Hcy reciklira u Met kada je njegov unos hranom nizak i katabolizira se kada je unos hranom visok (McCaddon i Miller, 2023).



Slika 1. Metioninski ciklus (preuzeto iz Muačević-Katanec i sur., 2014.)

Poremećaji metioninskog ciklusa najčešće uključuju genske poremećaje, odnosno manjak određenih enzima koji sudjeluju u tom ciklusu i dovode do povišenja Met i Hcy u krvi. Genetski poremećaji koji su uzrokovani poremećajima u demetilaciji Met, remetilaciji Hcy ili su povezani s metabolizmom kobalamina i folata, uključuju enzime poput CBS-a, MTHFR-a, metionin adenoziltransferaze (MAT) i MeSe. Ovi autosomno recesivni genetski poremećaji zajednički su nazvani homocistinurijama jer se Hcy nakuplja u krvi te izlučuje u urin (Alodaib i sur., 2012; Miller, 2013; Kožich i Stabler, 2020). U homocistinuriji ukupna koncentracija homocisteina (tHcy) u plazmi obično se kreće između 50 i 400 $\mu\text{mol/L}$, u usporedbi sa fiziološkim vrijednostima od 5 do 15 $\mu\text{mol/L}$ (Bártl i sur., 2014).

Upravo zbog manjka ili nefunkcionalnosti enzima CBS, dolazi do nakupljanja Hcy i razvoja klasične homocistinurije. Hcy se nakuplja i dimerizira stvarajući disulfid homocistin, koji se izlučuje u urin, a budući da je remetilacija netaknuta, dio dodatnog Hcy se pretvara u Met, koji se nakuplja u krvi (Demczko, 2021). Osim različitih IMD-ova na razini enzima i kofaktora, do hipermetioninemije i hiperhomocisteinemije mogu dovesti i razna stečena stanja poput kroničnog alkoholizma, pušenja, bubrežne insuficijencije ili nedovoljnog unosa vitamina B9 i B12 (Muačević-Katanec i sur., 2014).

1.2.2. Klasična homocistinurija

Klasična homocistinurija ili homocistinurija tipa I (OMIM #236200), uzrokovana je mutacijom u genu *CBS* koji kodira za enzim cistationin- β -sintazu, a nalazi se na 21. kromosomu (21q22.3). Manjak aktivnosti CBS enzima smanjuje pretvorbu Hcy u cistationin odnosno ograničava transsulfuraciju i to dovodi do pojačane remetilacije s povećanjem serumskog Hcy i Met te smanjenja serumske razine Cys (Candela i sur., 2023). Bolest je autosomno recesivna. Istraživanja su pokazala da postoje dvije fenotipske varijante klasične homocistinurije: homocistinurija kod koje pacijenti reagiraju na terapiju piridoksinom i homocistinurija kod koje pacijenti ne reagiraju na piridoksin. Homocistinurija koja reagira na piridoksin obično ima blaži klinički tijek od varijante koja ne reagira na piridoksin (Sacharow i sur., 2004). Učestalost klasične homocistinurije u svijetu varira ovisno o etničkoj pripadnosti. Prevalencija se procjenjuje na oko 1:300 000 živorođene djece s vrlo visokom učestalošću u Kataru (1:1800), Norveškoj (1:6400) i Njemačkoj (1:17 800) (Burtis i sur., ured., 2015; Aliu i sur., 2018).

Klasična homocistinurija se očituje uz izrazito povišenu koncentraciju Hcy u plazmi, određenim stupnjem mentalne retardacije, psihijatrijskih poremećaja, može doći do dislokacije očne leće (ectopia lentis) te miopije. Fenotipski pacijenti su visoki, mršavi s neproporcionalno dugim ekstremitetima i drugim skeletnim abnormalnostima koje podsjećaju na Marfanov sindrom. Također su česti kardiovaskularni poremećaji, osobito sklonost trombozi i aterosklerozi, pad bubrežnih i kognitivnih funkcija te malformacija kostura i osteoporoza od adolescentske dobi (Ramakrishnan i sur., 2006; Candela i sur., 2023). Nije neuobičajeno da prethodno asimptomatska osoba u zrelim godinama ima tromboembolički događaj koji često bude cerebrovaskularan (Sacharow i sur., 2004).

Na klasičnu homocistinuriju se može posumnjati u novorođenačkom probiru kod novorođenčadi kod koje se NBS-om otkrije povećana koncentracija Met. Međutim, ova se sumnja treba potvrditi dodatnim, drugostupanjskim testovima. Konačna dijagnoza klasične homocistinurije postavlja se identifikacijom bialelnih patogenih mutacija u genu *CBS* (Sacharow i sur., 2004).

Nakon potvrđene dijagnoze klasične homocistinurije započinje dijeta s niskim udjelom Met. Uvodi se posebna medicinska hrana, često nazvana „formulom“. Ona sadrži potrebne esencijalne i neesencijalne aminokiseline osim Met, ugljikohidrate, masti i masne kiseline,

minerale i vitamine kako bi se osigurala potrebna prehrana za normalan rast i razvoj. Za bolesnike za koje se utvrdi da pozitivno odgovaraju na piridoksin, liječenje uključuje piridoksin u farmakološkim dozama, obično 100-300 mg, u kombinaciji s folnom kiselinom i dodacima vitamina B12. Kod osoba koje ne reagiraju na piridoksin, preporuča se stroga dijeta s ograničenim unosom Met u kombinaciji s piridoksinom za osobe koje djelomično odgovaraju na terapiju (Levy, 2021). Liječenje betainom (trimetilglicin) osigurava alternativni put remetilacije za pretvaranje viška Hcy u Met i može pomoći u sprječavanju komplikacija, osobito tromboze. Terapija betainom može biti glavni oblik liječenja, ali je i dalje poželjno ostati na doživotnoj metaboličkoj dijeti. Neliječeni bolesnici s manjkom CBS-a pokazali su da rizik od komplikacija raste s dobi. Prognoza bolesnika liječenih od neonatalnog razdoblja je dobra. Kod bolesnika kod kojih je bolest kasno dijagnosticirana, terapija je usmjerena na prevenciju tromboemboličkih događaja. Najbolji rezultati zabilježeni su kod onih pojedinaca kod kojih se koncentracija slobodnog Hcy u plazmi održava ispod 11 $\mu\text{mol/L}$, što odgovara održavanju koncentracije tHcy u plazmi ispod 100 $\mu\text{mol/L}$ (Sacharow i sur., 2004).

1.3. Homocistein

Homocistein je neproteinogena aminokiselina koja sadrži sumpor i predstavlja važnu točku grananja na putu od Met do Cys. Prehranom se dobije 60% viška Met u odnosu na njegove potrebe za sintezu proteina i taj višak se razgrađuje u Hcy kroz ciklus metilacije. Kao što je već navedeno, dva su ključna puta koja sudjeluju u regulaciji koncentracije Hcy: remetilacija natrag u Met ili transsulfuracija u Cys uz proizvodnju sumporovodika H_2S (Hermann i Sitdikova, 2021; McCaddon i Miller, 2023). Hcy, koji je uglavnom prisutan u jetri, bubrezima, mozgu, srcu i plućima, nalazi se u plazmi u različitim kemijskim oblicima. Postoji Hcy vezan za proteine, i on čini oko 70% ukupnog Hcy, slobodni Hcy (oko 1%) i miješani disulfidi koji predstavljaju vezu Hcy s Cys ili drugim tiolima (30%). Skup ova tri oblika identificiran je kao ukupni homocistein (tHcy) (Candela i sur., 2023).

Povišene koncentracije tHcy u plazmi mogu biti uzrokovane genskim poremećajima već spomenutih enzima, osobito MTHFR-a i CBS-a koji sudjeluju u metabolizmu Hcy. Osim toga, prehrambene navike i stil života mogu također utjecati na razinu Hcy u krvi. Ipak, najčešći i najznačajniji uzrok povišenog tHcy je manjak ili poremećena funkcija jednog ili više vitamina B

skupine (B9, B12, B6, B2) koji su uključeni kao koenzimi u metabolizam Hcy. Važan uzrok povišenja tHcy je i oštećenje bubrega, pogotovo kada brzina glomerularne filtracije (GFR) pada ispod 60 ml/min (Smith i Refsum, 2021).

Poznato je više od stotinu bolesti ili stanja koja su povezana s povišenim koncentracijama tHcy u plazmi. Povišenje Hcy najčešće se veže uz kardiovaskularne bolesti i aterosklerozu. Također, povezano je sa bolestima središnjeg živčanog sustava, defektom neuralne cijevi, Alzheimerovom bolesti te bubrežnim bolestima i osteoporozom. Kliničke indikacije koje bi trebale uputiti na mjerenje tHcy su brojne: nejasni rani tromboembolički incidenti, visoka miopija, subluksacija očne leće i nejasna neurološka simptomatologija. Laboratorijski pokazatelji moguće hiperhomocisteinemije su: hipermetioninemija, metilmalonska acidurija, manjak vitamina B12 i makrocitna anemija. Određivanje koncentracije tHcy zapravo može poslužiti kao biljeg za otkrivanje rizika bolesti, a sniženjem koncentracije tHcy u nekim slučajevima može spriječiti nastanak bolesti (Yuan i sur., 2018; Smith i Refsum, 2021). Za bolesti poput moždanog udara, kognitivnog oštećenja ili demencije, istraživanja su pokazala da koncentracija tHcy veća od 11 $\mu\text{mol/L}$ može dovesti do štetnih učinaka (Smith i Refsum, 2021).

1.3.1. Laboratorijsko određivanje homocisteina i drugih aminokiselina

U kliničkoj praksi je širok raspon indikacija za analizu koncentracija aminokiselina u suhoj kapi krvi, plazmi, likvoru ili urinu. Promjene koncentracija aminokiselina, osim kod IMD-ova, mogu biti osjetljivi biljezi promjena u različitim organima (Bergwerff i sur., 2017). Uzorkovanje za mjerenje aminokiselina se treba provoditi natašte, odnosno 4 sata nakon obroka, a kod male djece neposredno prije sljedećeg obroka (Sharer i sur., 2018). Za analizu aminokiselina najčešće se krv uzorkuje u epruvete s antikoagulansom K3 etilendiamintetraoctenom kiselinom (engl. *K3 ethylenediaminetetraacetic acid*, K3-EDTA). Kako bi se što više smanjio utjecaj predanalitičkih pogrešaka, preporuča se što prije centrifugirati i deproteinizirati uzorke. Uzorak krvi za mjerenje tHcy se treba odmah nakon vađenja staviti u ledenu kupelj kako bi se prekinuo metabolizam eritrocita i zaustavilo postupno oslobađanje Hcy. Nakon toga, preporuča se u što kraćem roku centrifugirati i odvojiti plazmu od pune krvi. Kod necentrifugiranih uzoraka, razine Hcy značajno rastu za oko 10% po satu i postoji mogućnost za dobivanje lažno povišenih koncentracija Hcy u plazmi (Nauck i sur., 2001). Nakon centrifugiranja, uzorke treba čuvati zamrznutim na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ do trenutka analize.

Poznato je da koncentracije aminokiselina u DBS-u dobro koreliraju s koncentracijama aminokiselina dobivenih u venskoj krvi, odnosno plazmi, ali pokazalo se da mnogi analiti, uključujući i Hcy, imaju nižu koncentraciju u DBS-u nego u uzorcima plazme. Niže koncentracije tHcy u DBS-u mogu se pripisati manjem volumenu krvi koji se sakuplja na filtarski papir u odnosu na venepunktiranu krv. Dio Hcy se može izgubiti i prilikom pripreme, ovisno o učinkovitosti ekstrakcije i derivatizacije uzorka ili zbog načina čuvanja uzoraka DBS-a (Bowron i sur., 2005; Moat i sur., 2020).

Analiza aminokiselina u laboratorijima se može provoditi ionsko izmjenjivačkom kromatografijom (engl. *Ion Exchange Chromatography*, IEC) uz korištenje ninhidrina i spektrofotometrijsku detekciju. Razvojem alternativnih metoda, koje karakterizira veća specifičnost i brzina analize, sve češće se razdvajanje aminokiselina provodi tekućinskom kromatografijom visoke ili ultra-visoke djelotvornosti (engl. *High/ Ultra Performance Liquid Chromatography*, HPLC/ UPLC). Nakon razdvajanja, aminokiseline se mogu detektirati pomoću absorbancije, fluorescencije ili spektrometrije masa. Posljednjih 15 godina, tandemski spektrometrija masa u kombinaciji s tekućinskom kromatografijom (engl. *liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*, LC-MS/MS), pokazala se kao visoko selektivna i osjetljiva metoda s velikom analitičkom specifičnošću te je postala neizostavna u kliničkoj praksi za analizu aminokiselina u plazmi, urinu i likvoru. Postupak pripreme uzoraka za LC-MS/MS metodu uključuje taloženje proteina pomoću sulfosalicilne kiseline i derivatizaciju zbog povećanja stabilnosti. Uzorci se potom razdvajaju na kromatografskoj koloni, a detekcija i kvantifikacija pojedinih aminokiselina se odvija u spektrometru masa. Prilikom pripreme uzoraka, u postupak se stavljaju komercijalni kalibratori i izotopno označeni interni standardi (IS) poznate koncentracije za svaku aminokiselinu, što omogućava kvantifikaciju po završetku analize na LC-MS/MS-u (Sharer i sur., 2018; Burtis i sur., ured., 2015).

Tijekom godina se velik broj istraživanja bavio ulogom Hcy u patofiziološkim procesima ljudskog organizma. Povećani znanstveni i klinički interes za mjerenjem koncentracije Hcy rezultirao je porastom različitih metoda za njegovo određivanje. Za postavljanje dijagnoze i praćenje osoba s klasičnom homocistinurijom, konvencionalni pristup bio je mjerenje Hcy koji nije vezan na protein kromatografijom ionske izmjene. Ograničavajući čimbenik ovog pristupa je to da koncentracija tHcy u plazmi mora biti viša od 60 $\mu\text{mol/L}$ prije nego što se slobodni Hcy

može detektirati, a to je znatno iznad normalnog referentnog raspona. Koncentracija tHcy je osjetljiviji dijagnostički parametar od koncentracije samo slobodnog Hcy pa sve analitičke metode za mjerenje tHcy zahtijevaju zasebne tehnike koje koriste snažna redukcijska sredstva za cijepanje disulfidnih veza. Osim već spomenutih kromatografskih metoda, LC-MS/MS ili HPLC s fluorescentnom detekcijom, za određivanje tHcy mogu se koristiti i imunokemijske metode koje za detekciju koriste enzime (EIA), fluorescentnu polarizaciju (FPIA) ili kemiluminiscenciju (CLIA). Referentna metoda za određivanje koncentracije tHcy u kliničkim laboratorijima je LC-MS/MS (Alam i sur., 2019; Alodaib i sur., 2012).

1.3.2. Drugostupanjski testovi kod određivanja homocisteina

Unatoč postavljanju sumnje na klasičnu homocistinuriju zbog povećane koncentracije Met u NBS programima, i dalje postoji određeni postotak lažno negativnih rezultata probira. Smanjenjem granične vrijednosti Met smanjio bi se broj lažno negativnih rezultata, ali bi se istovremeno povećala stopa lažno pozitivnih rezultata. Mijenjanje graničnih vrijednosti radi povećanja osjetljivosti dijagnostike može dovesti do smanjenja specifičnosti, što će na kraju rezultirati povećanom potrebom za nepotrebnim dodatnim testovima. Mjerenje tHcy u primarnom probiru, kako se radi u Kataru, znatno bi povećalo osjetljivost i specifičnost NBS-a za klasičnu homocistinuriju. Uz rijetke iznimke, sva novorođenčad s klasičnom homocistinurijom imala bi povećanu koncentraciju Hcy. Ipak, ovakav pristup doveo bi do povećanja troškova NBS programa izvan financijskih mogućnosti gotovo svih drugih NBS laboratorija (Levy, 2021). Najučinkovitija metoda za smanjenje lažno negativnih rezultata, bez povećanja stope lažno pozitivnih, sastojala bi se od smanjenja graničnih vrijednosti Met na 40 $\mu\text{mol/L}$, ali uz dodatnu kontrolu omjera metionina i fenilalanina (Met/Phe) obzirom da se oba analita već mjere u NBS programu bez dodatnih troškova. Uzorak s koncentracijom Met iznad granice cut-off-a i povećanim omjerom Met/Phe bio bi izdvojen za određivanje koncentracije tHcy, a samo ona novorođenčad čiji je tHcy povišen, bila bi pozvana na dodatnu obradu. Korištenje koncentracije Met i omjera Met/Phe kao jednako vrijednih analita u primarnom probiru, rezultiralo bi s približno 10% uzoraka koji bi se morali analizirati drugostupanjskim testom, odnosno mjerenjem koncentracije tHcy, a to predstavlja optimalnu strategiju za provođenje probira (Candela i sur., 2023; Okun i sur., 2017).

1.4. Tandemska spektrometrija masa (LC-MS/MS)

Tandemska spektrometrija masa povezana s tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti je izrazito osjetljiva tehnologija koja omogućava istovremenu detekciju velikog broja komponenti uzorka i njihovu kvantifikaciju iz male količine uzorka. Među različitim kromatografskim tehnikama koje su razvijane tokom godina, HPLC metoda uvelike je poboljšala i zamijenila tradicionalne LC metode zbog svoje veće moći razlučivanja i veće brzine razdvajanja (https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basics_of_lcms/ms_and_lcms.html). Maseni spektrometri (MS) u kombinaciji s plinskim ili tekućinskim kromatografima, omogućili su dodatno proširenje analitičkih mogućnosti te danas imaju razne kliničke primjene (Garg i Zubair, 2023; Mittal, 2015).

Kod LC-MS/MS tehnologije, tekućinskom kromatografijom uzorci se prvo razdvajaju na koloni na temelju njihovog afiniteta za interakciju s mobilnom, odnosno stacionarnom fazom, a potom se unose u MS. Svi MS-ovi sastavljeni su od tri glavne komponente koje uključuju: izvor iona u kojem se molekule uzorka ioniziraju, analizator masa u kojem se nastali ioni razdvajaju na temelju omjera njihove mase i naboja (m/z), te detektora. Analiti razdvojeni na kromatografskoj koloni se u protoku mobilne faze uvode u izvor MS-a, gdje se, kombinacijom visokog napona i temperature, prevode u aerosol i istovremeno ioniziraju. Najčešće korištena tehnika ionizacije je elektrosprejna ionizacija (engl. *electrospray ionization*, ESI). Ionizirani analiti se potom razdvajaju na temelju omjera m/z u masenom analizatoru, dok se neutralne čestice i eventualne nečistoće uklanjaju vakuumom (Garg i Zubair, 2023). U laboratorijskoj dijagnostici najčešće korišten MS je kvadrupolni analizator. Ioni razdvojeni u MS-u u konačnici dolaze do detektora gdje se svaki ionski udar zabilježi i prevede u signal izravno proporcionalan koncentraciji analita u uzorku.

LC-MS/MS podrazumijeva dva MS-a spojena u seriju kolizijskom ćelijom (engl. *Collision cell*), čime se povećava osjetljivost i specifičnost analize. Kolizijska ćelija je dodatni maseni kvadrupolni analizator u kojem se ne vrši selekcija iona, već se ioni propuštenu kroz prvi MS nasumično fragmentiraju u sudaru s molekulama inertnog plina, a nastali fragmenti ulaze u treći MS gdje se dodatno selektiraju i propuštaju do detektora. Ovisno o načinu propuštanja i fragmentacije ioniziranih analita, na LC-MS/MS-u postoji mogućnost primjene različitih modova rada (Thomas i sur., 2022; Burtis i sur., ured., 2015).

Uvođenje LC-MS/MS-a u rutinsku laboratorijsku dijagnostiku značajno je povećao broj poremećaja koji se mogu prepoznati NBS-om. Istovremena detekcija velikog broja metabolita i njihovih omjera iz jednog uzorka DBS-a u kratkom vremenu omogućila je bolje razlikovanje nutritivnog statusa djeteta od eventualnih patoloških profila te još jednom potvrdila izuzetnu važnost odgovarajućeg vremena uzorkovanja DBS-a te granične vrijednosti analita primjerene dobi djeteta. Ipak, za potvrdu dijagnoze kod asimptomatskih pacijenata moraju se koristiti specifičniji testovi, čija kombinacija je ključna kod diferencijalne dijagnostike pozitivnih rezultata NBS-a (Burtis i sur., ured., 2015).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Novorođenački probir u Republici Hrvatskoj je obavezna mjera zdravstvene zaštite novorođenčeta. Za sada je u nacionalni program novorođenačkog probira uvršteno devet poremećaja. Međutim, u planu je proširenje probira koje će najprije započeti s klasičnom homocistinurijom. Pravovremeno postavljanje dijagnoze klasične homocistinurije smanjuje mogućnost nastanka ozbiljnih komplikacija bolesti: intelektualnih poteškoća, abnormalnosti kostiju, problema s očima te kardiovaskularnih promjena (Muačević-Katanec i sur., 2014).

Cilj ovog rada je provjera mogućnosti određivanja koncentracije tHcy iz uzorka DBS-a metodom tandemske spektrometrije masa, kao drugostupanjskog testa, u provođenju novorođenačkog probira na klasičnu homocistinuriju. U tu svrhu napravljena je usporedba mjerenja koncentracije tHcy iz uzoraka suhe kapi krvi na filtarskom papiru i uzoraka plazme.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Uzorci pacijenata

Za eksperimentalni dio ovog rada korišteni su uzorci plazme i suhe kapi krvi 30 ispitanika u dobi od 3 do 83 godine. Uzorci plazme (K₃-EDTA) dobiveni su tako da se nakon vađenja venske krvi epruveta uronila u ledenu kupelj i potom centrifugirala unutar sat vremena. Uzorci DBS-a dobiveni su kapanjem 50 µL EDTA krvi na standardizirani sterilni filtarski papir Whatman903®.

3.2. Materijali

Kako bi se izračunale i usporedile preciznost i točnost metoda određivanja tHcy u plazmi i u DBS-u, korišteni su komercijalni kontrolni uzorci njemačke tvrtke *Recipe, ClinChek® Controls* (Plasma Control i Dried Blood Spot Control). Kontrole za određivanje plazme dolaze u liofiliziranom obliku, dok kontrole za DBS sadrže punu krv na filtarskoj test kartici. Za određivanje tHcy iz uzoraka plazme i DBS-a, korištene su već validirane metode u Odjelu za laboratorijsku dijagnostiku nasljednih metaboličkih bolesti i novorođenački probir, a metoda određivanja tHcy iz plazme koristi se u rutinskom radu.

Tablica 2. Koncentracijsko područje komercijalnih kontrolnih uzoraka.

VRSTA UZORKA	KONTROLA	METODA ANALIZE	SREDNJA VRIJEDNOST KONCENTRACIJE [µmol/L]	KONCENTRACIJSKO PODRUČJE [µmol/L]
PLAZMA LOT 2360	Level I (23080)	LC-MS/ MS	11,5	9,20-13,8
	Level II (23081)		27,3	21,8-32,7
DBS LOT 1329	Level I		18,0	12,6-23,4
	Level II		44,5	31,2-57,9

Pomoću seta kalibratora *ClinCal® Calibrators* radi se kalibracijska krivulja u četiri koncentracijske razine. Kalibratori za plazmu su liofilizirani, a za DBS se koriste kalibratori koji su dobiveni kapanjem svježe krvi na standardizirani filtarski papir.

Tablica 3. Koncentracijsko područje kalibratora.

VRSTA UZORKA	KALIBRATOR	METODA ANALIZE	KONCENTRACIJA [μmol/L]
PLAZMA LOT 2171	Level 0	LC- MS/MS	6,11
	Level 1		10,2
	Level 2		20,9
	Level 3		49,9
DBS LOT 1329	Level 0		10,0
	Level 1		15,7
	Level 2		32,0
	Level 3		44,8

Kontrole i kalibratori za analizu pripremaju se jednako kao i uzorci pacijenata, a prema njima se treba odnositi kao da su potencijalno infektivni iako su testirani na prisutnost određenih infekcija i bolesti. Kalibraciju je potrebno raditi u svakoj seriji uzoraka.

3.2.1. Kemikalije

Tijekom provođenja analize korištena su dva komercijalna kompleta reagensa njemačke tvrtke *Recipe, ClinMass®* za određivanje tHcy u plazmi (MS2000), odnosno *ClinSpot®* za određivanje tHcy iz DBS-a (MS2100).

Komplet reagensa *ClinMass®* sadrži:

- Otopinu za ispiranje, MS2005
- Mobilnu fazu, MS2010
- Interni standard, liofiliziran, MS2012
- Reagens A za redukciju, MS2021
- Reagens B za precipitaciju, MS2022

Komplet reagensa *ClinSpot*® sadrži:

- Otopinu za ispiranje, MS2005
- Mobilnu fazu, MS2010
- Interni standard, liofiliziran, MS2112
- Reagens A, MS2021
- Reagens B, MS2022

3.2.2. Oprema i uređaji

- LC-MS/MS 8050-UPLC Nexera (Shimadzu)- tandemski spektrometar s pripadajućim *LabSolution* računalnim programom za obradu podataka
- Mikrocentrifuga Eppendorf 5430
- Treskalica BioSan
- Vortex mješalica
- Eppendorf epruvete
- Automatske pipete i nastavci za pipete (10-100 µL; 20-200 µL)
- Staklene bočice s mikroinsertima za uzorkovanje (vialice)
- Ručni pribor za izrezivanje isječaka uzoraka suhe kapi krvi na filtarskom papiru promjera 3,1 mm (DBS puncher)
- Hladnjak (temperature +4°C)

3.3. LC-MS/MS metoda

3.3.1. Predanalitička faza

a. Plazma

Preporučeni uzorak za određivanje tHcy LC-MS/MS-om je K₃-EDTA plazma. Uzorak K₃-EDTA plazme mora biti uzet ujutro natašte i dostavljen u ledenoj kupelji u laboratorij. U što kraćem roku potrebno je odvojiti plazmu od stanica centrifugiranjem kako ne bi došlo do *in vitro* sinteze Hcy u eritrocitima. Uzorci se centrifugiraju u centrifugi s hlađenjem na 4 °C te su stabilni do 48 sati na temperaturi 15-30 °C, do 7 dana na temperaturi 2-8 °C, do 3 mjeseca na -18 °C.

ClinChek® Plasma Controls, *ClinCal® Calibrators* i IS su u liofiliziranom obliku i moraju se pripremiti za upotrebu tako da se pomiješaju s HPLC vodom. IS se otapa u 5 ml HPLC vode lagano miješajući, a nakon alikvotiranja 1000 µL u Eppendorf epruvete zamrzava se na -18°C. Kalibratori u 4 koncentracijske razine otapaju se u 1 mL HPLC vode lagano miješajući 15 minuta na sobnoj temperaturi, alikvotiraju se u Eppendorf epruvete (120 µL) i zamrzavaju na -18°C, a tako skladišteni su stabilni 3 mjeseca. Kontrolni uzorci otapaju se u 3 mL HPLC vode lagano miješajući 15 minuta, 120 µL se alikvotira u Eppendorf epruvete te se zamrzavaju na -18°C i stabilni su kao i kalibratori. Reagens A se mora otopiti u 5 mL HPLC vode uz povremeno rotiranje bočice kroz 5 minuta. Tako pripremljeni reagens stabilan je do 4 tjedna ako se pohranjuje na temperaturi od 2 do 8 °C. Reagens B dolazi u obliku otopine te se pohranjuje na sobnoj temperaturi.

Priprema uzoraka plazme uključuje redukciju analita kako bi se svi oblici Hcy preveli u slobodni homocistein, koji se zapravo određuje, te precipitaciju proteina. Uzorci se pripremaju u Eppendorf epruvetama koje se obilježe oznakama uzoraka te se u svaku doda 50 µL uzorka plazme (kalibrator, kontrola, uzorak), 50 µL IS za identifikaciju pika Hcy i 50 µL Reagens A. Uzorci se miješaju 30 sekundi na vrtložnoj miješalici (vortex) te inkubiraju 5 min na sobnoj temperaturi. Zatim se u reducirane uzorke dodaje 200 µL Reagens B koji služi za precipitaciju. Ponovno je potrebno 30 sekundi miješati uzorke na vortex miješalici, inkubirati ih 5 minuta na 4°C i na kraju centrifugirati 5 minuta na 10000 x g u mikrocentrifugi Eppendorf 5430. Supernatant se odvoji od taloga i prenese u prethodno označene bočice (vialice) za LC-MS/MS analizu. Automatski dio za uzorkovanje na LC-MS/MS-u (engl. *Autosampler*) uzima po 1 µL uzorka u postupak. Ukoliko se uzorci neće analizirati odmah nakon pripreme, moguće ih je pohraniti na sobnoj temperaturi (15-30 °C) 24 sata, na temperaturi od 2 do 8 °C oko 7 dana i na temperaturama nižim od 18 °C mjesec dana. Višestruka odmrzavanja i zamrzavanja bi se trebala izbjegavati.

b. Suha kap krvi (DBS)

Uzorci DBS-a za određivanje tHcy dobiveni su kapanjem venske krvi s K3-EDTA kao antikoagulansom, na standardizirani sterilni filtarski papir prema međunarodnom CLSI standardu. Nakapani uzorci se suše na sobnoj temperaturi bez izlaganja direktnom sunčevom

svjetlu barem 4 sata. Stabilnost uzoraka na sobnoj temperaturi (15-30 °C) i niskoj vlažnosti zraka (< 30%) je oko 7 dana, dok na temperaturi između 2 i 8 °C, uzorci mogu biti do 4 tjedna.

ClinCal® Dried Blood Spot Calibrators i *ClinChek® Dried Blood Spot Controls* sadrže punu krv na filtarskom papiru. IS je liofiliziran i potrebno ga je otopiti u 5 mL HPLC vode te lagano miješati, a može se skladištiti na -18°C. Regens A priprema se otapanjem u 5 mL HPLC vode uz povremeno rotiranje bočice oko 5 minuta. Tako pripremljeni reagens stabilan je do 4 tjedna ako se pohranjuje na temperaturi od 2 do 8 °C. Reagens B dolazi u obliku otopine te se pohranjuje na sobnoj temperaturi.

Kako bi pripremili uzorke potrebno je obilježiti Eppendorf epruvete i u svaku staviti isječak DBS-a promjera 3,1 milimetra (kalibrator, kontrola, uzorak), dobivenog pomoću ručnog pribora za izrezivanje isječaka DBS-a na filtarskom papiru, te dodati 15 µL IS i 15 µL Reagens A. Svaku epruvetu potrebno je zatim 30 sekundi miješati na vortex miješalici, a nakon toga se u reducirane uzorke dodaje 100 µL Reagens B za precipitaciju. Uzorci se stavljaju na tresilicu BioSan 10 minuta, a onda centrifugiraju 5 minuta na 3000 x g u mikrocentrifugi Eppendorf 5430. Supernatant se odvoji od taloga i prenese u prethodno označene bočice (vialice) za LC-MS/MS. Automatski dio za uzorkovanje na LC/MS-MS uzima po 1 µL uzorka u postupak.

3.3.2. Analitička faza

Pripremljeni uzorci analizirani su na tandemskom spektrometru masa udruženom s tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti, LC-MS/MS 8050-UPLC Nexera (Shimadzu).

Nakon kromatografskog razdvajanja pomoću HPLC-a analiti se ioniziraju elektrosprej ionizacijom (ESI) tijekom koje se uzorci prevode u aerosol. 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 m/z i propušta samo njih u prvom kvadrupolu (engl. *Precursor ions*). Nakon prvog kvadrupola dolazi do kolizijske ćelije gdje se ioni dodatno fragmentiraju pomoću inertnog plina, a nastali fragmenti su ioni određenog m/z koji prolaze kroz treći kvadrupol i dolaze do detektora (engl. *Product ions*). (Tablica 4. Prijelazi masa) Svaki nastali ionizirani fragment karakteriziran je specifičnim vremenom zadržavanja.

Tablica 4. Prijelazi masa.

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

3.3.3. Poslijeanalitička faza

Nakon završetka analize, važno je pregledati kalibracijsku krivulju, vrijednosti kontrolnih uzoraka te rezultate pacijenata i procijeniti potrebu za eventualnim ponavljanjem analize. Računalni program *LabSolutions* automatski izrađuje kalibracijsku krivulju iz koje se izračunava koncentracija tHcy u svakom uzorku. Dobivene koncentracije tHcy u $\mu\text{mol/L}$ upisuju se s jednim decimalnim mjestom u Laboratorijski informacijski sustav (LIS).

Na temelju dobivenih podataka napravljena je statistička obrada te su uspoređene metode određivanja koncentracije tHcy u uzorcima DBS-a i plazme.

3.4. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišteni su računalni programi *Microsoft Office Excel 365*, *Microsoft Office Word 365* i *MedCalc®*.

3.4.1. Usporedivost

Usporedba metoda ima važnu ulogu u procesu validacije analitičkih metoda i instrumenata jer se s njom utvrđuje odstupanje između dva mjerna postupka koji mjere istu veličinu. Cilj usporedbe je donošenje zaključka postoji li statistički značajna razlika između te dvije metode prilikom analize uzoraka pacijenata, te zadovoljavaju li ove metode kriterije postavljene od strane laboratorija i proizvođača. Ako je razlika između dvije metode mala i klinički prihvatljiva, obje metode se mogu koristiti istovremeno. Za statističku obradu rezultata u usporedbi koncentracija tHcy u uzorku plazme i DBS-a prvo je napravljen vizualni pregled uz pomoć dijagrama raspršenja, a potom je određen koeficijent korelacije te ispitana normalnost

razdiobe podataka uz pomoć histograma. Za usporedbu podataka i za procjenu slaganja dvije metode korišteni su Wilcoxonov test, Passing-Bablok regresija i Bland-Altman analiza.

U prvom koraku kod ispitivanja usporedivosti metoda potrebno je vizualno provjeriti postoje li ekstremne vrijednosti (engl. *outliers*) u dobivenim podacima ili grube pogreške koje su mogle nastati prilikom upisa podataka. Također je potrebno pregledati raspon vrijednosti obuhvaćenih usporedbom. Za vizualni pregled dobivenih podataka mogu se koristiti grafovi raspršenja vrijednosti (engl. *scatter plot*) koji daju informacije o postojanju i snazi odnosa između dvije varijable u ravnini. Ako vrijednosti dvaju skupova podataka imaju tendenciju grupiranja oko linije koja se uspinje prema gore s lijeva na desno, zaključuje se da je riječ o pozitivnom linearnom odnosu. Ako se pak vrijednosti grupiraju oko linije koja pada prema dolje s lijeva na desno, tada je riječ o negativnom linearnom odnosu. Koeficijentom korelacije (r) mogu se opisati jačina i smjer linearnog odnosa, ali ne i njihovo slaganje, odnosno korelacija ne može otkriti postoji li konstantna ili proporcionalna razlika između dvije metode. Vrijednosti r blizu 0 označavaju slab odnos, dok vrijednosti blizu ± 1 odgovaraju vrlo snažnoj vezi između dvije metode (Bilić-Zulle, 2011; Kirk, 2023). Koeficijent korelacije se može izračunati pomoću različitih alata i programa, primjerice *Microsoft Office Excel 365* i *MedCalc®*. Za podatke koji nisu normalno distribuirani, kao mjera povezanosti za procjenu jačine i smjera monotonog odnosa između dvije kontinuirane varijable koristi se Spearmanov koeficijent korelacije. On može imati vrijednost između -1 do +1, gdje pozitivna vrijednost pokazuje da postoji pozitivan odnos između dvije varijable, a negativna vrijednost označava negativan odnos (<https://www.geeksforgeeks.org/spearmans-rank-correlation/>).

Wilcoxonov test (Wilcoxon signed-rank test) je neparametrijski statistički test koji uspoređuje dvije povezane grupe podataka, odnosno rezultate uzoraka istih sudionika. Ekvivalent je t-testu uparenih uzoraka, a trebao bi se koristiti kada podatci ne prate normalnu raspodjelu. Ako je rezultirajuća P-vrijednost manja od 0,05 ($P < 0,05$) može se zaključiti da se medijan razlika između uspoređivanih podataka statistički značajno razlikuje od 0 (<https://www.medcalc.org/manual/wilcoxon.php>).

Grafovi razlike između dobivenih mjerenja (engl. *difference plot*) obično se koriste kod opisivanja razlike između dvije varijable. Dva najčešća tipa grafova razlike su Passing-Bablok regresija i Bland-Altman dijagram. Bland-Altman analiza se koristi za opisivanje slaganja između

dva kvantitativna mjerenja tako da se konstruiraju granice slaganja. Na dijagramu raspršenosti se na apscisi nalazi aritmetička sredina rezultata dviju metoda, a na ordinati razlika između rezultata te dvije metode. Ovaj prikaz služi za vizualnu procjenu odstupanja između srednjih vrijednosti razlika mjerenja i intervala podudarnosti unutar kojeg se nalazi 95%-tna razlika između mjerenja. Srednja razlika daleko od vrijednosti 0 može ukazivati na sistemsku razliku između metoda. Bland-Altman analiza definira interval podudarnosti, ali ne govori o tome je li on prihvatljiv ili nije, a također ako podatci nisu normalno raspodijeljeni i radi se o malom broju uzoraka, ova metoda nije toliko pouzdana prema predloženom (Giavarina 2015; Kaur i Stoltzfus, 2017).

Passing-Bablok regresija koristi se za procjenu stupnja usklađenosti ili sličnosti između dvije metode koje mjere istu ili sličnu varijablu. Ovaj model za usporedbu metoda nije osjetljiv na ekstremne vrijednosti, pretpostavlja da pogreške mjerenja imaju istu raspodjelu u obje metode koja ne mora biti normalna, a važno je da mjerenja pokrivaju širok raspon koncentracija te da dvije metode koje uspoređujemo imaju međusobno linearan odnos. Rezultati dobiveni Passing-Bablok regresijskom analizom mogu se prikazati na dva načina, dijagramom raspršenja s regresijskim pravcem koji omogućava vizualni pregled izmjerenih podataka, te regresijskom jednadžbom ($y = a + bx$) kod koje odsječak i nagib predstavljaju konstantno, odnosno proporcionalno odstupanje. Ako 95%-tni interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*, CI) za odsječak pravca a uključuje vrijednost 0, može se zaključiti da nema konstantnog odstupanja između metoda, a ukoliko 95%-tni CI za nagib pravca b uključuje vrijednost 1, tada nema proporcionalnog odstupanja između dvije metode. U tom slučaju se može pretpostaviti da je $y=x$ i da ne postoji značajna razlika u metodama (Bilić-Zulle, 2011).

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Rezultati

4.1.1. Usporedivost rezultata

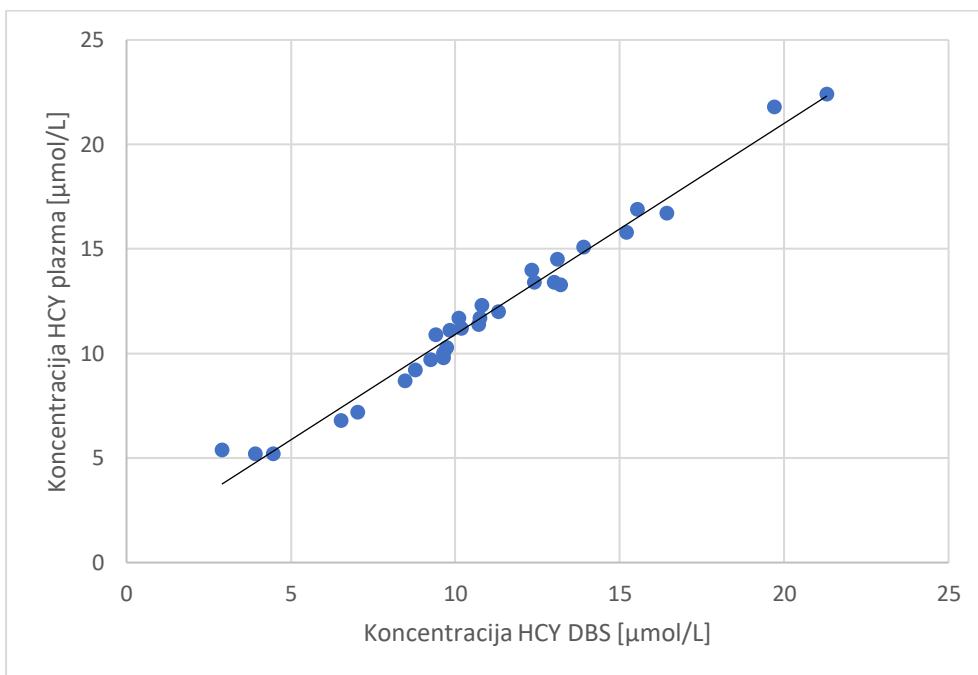
Prema postupcima opisanim u poglavlju 3.3. *LC-MS/MS metoda* dobiveni rezultati mjerenja koncentracija tHcy u uzorcima plazme i DBS-a su međusobno uspoređeni korištenjem programa *Microsoft Office Excel 365* i *MedCalc®*. Sve vrijednosti su prikazane u Tablici 5.

Tablica 5. Prikaz rezultata mjerenja homocisteina u uzorcima plazme i suhe kapi krvi.

Redni broj uzorka	Rezultati HCY	Rezultati HCY
	DBS [$\mu\text{mol/L}$]	plazma [$\mu\text{mol/L}$]
1.	15,53	16,9
2.	8,77	9,2
3.	10,74	11,7
4.	9,64	10,0
5.	10,8	12,3
6.	13,0	13,4
7.	19,7	21,8
8.	16,42	16,7
9.	10,18	11,2
10.	6,51	6,8
11.	9,24	9,7
12.	9,72	10,3
13.	7,02	7,2
14.	12,31	14,0
15.	9,64	9,8

16.	8,46	8,7
17.	4,45	5,2
18.	12,39	13,4
19.	13,1	14,5
20.	13,2	13,3
21.	9,82	11,1
22.	21,3	22,4
23.	11,3	12,0
24.	13,9	15,1
25.	10,1	11,7
26.	10,7	11,4
27.	15,2	15,8
28.	9,4	10,9
29.	3,9	5,2
30.	2,9	5,4

a. Dijagram raspršenja



Slika 2. Dijagram raspršenja- grafički prikaz rezultata dobivenih mjerenjem koncentracija homocisteina u suhoj kapi krvi i plazmi

Iz dijagrama raspršenja (Slika 2.) vidljivo je da nema ekstremnih vrijednosti (engl. *outliers*) niti značajnijeg odstupanja od dobivenog pravca. Uzorci se većinom nalaze u području referentnog intervala za tHcy, a to je koncentracija niža od 15 µmol/L.

b. Korelacija

Variable Y	HCY_PLAZMA
Variable X	HCY_DBS
Sample size	30
Correlation coefficient r	0.9844
Significance level	P<0.0001
95% Confidence interval for r	0.9671 to 0.9926

Slika 3. Korelacijska tablica

Numerička vrijednost koeficijenta korelacije r kreće se od -1,0 do +1,0 i to daje predodžbu o snazi linearnog odnosa između varijabli. U ovom slučaju koeficijent korelacije iznosi 0,9844 što je vrlo blizu 1,0 i $P < 0,0001$ te se iz toga može pretpostaviti da postoji povezanost između dvije varijable (Slika 3.). Kako bi se procijenilo jesu li razlike između dvije metode određivanja istog analita značajne, treba proučavati razlike, a ne slaganje. U tom slučaju korelacija bi mogla dovesti do pogrešnog zaključka i zato se ne bi trebala koristiti za procjenu usporedivosti metoda bez dodatne statističke obrade podataka.

c. Wilcoxonov test

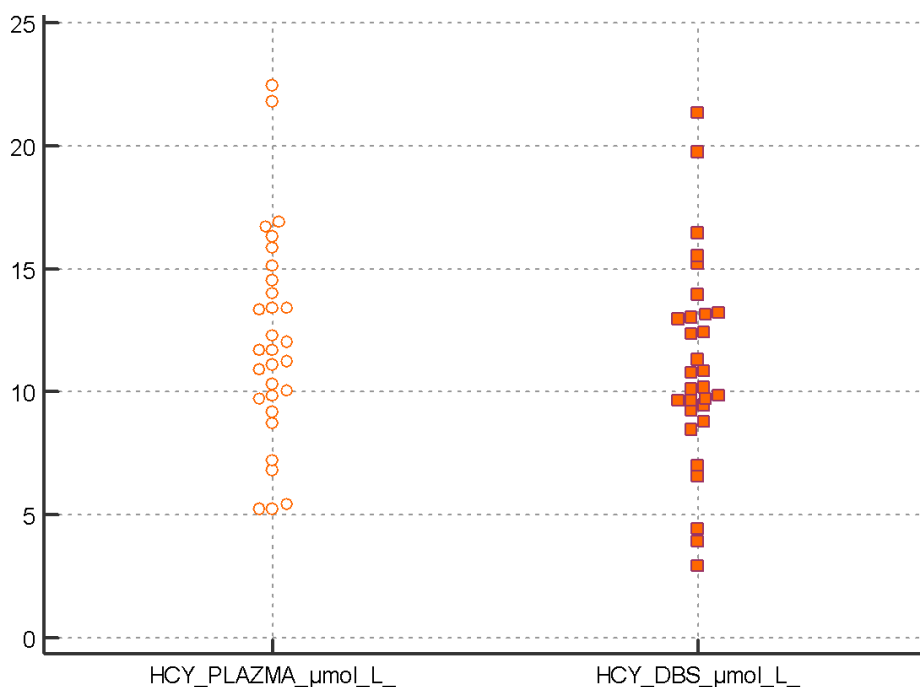
Sample 1	HCY_PLAZMA	
Sample 2	HCY_DBS	
	Sample 1	Sample 2
Sample size	30	30
Lowest value	5.2000	2.9000
Highest value	22.4000	21.3000
Median	11.7000	10.4600
95% CI for the median	10.0525 to 13.4000	9.6400 to 12.8190
Interquartile range	9.7000 to 14.5000	9.2400 to 13.1000

Wilcoxonov test (uspoređeni uzorci)

Number of positive differences	0
Number of negative differences	30
Large sample test statistic Z	4.782139
Two-tailed probability	$P < 0.0001$

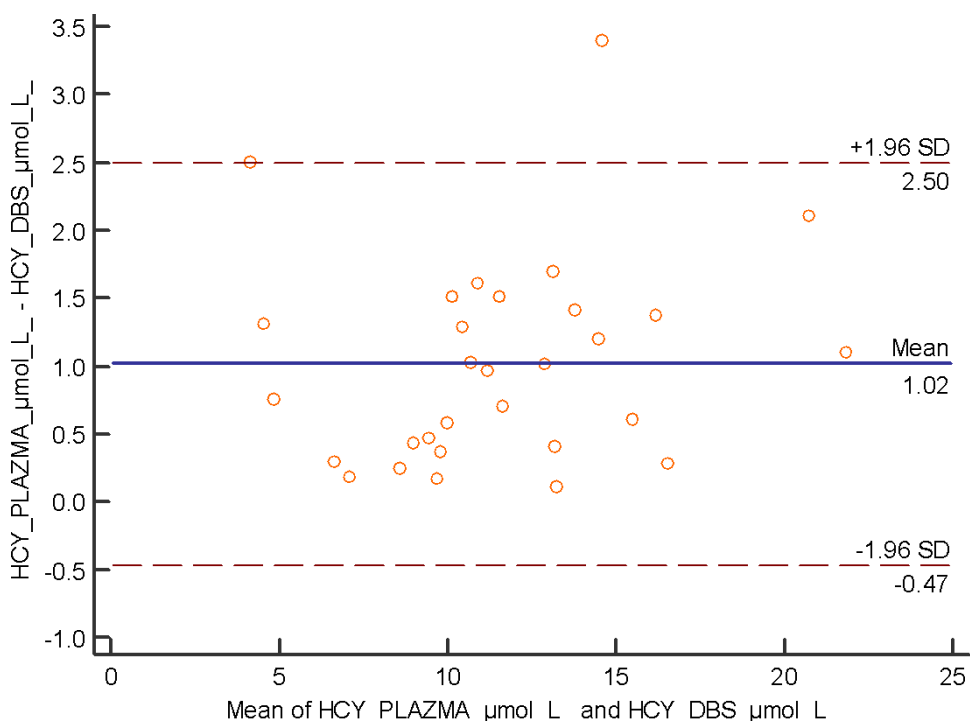
Slika 4. Wilcoxonov test usporedbe koncentracija homocisteina u uzorcima suhe kapi krvi i plazme

Vizualnom procjenom utvrđeno je da koncentracije tHcy izmjerene u uzorcima plazme i DBS-a odstupaju od normalne razdiobe. Zbog toga je za ispitivanje razlike među metodama korišten Wilcoxonov parni test (Slika 4. i Slika 5.). P vrijednost je manja od 0,0001, no intervali pouzdanosti se preklapaju i to može ukazivati na nepostojanje statistički značajne razlike između metoda. 95%-tni interval pouzdanosti za tHcy u DBS-u iznosi 9,6400 – 12,8190, a za tHcy u plazmi iznosi 10,0525 – 13,4000.



Slika 5. Grafički prikaz koncentracija homocisteina u uzorcima suhe kapi krvi i plazme

d. Bland-Altmanov dijagram



Slika 6. Bland-Altmanov dijagram- srednja razlika između rezultata homocisteina izmjerenog metodom iz suhe kapi krvi i iz plazme

Na Bland-Altmanovom dijagramu (Slika 6.) vidljivo je da prosjek razlika između dviju uspoređenih metoda iznosi 1,02 jedinice, što bi značilo da u prosjeku metoda kojom se tHcy određuje u plazmi mjeri 1,02 jedinice više od metode određivanja tHcy u DBS-u. Jedna točka u dijagramu izlazi iz granica prihvatljivosti koje obuhvaćaju raspon definiran sa $\pm 1,96$ standardne devijacije od srednje vrijednosti i ona je označena kao *outlier*. Razlike između dvije metode prikazane su u odnosu na srednju vrijednost dvaju mjerenja, a iscrtavanje razlike omogućuje istraživanje odnosa između pogreške mjerenja i prave vrijednosti (Giavarina, 2015).

e. Passing-Bablok regresija

Variable X	HCY_DBS_μmol_L_	
Variable Y	HCY_PLAZMA_μmol_L_	
Sample size	30	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	2.9000	5.2000
Highest value	21.3000	22.4000
Arithmetic mean	11.0517	12.0667
Median	10.4600	11.7000
Standard deviation	4.1465	4.2886
Standard error of the mean	0.7570	0.7830

Jednadžba regresije

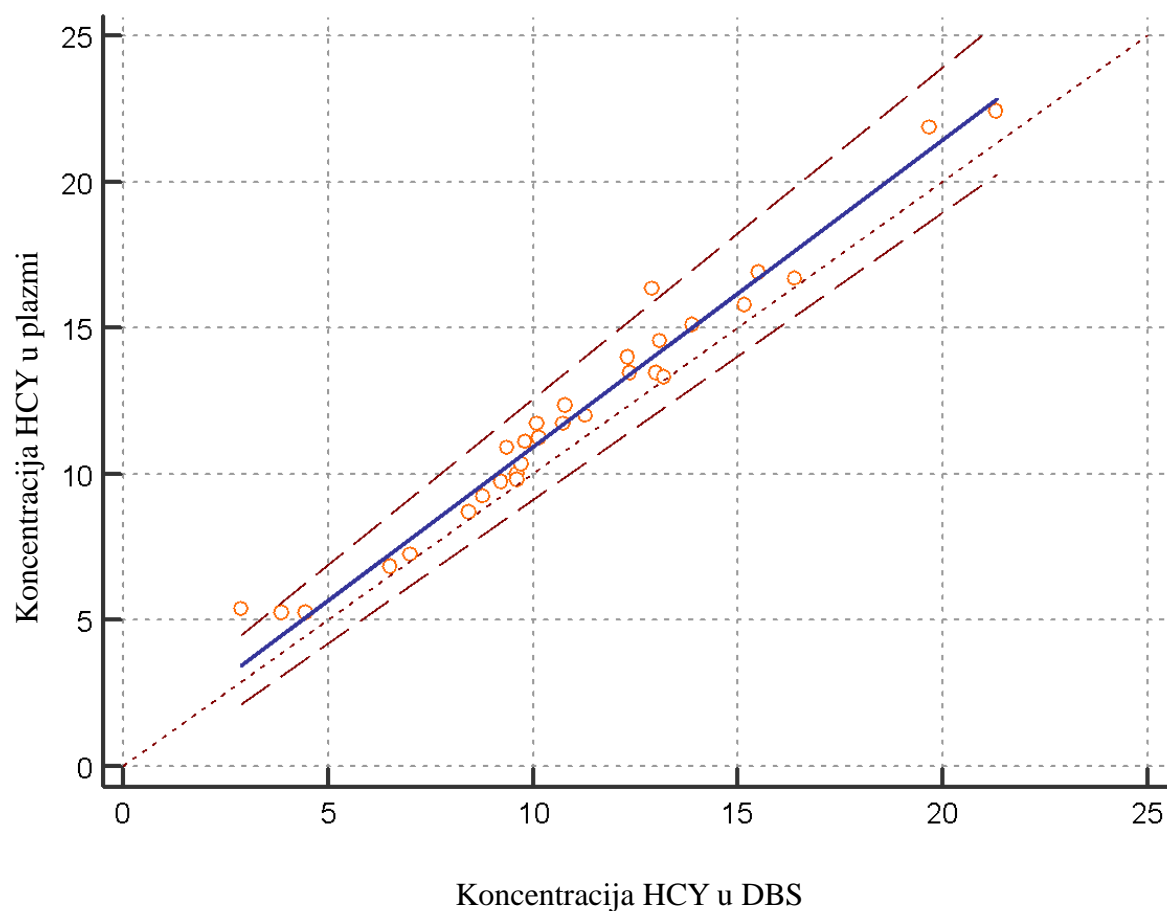
$y = 0.371269 + 1.053068 x$	
Systematic differences	
Intercept A	0.3713
95% CI	-0.7229 to 1.1663
Proportional differences	
Slope B	1.0531
95% CI	0.9831 to 1.1391
Random differences	
Residual Standard Deviation (RSD)	0.5401
± 1.96 RSD Interval	-1.0586 to 1.0586
Linear model validity	

Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0.34)
--------------------------	--

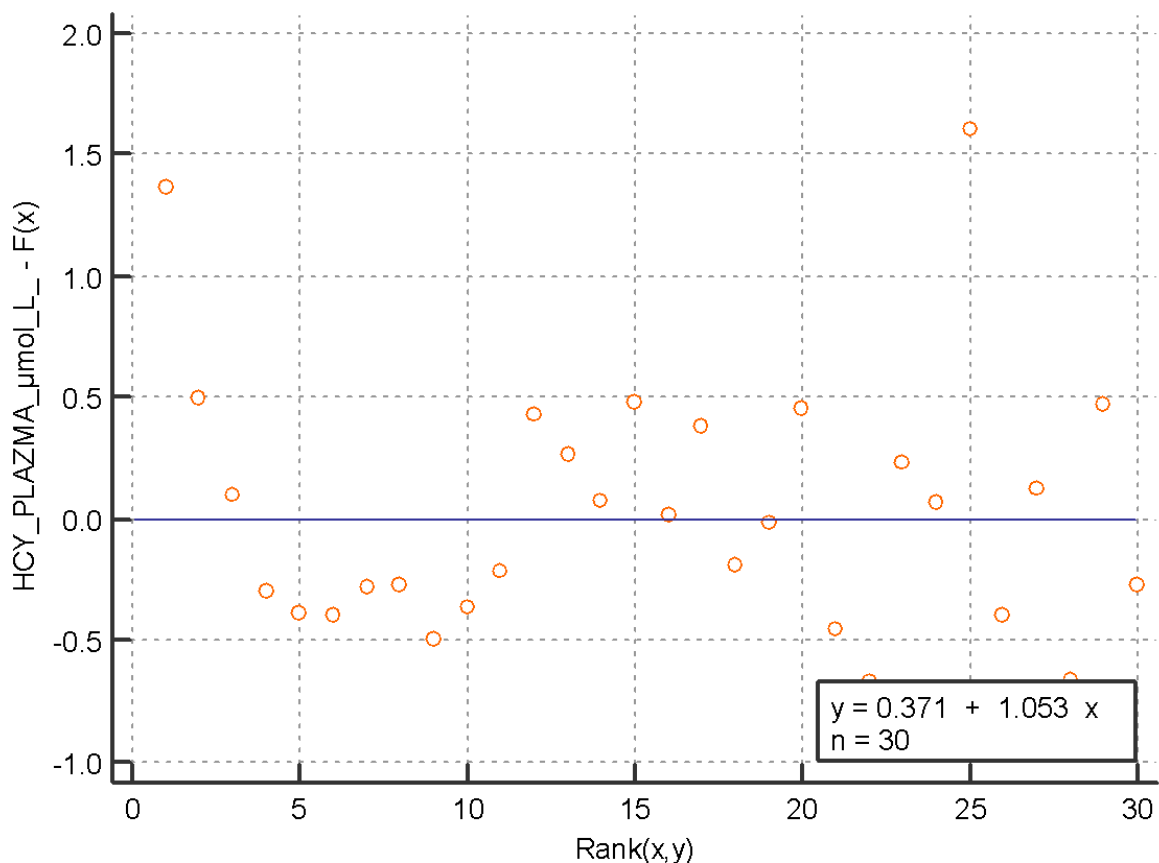
Spearmanov koeficijent korelacije

Correlation coefficient	0.980
Significance level	P<0.0001
95% CI	0.958 to 0.991

Slika 7. Passing-Bablok regresijska analiza



Slika 8. Passing-Bablok dijagram s regresijskim pravcem (plava linija) i intervalima pouzdanosti regresijskog pravca (iscrtkane linije)



Slika 9. Passing-Bablok dijagram reziduala

Cusumov test linearnosti pokazuje da nema znatnog odstupanja od linearnosti, a vrijednost $P = 0,34$ to i potvrđuje. Ovim testom se procjenjuje koliko dobro linearni model odgovara podacima i testira primjenjivost Passing-Bablok metode.

Passing-Bablokovom regresijskom analizom dobivena je jednadžba pravca $y = 0.3713 + 1.0531x$. 95%-tni interval pouzdanosti (95% CI) za odsječak a koji daje informaciju o sistemskim razlikama iznosi od -0,7229 do 1,1663, a 95% CI za nagib b koji predstavlja proporcionalne razlike iznosi od 0,9831 do 1,1391. Svi rezultati mogu se vidjeti na Slici 7., a grafički prikaz regresijskog pravca na Slici 8. Na Passing-Bablok dijagramu reziduala (Slika 9.) podudaranje između dvije metode mjerenja procjenjuje se prema tome koliko su rezidualne vrijednosti raspoređene oko središnje linije. Ako su reziduali ravnomjerno raspoređeni duž linije, to ukazuje na dobro podudaranje između metoda mjerenja.

S obzirom da 95%-tni CI za odsječak a uključuje 0, to ukazuje da nije prisutno konstantno odstupanje između dvije metode. Isto tako, 95%-tni CI za nagib b uključuje 1 što znači da ne postoji proporcionalno odstupanje između metoda. Passing-Bablokovom regresijskom analizom zaključuje se da ne postoji odstupanje između dvije uspoređivane metode.

Spearmanov koeficijent korelacije iznosi 0,980 što pokazuje dobru povezanost između metoda, a također je dobivena P vrijednost manja od 0,0001 (Slika 7.). Spearmanova korelacija korištena je zbog malog broja uzoraka iskorištenih za usporedbu dvije metode i na temelju činjenice da podatci ne prate normalnu razdiobu. Iz dobivenih rezultata zaključuje se postojanje pozitivne korelacije između dobivenih koncentracija tHcy u uzorcima plazme i DBS-a.

4.2. Rasprava

Novorođenački probir u Republici Hrvatskoj obavezna je mjera zdravstvene zaštite novorođenčeta s ciljem pravovremenog prepoznavanja IMD-ova i drugih prirodnih bolesti te što ranijeg početka njihovog liječenja. Uvođenje LC-MS/MS tehnologije u NBS laboratorije, omogućilo je povećanje broja različitih poremećaja koji se mogu prepoznati probirom, a među njima se nalazi i klasična homocistinurija (Gramer i Hoffmann, 2022). Ako se pravovremeno ne prepozna i ne započne s liječenjem, ova bolest uzrokuje mentalnu retardaciju, psihijatrijske poremećaje, kardiovaskularne poremećaje, osobito sklonost trombozi i aterosklerozi, te malformacije kostura i osteoporozi. Međutim, novorođenčad kod kojih je klasična homocistinurija prepoznata u NBS-u i započeto je rano liječenje, imala su normalan rast i razvoj. U Irskoj, 18 od 21 osobe u dobi do 25 godina, koje su identificirane u sklopu NBS-a na piridoksin nereagirajuću homocistinuriju, a pravovremeno su započele terapiju, nisu imale komplikacija (Morris i sur., 2017). Dvanaest osoba u Engleskoj kod kojih je klasična homocistinurija prepoznata NBS-om i započeto rano liječenje, imalo je medijan IQ-a od 100, u usporedbi s medijanom IQ-a od 58 kod osoba kojima je poremećaj dijagnosticiran u kasnijoj fazi života (Levy, 2021; Peterschmitt i sur., 1999). Ovi rezultati, ali i mnoga druga istraživanja potakla su postupno uključivanja klasične homocistinurije u programe NBS-a u Sjedinjenim Američkim Državama kao jednog od 29 poremećaja koji American College of Medical Genetics preporučuje uključiti u jedinstveni panel za probir (Levy, 2021).

U drugim zemljama, kao i u Republici Hrvatskoj, klasična homocistinurija je među kandidatima za uvrštenje u nacionalne programe NBS-a. Laboratorijski dijagnostički pokazatelji ove bolesti su prisutnost visoke koncentracije tHcy u plazmi (obično iznad 100 $\mu\text{mol/L}$), te blagi porast koncentracije Met i smanjene razine Cys i cistationina (Sacharow i sur., 2004). Prvi korak prije uvođenja bolesti u program NBS-a je pravilan odabir primarnih, kao i sekundarnih biljega, te određivanje njihovih graničnih vrijednosti. Taj se proces uobičajeno naziva pilot program. U zemljama koje već dulje vrijeme provode NBS i na klasičnu homocistinuriju, kao primarni biljezi koriste se Met i omjer Met/Phe, a kao drugostupanjski test koristi se tHcy. Takav pristup koristi se zato što je Met jedna od aminokiselina koja se rutinski mjeri u NBS-u, dok metoda mjerenja koncentracije tHcy zahtijeva specifičnu metodu. Metoda uključuje redukcijsko sredstvo koje razdvaja disulfidne veze i oslobađa Hcy iz kemijskih oblika u kojima je povezan s drugim molekulama (Levy i Sahai, 2023).

Treba naglasiti da zbog toga što se u provođenju NBS-a u obzir uzimaju koncentracije Met, a ne tHcy, probirom se neće otkriti drugi poremećaji s povišenim tHcy, kao što su poremećaji remetilacije (npr. manjak enzima MTHFR ili defekti kobalamina), ukoliko je koncentracija Met normalna ili snižena (Sacharow i sur., 2004). Također, kod neke djece koja boluju od klasične homocistinurije, koncentracija Met može biti samo granično povišena ili čak normalna, što dovodi do propuštanja postavljanja dijagnostičke sumnje na homocistinuriju u oko 50% slučajeva (Levy i Sahai, 2023). Potonje je češće prisutno u novorođenčadi s varijantom bolesti koja odgovara na piridoksin, jer kod njih hipermetioninemija nije prisutna u trenutku provođenja NBS-a, pa zato takvi slučajevi znaju biti propušteni (Sacharow i sur., 2004; Peterschmitt i sur., 1999). Uzrok lažno negativnih rezultata probira može biti niska koncentracija Met u majčinom mlijeku i nekim formulama za dohranu dojenčadi (Bowron i sur., 2005). Slijedom toga, mnogi oboljeli od klasične homocistinurije često budu krivo dijagnosticirani kao osobe s Marfanovim sindromom i nisu odgovarajuće liječeni sve dok ne postanu adolescenti ili odrasle osobe, a do tada su već razvili nepovratne prije navedene komplikacije. Do propuštanja postavljanja sumnje na metabolički poremećaj može doći i zbog nedovoljno provjerenih graničnih vrijednosti analita koji se koriste u postupnicima za pojedine bolesti u NBS laboratorijima (Levy, 2021).

Smanjenje granične vrijednosti Met na 40 $\mu\text{mol/L}$, malo iznad normalne novorođenačke razine Met od približno 34 $\mu\text{mol/L}$, uz uključivanje omjera Met/Phe kao jednako vrijednog primarnog biljega uz Met, smanjio se broj lažno pozitivnih rezultata na klasičnu homocistinuriju, bez istovremenog povećanja stope lažno negativnih, odnosno propuštenih pacijenata. Istovremeno se smanjio broja uzoraka koji bi se trebali analizirati drugostupanjskim testom, odnosno određivanjem tHcy, a time se smanjuju i troškovi probira (Huemer i sur., 2015). Sukladno predloženom postupniku, uzorci DBS-a kod kojih je Met iznad postavljene granične vrijednosti i uz to povećan omjer Met/Phe, trebaju se dodatno testirati drugostupanjskim testom određivanja koncentracije tHcy, a samo novorođenčad kod koje je tHcy povišen, bila bi upućena na daljnju dijagnostičku obradu (Levy, 2021).

Ukoliko bi se tHcy mjerio u istom DBS uzorku kao drugostupanjski test, izračun omjera Met/tHcy mogao bi pomoći u razlikovanju pacijenata s manjkom CBS-a od pojedinaca s manjkom MAT I/III (Huemer i sur., 2015). Razlikovanje manjka MAT I/III i manjka CBS-a na temelju koncentracije Met nije moguće, jer je kod oba poremećaja prisutna hipermetioninemija. Za razliku od poremećaja manjka CBS-a u kojem je koncentracija tHcy znatno povećana, kod poremećaja manjka MAT I/III prisutna je normalna ili neznatno povećana koncentracija tHcy (Sacharow i sur., 2004; Huemer i sur., 2015). Određivanje koncentracije tHcy kao drugostupanjskog testa, a potom izračunavanje omjera Met/tHcy, moglo bi pomoći u otkrivanju složenih heterozigota za mutaciju u genu *MAT1A*, koja rezultira manjkom MAT I/III. Sekvenciranjem *MAT1A* gena potvrđuje se dijagnoza (Barić i sur., 2017).

Mjerenjem koncentracije tHcy kao primarnog biljega u probiru znatno bi se povećala osjetljivost i specifičnost NBS-a za klasičnu homocistinuriju. U Kataru, zbog visoke učestalosti klasične homocistinurije, mjerenje koncentracije tHcy se koristi kao primarni test u NBS probiru svih uzoraka. Međutim, ova metoda znatno bi povećala troškove i nije prihvatljiva za većinu drugih zemalja (Levy, 2021). U tijeku su istraživanja usmjerena na pronalazak prihvatljive metode mjerenja Hcy već u primarnom NBS-u. Takvim pristupom mogla bi se značajno povećati identifikacija klasične homocistinurije i u zemljama koje ne provode drugostupanjski test. Također bi se omogućila identifikacija novorođenčadi s poremećajima kobalamina u kojima je povišeni tHcy ključna značajka. Ovi poremećaji su posljedica nedostatka u stvaranju ili

transportu koenzima vitamina B12, a mnogi trenutno nisu uključeni u program NBS-a (Levy i Sahai, 2023).

Upotreba DBS uzoraka u laboratorijskoj dijagnostici ima praktične, kliničke i financijske prednosti u usporedbi s klasičnim metodama prikupljanja venske krvi zbog jednostavnijeg prikupljanja uzoraka, transporta i skladištenja. Međutim, prije odluke o uvrštavanju u rutinsku primjenu, neophodno je da klinički laboratoriji provedu odgovarajuće validacijske studije ovisno o metodi koja se koristi, kako bi se procijenila razlika u koncentraciji analita između uzoraka plazme i DBS-a. Važno je uzeti u obzir učinak varijabilnosti i pristranosti ispitivanja, veličinu i kvalitetu uzorka DBS-a, kako bi se spriječilo pogrešno tumačenje rezultata te naposljetku izbjegla pogrešna terapija kod pacijenata (Moat i sur., 2020).

Rezultati dobiveni usporedbom dviju metoda određivanja tHcy su usporedivi, iako su vrijednosti određivanja tHcy u DBS-u bile nešto niže nego one dobivene određivanjem tHcy u plazmi. Niže koncentracije tHcy u DBS-u, u usporedbi s uzorcima plazme, prisutne su zbog različite raspodjele analita u plazmi i eritrocitima, same pripreme uzoraka i učinkovitosti ekstrakcije iz DBS-a (Bowron i sur., 2005; Moat i sur., 2020).

Bártl i suradnici u radu iz 2014. pokazali da su koncentracije tHcy u uzorcima DBS-a korelirale vrlo dobro s koncentracijama tHcy u uzorcima plazme (Bártl i sur., 2014). Bowron i suradnici u istraživanju iz 2005. su usporedili koncentracije tHcy u plazmi i DBS-u linearnom regresijom te su koncentracije tHcy izmjerene u DBS-u bile oko 40% niže nego u odgovarajućim uzorcima plazme (Bowron i sur., 2005).

5. ZAKLJUČAK

Međusobna usporedba rezultata dobivenih analizom koncentracije tHcy u DBS-u i u plazmi ukazuje da između te dvije metode ne postoji značajno odstupanje. Stoga se metoda određivanja tHcy u uzorcima DBS-a može koristiti kao drugostupanjski test NBS-a pri sumnji na klasičnu homocistinuriju.

Osim toga, mjerenje tHcy u DBS-u se može koristiti i za selektivni probir na hiperhomocisteinuriju te pronalaženje pacijenata koji imaju povećan rizik od kardiovaskularnih bolesti (Bártl i sur., 2014).

Nadalje, mjerenjem tHcy iz DBS-a olakšalo bi se praćenje terapije pacijenata kod kojih je homocistinurija već dijagnosticirana zbog jednostavnijeg uzorkovanja i slanja uzoraka u laboratorij. Međutim, prilikom tumačenja nalaza, važno je imati na umu da koncentracije Met i tHcy u DBS-u mogu biti nešto niže nego u plazmi (Bártl i sur., 2014; Alodaib i sur., 2011).

Bilo bi korisno provesti usporedbu metoda na znatno većem broju ispitanika i u većim koncentracijskim rasponima tHcy radi dobivanja preciznijih podataka.

Mjerenje tHcy kao drugostupanjskog testa može se koristiti i za rano otkrivanje manjka vitamina B12 (Gramer i Hoffmann, 2022).

Aktualni postupnici i smjernice za provođenje NBS-a uključuju i probir na klasičnu homocistinuriju zbog povoljnog ishoda rano otkrivenih i liječenih bolesnika (Keller i sur., 2019).

6. LITERATURA

1. Alam SF, Kumar S, Ganguly P. Measurement of homocysteine: a historical perspective. *J Clin Biochem Nutr*, 2019, 65(3), 171-177.
2. Alodaib AN, Carpenter K, Wiley V, Wotton T, Christodoulou J, Wilcken B. Homocysteine measurement in dried blood spot for neonatal detection of homocystinurias. *JIMD Rep*. 2012, 5, 1-6.
3. Aliu E, Kanungo S, Arnold GL. Amino acid disorders. *Ann Transl Med*, 2018, 6(24), 471.
4. Apgar TL, Sanders CR. Compendium of causative genes and their encoded proteins for common monogenic disorders. *Protein Sci*. 2022, 31(1), 75-91.
5. Barić I, Staufner C, Augoustides-Savvopoulou P, Chien YH, Dobbelaere D, Grünert SC, Opladen T, Petković Ramadža D, Rakić B, Wedell A, Blom HJ. Consensus recommendations for the diagnosis, treatment and follow-up of inherited methylation disorders. *J Inherit Metab Dis*. 2017, 40(1), 5-20.
6. Bártil J, Chrastina P, Krijt J, Hodík J, Pešková K, Kožich V. Simultaneous determination of cystathionine, total homocysteine, and methionine in dried blood spots by liquid chromatography/tandem mass spectrometry and its utility for the management of patients with homocystinuria. *Clin Chim Acta*, 2014, 437, 211-217.
7. Bergwerff CE, Luman M, Blom HJ, Oosterlaan J. Paediatric reference values for total homocysteine, tryptophan, tyrosine and phenylalanine in blood spots. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 2017, 77(6), 410-414.
8. 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. *Paediatrica Croatica*. Supplement, 2018, 62(1), 10-14.
9. Bilić-Zulle L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochem Med*, 2011, 21, 49-52.
10. Bowron A, Barton A, Scott J, Stansbie D. Blood Spot Homocysteine: a feasibility and stability study. *Clin Chem*, 2005, 51(1), 257-258.
11. Brown L, Beynon, JH. "mass spectrometry". *Encyclopedia Britannica*, 2024, <https://www.britannica.com/science/mass-spectrometry>, pristupljeno 26.3.2024.

12. Candela E, Zagariello M, Di Natale V, Ortolano R, Righetti F, Assirelli V, Biasucci G, Cassio A, Pession A, Baronio F. Cystathionine Beta-Synthase Deficiency: Three Consecutive Cases Detected in 40 Days by Newborn Screening in Emilia Romagna (Italy) and a Comprehensive Review of the Literature. *Children (Basel)*. 2023, 10(2), 396.
13. Demczko M. Methionine Metabolism Disorders. Mitochondrial Medicine, Children's Hospital of Philadelphia, 2024, <https://www.msmanuals.com/professional/pediatrics/inherited-disorders-of-metabolism/methionine-metabolism-disorders>, pristupljeno 15.3.2024.
14. Ferreira CR, Rahman S, Keller M, Zschocke J; ICIMD Advisory Group. An international classification of inherited metabolic disorders (ICIMD). *J Inherit Metab Dis*. 2021, 44(1), 164-177.
15. Fumić K. Nasljedni metabolički poremećaji. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, Zagreb, Medicinska naklada, 2009, str. 534-546.
16. Fundamental Guide to Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LCMS). © Shimadzu Corporation. First Edition, 2018.
17. Garg E, Zubair M. Mass Spectrometer. U: StatPearls [Internet]. Treasure Island, FL, 2023, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589702/>, pristupljeno: 26.3.2024.
18. GeeksforGeeks. A computer science portal for geeks. Spearman's Rank Correlation. 2024, <https://www.geeksforgeeks.org/spearman-rank-correlation/>, pristupljeno 28.3.2024.
19. Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med*, 2015, 25(2), 141-51.
20. Gramer G, Hoffmann GF. Second-tier strategies in newborn screening – potential and limitation. *Medizinische Genetik*, 2022, 34(1), 21-28.
21. Hermann A, Sitdikova G. Homocysteine: Biochemistry, Molecular Biology and Role in Disease. *Biomolecules*, 2021, 11(5), 737.
22. Hortin GL. Amino Acids, Peptides, and Proteins. U: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics (7th Edition). Burtis CA, Bruns DE, urednici, St Louis, Elsevier, 2015, str. 754-766.
23. 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.

24. Informacije za javnost o novorođenačkom probiru, 2023., <https://www.kbc-zagreb.hr/informacije-javnosti-o-novorodjenackom-probiru.aspx>, pristupljeno 7.3.2024.
25. Instruction Manual. Homocysteine – in Plasma/Serum, – in Dried Blood Spots (DBS). *Recipe Chemicals*, Njemačka, 2018.
26. Jones SA, Cheillan D, Chakrapani A, Church HJ, Heales S, Wu THY, Morton G, Roberts P, Sluys EF, Burlina A. Application of a Novel Algorithm for Expanding Newborn Screening for Inherited Metabolic Disorders across Europe. *Int J Neonatal Screen*, 2022, 8(1), 20.
27. Kaur P, Stoltzfus JC. Bland–Altman plot: A brief overview. *International Journal of Academic Medicine*, 2017, 3(1), 110-111.
28. Keller R. Newborn screening for homocystinuria: Recent recommendations versus current practice. *J Inherit Metab Dis*, 2019, 42(1), 128-139.
29. Kirk, D. Contemporary Mathematics. Houston, *OpenStax*, 2023, 8.8. Scatter Plots, Correlation, and Regression Lines, <https://openstax.org/books/contemporary-mathematics/pages/8-8-scatter-plots-correlation-and-regression-lines>, pristupljeno 29.3.2024.
30. Kožich V, Stabler S. Lessons Learned from Inherited Metabolic Disorders of Sulfur-Containing Amino Acids Metabolism. *J Nutr*. 2020, 150(Suppl 1), 2506S-2517S.
31. Lakshmy R, Tarik M, Abraham RA. Role of dried blood spots in health and disease diagnosis in older adults. *Bioanalysis*, 2014, 6(23), 3121-3131.
32. Levy HL. Early Development of Newborn Screening for HCU and Current Challenges. *Int J Neonatal Screen*, 2021, 7(4), 67.
33. Levy HL, Sahai I. Is More Effective Newborn Screening for Homocystinuria on the Horizon? *Clin Chem*, 2023, 69(5), 433-434.
34. Ling ZN, Jiang YF, Ru, JN. Amino acid metabolism in health and disease. *Sig Transduct Target Ther*, 2023, 8, 345.
35. Loeber JG i suradnici. Neonatal Screening in Europe Revisited: An ISNS Perspective on the Current State and Developments Since 2010. *Int J Neonatal Screen*. 2021, 7(1), 15.
36. Martínez-Morillo E, Prieto García B, Álvarez Menéndez FV. Challenges for Worldwide Harmonization of Newborn Screening Programs. *Clin Chem*, 2016, 62(5), 689-698.

37. McCaddon A, Miller JW. Homocysteine – a retrospective and prospective appraisal. *Front. Nutr.*, 2023, 10, 1179807.
38. MedCalc. Easy-to-use online statistical software. Manual. 2024, <https://www.medcalc.org/manual/wilcoxon.php>, pristupljeno 30.3.2024.
39. Mei J. Dried blood spot sample collection, storage, and transportation. U: Dried Blood Spots: Applications and Techniques. First Edition. Wenkui Li, Mike S Lee. John Wiley & Sons, Inc., 2014, 21-31.
40. Miller JW. Homocysteine. U: Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition). Editor(s): Benjamin Caballero, *Academic Press*, 2013, 424-430.
41. Mittal RD. Tandem mass spectroscopy in diagnosis and clinical research. *Indian J Clin Biochem*, 2015, 30(2), 121-123.
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(2), 26.
43. 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.
44. Muačević-Katanec D, Merkler A, Fumić K, Barić I, Merkler M, Reiner Ž. Homocistinurija u odraslih bolesnika – važnost ranog prepoznavanja u dječjoj i adolescentnoj dobi. *Paediatr Croat*, 2014, 58, 208-215.
45. Mudd SH. Hypermethioninemias of genetic and non-genetic origin: a review. *Am J Med Genet Part C Semin Med Genet*, 2011, 157, 3–32.
46. Nauck M, Bisse E, Nauck M, Wieland H. Pre-analytical conditions affecting the determination of the plasma homocysteine concentration. *Clin Chem Lab Med*. 2001, 39(8), 675-680.
47. Okun JG, Gan-Schreier H, Ben-Omran T, Schmidt KV, Fang-Hoffmann J, Gramer G, Abdoh G, Shahbeck N, Al Rifai H, Al Khal AL, Haege G, Chiang CC, Kasper DC, Wilcken B, Burgard P, Hoffmann GF. Newborn Screening for Vitamin B6 Non-responsive Classical Homocystinuria: Systematical Evaluation of a Two-Tier Strategy. *JIMD Rep*. 2017, 32, 87-94.

48. Parkhitko AA, Jouandin P, Mohr SE, Perrimon N. Methionine metabolism and methyltransferases in the regulation of aging and lifespan extension across species. *Aging Cell*, 2019,18(6), e13034.
49. Pasquali M, Longo N. Newborn Screening and Inborn Errors of Metabolism. U: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics (7th Edition). Burtis CA, Bruns DE, urednici, St Louis, Elsevier, 2015, str. 2114-2145.
50. Peterschmitt MJ, Simmons JR, Levy HL. Reduction of false negative results in screening of newborns for homocystinuria. *N Engl J Med*, 1999, 341(21), 1572-1576.
51. Petković Ramadža D, Sarnavka V, Škaričić A, Fumić K, Barić I. Novorođenački skrining u Hrvatskoj i u svijetu. *Paediatr Croat*, 2013, 57, 350-357.
52. Pitt JJ. Newborn screening. *Clin Biochem Rev*. 2010, 31(2), 57-68.
53. Ramakrishnan S, Sulochana KN, Lakshmi S, Selvi R, Angayarkanni N. Biochemistry of homocysteine in health and diseases. *Indian J Biochem Biophys*, 2006, 43(5), 275-283.
54. Rockwood AL, Annesley TM, Sherman NE. Mass Spectrometry. U: Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics (7th Edition). Burtis CA, Bruns DE, urednici, St Louis, Elsevier, 2015, str. 542-573.
55. Sacharow SJ, Pickler JD, Levy HL. Homocystinuria caused by cystathionine beta-synthase deficiency. U: GeneReviews, Adam MP, Seattle, 1993-2024.
56. Sharer JD, De Biase I, Matern D, Bennett MJ, Tolun AA, ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Laboratory analysis of amino acids, 2018 revision: A technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genetics in Medicine*, 2018, 20(12), 1499-1507.
57. Shimadzu. Analytical and Measuring Instruments. What is LC-MS, 2024, https://www.shimadzu.com/an/service-support/technical-support/analysis-basics/basics_of_lcms/ms_and_lcms.html, pristupljeno 26.3.2024.
58. Smith AD, Refsum H. Homocysteine – from disease biomarker to disease prevention. *Journal of Internal Medicine*, 2021, 290(4), 826-854.
59. Thomas SN, French D, Jannetto PJ, Rappold BA, Clarke WA. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for clinical diagnostics. *Nat Rev Methods Primers*, 2022, 2, 96.
60. Wilson JM., Jungner YG. Principles and practice of mass screening for disease. U: Principles. Bull. WHO. 1968, 14-39.

61. Younesi S, Yazdani B, Taheri Amin MM, Saadati P, Jamali S, Modarresi MH, Savad S, Amidi S, Razavi H, Ghafouri-Fard S. Incorporation of second-tier tests and secondary biomarkers to improve positive predictive value (PPV) rate in newborn metabolic screening program. *J Clin Lab Anal*, 2022, 36(7), e24471.
62. 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 with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 2018, 41(22), 4167-4177.
63. Zhao T, Lum JJ. Methionine cycle-dependent regulation of T cells in cancer immunity. *Frontiers in Oncology*, 2022. 12, 969563.

7. SAŽETAK/ SUMMARY

7.1. Sažetak

Nasljedni metabolički poremećaji većinom su uzrokovani mutacijama gena koji kodiraju enzime, transportere ili kofaktore te utječu na različite metaboličke procese. NBS predstavlja sustavno traganje za pojedinim prirođenim bolestima kod cjelokupne novorođenačke populacije određenog područja s ciljem što ranijeg otkrivanja bolesti. U program novorođenačkog probira u RH za sada je uvršteno devet bolesti, a u planu je i proširenje probira poremećaja na klasičnu homocistinuriju. Poremećaji metioninskog ciklusa uključuju manjak određenih enzima koji sudjeluju u tom ciklusu i dovode do povišenja Met i Hcy u krvi. Upravo zbog manjka ili nefunkcionalnosti enzima CBS-a, dolazi do nakupljanja Hcy i razvoja klasične homocistinurije. Postavljanje dijagnoze u što ranijoj životnoj dobi, smanjuje mogućnost nastanka ozbiljnih komplikacija poput intelektualnih poteškoća, abnormalnosti kostiju, problema s očima te kardiovaskularnih disfunkcija. Do sada se koncentracija Hcy određivala iz uzorka plazme, ali se pokazala potreba za njegovim određivanjem iz DBS-a u drugostupanjskim testovima. Drugostupanjski testovi su ključna komponenta NBS-a kojima je moguće povećati osjetljivost i specifičnost probira, a uključuju analizu iz istog uzorka specifičnijim metodama. Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnosti određivanja koncentracije tHcy iz DBS-a LC-MS/MS tehnologijom, kao drugostupanjskog testa, u provođenju NBS-a na klasičnu homocistinuriju. U ovom radu napravljena je usporedba mjerenja koncentracije tHcy iz uzorka suhe kapi krvi na filtarskom papiru i uzorka plazme. Na temelju rezultata može se zaključiti da između te dvije metode ne postoji značajno odstupanje te se metoda određivanja tHcy u DBS-u može koristiti za rutinski rad u laboratoriju kao drugostupanjski test novorođenačkog probira na klasičnu homocistinuriju.

7.2. Summary

Inherited metabolic disorders are mostly caused by mutations in genes encoding enzymes, transporters, or cofactors, affecting various metabolic processes. NBS entails systematic screening for individual congenital diseases in the entire newborn population of a specific region, aiming for early disease detection. Currently, the newborn screening program in Croatia includes nine diseases, with plans to expand the screening to include classical homocystinuria. Disorders of the methionine cycle involve deficiencies of specific enzymes participating in the cycle, leading to elevated levels of Met and Hcy in the blood. Due to the deficiency or malfunction of CBS enzyme, there is an accumulation of Hcy resulting in classical homocystinuria. Early diagnosis reduces the risk of serious complications such as intellectual disabilities, bone abnormalities, eye problems, and cardiovascular dysfunctions. Hcy concentration has traditionally been determined from plasma samples, but there is a need to measure it from DBS in second-tier tests. Second-tier tests are essential components of NBS, which can increase the sensitivity and specificity of screening, involving analysis from the same sample using more specific methods. The aim of this study was to investigate the possibility of measuring tHcy concentration from DBS using LC-MS/MS technology as a second-tier test for NBS of classical homocystinuria. The study compared tHcy measurements from dried blood spot samples on filter paper and plasma samples. Based on the results, it can be concluded that there is no significant deviation between the two methods, indicating that measuring tHcy from DBS can be used for routine laboratory work as a second-tier test for newborn screening of classical homocystinuria.

Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

DRUGOSTUPANJSKI TEST PRI PROVOĐENJU NOVOROĐENAČKOG PROBIRA NA KLASIČNU HOMOCISTINURIJU

Marija Čizmešija

SAŽETAK

Nasljedni metabolički poremećaji većinom su uzrokovani mutacijama gena koji kodiraju enzime, transportere ili kofaktore te utječu na različite metaboličke procese. NBS predstavlja sustavno traganje za pojedinim prirođenim bolestima kod cjelokupne novorođenačke populacije određenog područja s ciljem što ranijeg otkrivanja bolesti. U program novorođenačkog probira u RH za sada je uvršteno devet bolesti, a u planu je i proširenje probira poremećaja na klasičnu homocistinuriju. Poremećaji metioninskog ciklusa uključuju manjak određenih enzima koji sudjeluju u tom ciklusu i dovode do povišenja Met i Hcy u krvi. Upravo zbog manjka ili nefunkcionalnosti enzima CBS-a, dolazi do nakupljanja Hcy i razvoja klasične homocistinurije. Postavljanje dijagnoze u što ranijoj životnoj dobi, smanjuje mogućnost nastanka ozbiljnih komplikacija poput intelektualnih poteškoća, abnormalnosti kostiju, problema s očima te kardiovaskularnih disfunkcija. Do sada se koncentracija Hcy određivala iz uzorka plazme, ali se pokazala potreba za njegovim određivanjem iz DBS-a u drugostupanjskim testovima. Drugostupanjski testovi su ključna komponenta NBS-a kojima je moguće povećati osjetljivost i specifičnost probira, a uključuju analizu iz istog uzorka specifičnijim metodama. Cilj ovog rada bio je istražiti mogućnosti određivanja koncentracije tHcy iz DBS-a LC-MS/MS tehnologijom, kao drugostupanjskog testa, u provođenju NBS-a na klasičnu homocistinuriju. U ovom radu napravljena je usporedba mjerenja koncentracije tHcy iz uzorka suhe kapi krvi na filtarskom papiru i uzorka plazme. Na temelju rezultata može se zaključiti da između te dvije metode ne postoji značajno odstupanje te se metoda određivanja tHcy u DBS-u može koristiti za rutinski rad u laboratoriju kao drugostupanjski test novorođenačkog probira na klasičnu homocistinuriju.

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

Rad sadrži: 45 stranica, 9 grafičkih prikaza, 5 tablica i 63 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: homocistein, klasična homocistinurija, novorođenački probir, drugostupanjski testovi

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

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

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

Doc. dr. sc. Désirée Coen Herak, docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad prihvaćen: lipanj 2024.

Basic documentation card

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

Diploma thesis

SECOND-TIER TEST IN NEWBORN SCREENING FOR CLASSICAL HOMOCYSTINURIA

Marija Čižmešija

SUMMARY

Inherited metabolic disorders are mostly caused by mutations in genes encoding enzymes, transporters, or cofactors, affecting various metabolic processes. NBS entails systematic screening for individual congenital diseases in the entire newborn population of a specific region, aiming for early disease detection. Currently, the newborn screening program in Croatia includes nine diseases, with plans to expand the screening to include classical homocystinuria. Disorders of the methionine cycle involve deficiencies of specific enzymes participating in the cycle, leading to elevated levels of Met and Hcy in the blood. Due to the deficiency or malfunction of CBS enzyme, there is an accumulation of Hcy resulting in classical homocystinuria. Early diagnosis reduces the risk of serious complications such as intellectual disabilities, bone abnormalities, eye problems, and cardiovascular dysfunctions. Hcy concentration has traditionally been determined from plasma samples, but there is a need to measure it from DBS in second-tier tests. Second-tier tests are essential components of NBS, which can increase the sensitivity and specificity of screening, involving analysis from the same sample using more specific methods. The aim of this study was to investigate the possibility of measuring tHcy concentration from DBS using LC-MS/MS technology as a second-tier test for NBS of classical homocystinuria. The study compared tHcy measurements from dried blood spot samples on filter paper and plasma samples. Based on the results, it can be concluded that there is no significant deviation between the two methods, indicating that measuring tHcy from DBS can be used for routine laboratory work as a second-tier test for newborn screening of classical homocystinuria.

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

Thesis includes: 45 pages, 9 figures, 5 tables and 63 references. Original is in Croatian language.

Keywords: homocysteine, classical homocystinuria, newborn screening, second-tier tests

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: June 2024.