

**Sylvie Šťastná a kol.**

**Přehled vyšetření metabolitů  
pro diagnostiku  
dědičných metabolických poruch**

Praha 2008

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM  
FONDEM STÁTNÍM, ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY A ROZPOČTEM  
HLAVNÍHO MĚSTA PRAHY

TATO PUBLIKACE VZNIKLA ZA PODPORY VÝZKUMNÉHO ZÁMĚRU  
MZOVFN2005

**Pořadatel:**

Sylvie Šťastná, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

**Autoři:**

Josef Bártil, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Zdeněk Čánský, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Milan Elleder, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Petr Horník, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Petr Chrastina, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Helena Jahnová, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Eva Košťálová, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Viktor Kožich, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Michala Klímová, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Jakub Krijt, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Jana Ledvinová, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Olga Martincová, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Evženie Pospíšilová, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Helena Poupětová, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Ivan Šebesta, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Sylvie Šťastná, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Lucia Varholáková, Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

## Obsah

|   |     |
|---|-----|
| <b>Vyšetření metabolitů pro diagnostiku dědičných metabolických poruch</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Evženie Pospíšilová)..... | 5   |
| <b>Chromatografie</b> (Petr Chrastina) .....  | 9   |
| <b>Plynová chromatografie</b> (Zdeněk Čánský, Petr Chrastina) .....   | 12  |
| <b>Kapalinová chromatografie</b> (Josef Bártl, Jakub Krijt) .....   | 14  |
| <b>Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií</b> (Zdeněk Čánský, Petr Chrastina) ...  | 16  |
| <b>Tandemová hmotnostní spektrometrie</b> (Petr Chrastina, Sylvie Šťastná) .....  | 18  |
| <b>Kapilární elektroforéza</b> (Petr Horník) .....  | 21  |
| <b>Barva a zápach moče</b> (Petr Chrastina, Sylvie Šťastná, Eva Košťálová) .....  | 23  |
| <b>Aminokyseliny semikvantitativně v krvi/séru/plazmě</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová) .....                       | 24  |
| <b>Aminokyseliny semikvantitativně v moči</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová) .....                                   | 26  |
| <b>Aminokyseliny kvantitativně v séru/plazmě</b> (Michala Klímová, Sylvie Šťastná, Petr Chrastina) .....                              | 27  |
| <b>Aminokyseliny kvantitativně v moči</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová) ...   | 30  |
| <b>Aminokyseliny kvantitativně v likvoru</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová)  | 33  |
| <b>Biotinidáza kvalitativně</b> (Eva Košťálová, Petr Chrastina, Sylvie Šťastná) .....   | 35  |
| <b>Biotinidáza kvantitativně</b> (Eva Košťálová, Petr Chrastina, Sylvie Šťastná) .....  | 36  |
| <b>7-Dehydrocholesterol a cholesterol</b> (Sylvie Šťastná, Zdeněk Čánský) .....   | 37  |
| <b>Disulfidy</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová) .....  | 38  |
| <b>Fenylalanin a tyrosin</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová) .....  | 39  |
| <b>Galaktitol</b> (Eva Košťálová, Petr Chrastina, Sylvie Šťastná) .....   | 40  |
| <b>Galaktóza a galaktóza-1-fosfát</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Zdeněk Čánský) .....   | 42  |
| <b>Globotriaosylceramid</b> (Petr Chrastina, Jana Ledvinová, Milan Elleder) .....   | 44  |
| <b>Glykogen v erythrocytech</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina) .....  | 45  |
| <b>Guanidinoacetát, kreatin a kreatinin</b> (Eva Košťálová, Josef Bártl, Sylvie Šťastná) .....  | 46  |
| <b>Homocitrulin</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová) .....   | 47  |
| <b>Homocystein celkový</b> (Josef Bártl, Viktor Kožich) .....   | 48  |
| <b>3-Hydroxybutyrát</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová) .....   | 50  |
| <b>Karnitin v séru</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová) .....  | 51  |
| <b>Karnitin v moči</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová) .....  | 53  |
| <b>Ketokyseliny</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová) .....   | 54  |
| <b>Kreatinin v séru</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová) .....   | 56  |
| <b>Kreatinin v moči</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová) .....   | 57  |
| <b>Kyselina fenylpyrohroznová</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová) .....   | 58  |
| <b>Kyselina metylmalonová</b> (Zdeněk Čánský, Sylvie Šťastná, Petr Chrastina) .....   | 59  |
| <b>Kyselina močová</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Ivan Šebesta) .....   | 60  |
| <b>Kyselina močová – Index podle Kaufmana</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Ivan Šebesta).   | 62  |
| <b>Kyselina močová - Index podle Stapletona</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Ivan Šebesta)  | .63 |
| <b>Kyselina močová - Exkreční frakce</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Ivan Šebesta) .....   | 64  |
| <b>Kyselina orotová</b> (Eva Košťálová, Josef Bártl, Sylvie Šťastná, Petr Chrastina) .....  | 65  |
| <b>Kyselina sialová</b> (Jana Ledvinová, Sylvie Šťastná, Milan Elleder) .....   | 67  |
| <b>Laktát a pyruvát</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová) .....   | 68  |
| <b>Mukopolysacharidy semikvantitativně v moči</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Josef Bártl, Eva Košťálová) .....                  | 71  |
| <b>Mukopolysacharidy kvantitativně v moči</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Josef Bártl, Eva Košťálová) .....                      | 72  |

|  |    |
|--|----|
| <b>Mukopolysacharidy kvalitativně (elektroforéza) v moči</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Josef Bártil, Eva Košťálová) .....         | 73 |
| <b>Mukopolysacharidy kvantitativně v plodové vodě</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Josef Bártil, Eva Košťálová) .....                | 74 |
| <b>Mukopolysacharidy kvalitativně (elektroforéza) v plodové vodě</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Josef Bártil, Eva Košťálová) ..... | 75 |
| <b>Oligosacharidy, sialyloligosacharidy</b> (Eva Košťálová, Petr Chrastina, Sylvie Šťastná) .....  | 76 |
| <b>Organické kyseliny v séru/plazmě</b> (Zdeněk Čánský, Lucia Varholáková, Eva Košťálová, Petr Chrastina) .....                          | 78 |
| <b>Organické kyseliny v moči</b> (Lucia Varholáková, Petr Chrastina, Eva Košťálová) .....  | 79 |
| <b>Pteriny</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová) .....   | 80 |
| <b>Puriny a pyrimidiny</b> (Josef Bártil, Eva Košťálová, Sylvie Šťastná, Jakub Krijt) .....  | 81 |
| <b>Redukující látky</b> (Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Zdeněk Čánský) .....  | 82 |
| <b>Sacharidy</b> (Olga Martinová, Petr Chrastina, Zdeněk Čánský, Sylvie Šťastná) .....   | 83 |
| <b>Sfingolipidy</b> (Jana Ledvinová, Helena Jahnová, Milan Elleđer) .....  | 84 |
| <b>Šiřičitany</b> (Josef Bártil, Eva Košťálová, Sylvie Šťastná) .....  | 85 |
| <b>Sukcinylaceton fotometricky</b> (Sylvie Šťastná, Zdeněk Čánský, Eva Košťálová, Petr Chrastina) .....                                  | 86 |
| <b>Sukcinylaminoimidazolkarboxamidribosid (SAICAr)</b> (Sylvie Šťastná, Josef Bártil, Eva Košťálová) .....                               | 87 |
| <b>Sulfatidy</b> (Helena Poupětová, Helena Jahnová, Milan Elleđer) .....   | 88 |
| <b>Tandemová hmotnostní spektrometrie - aminokyseliny a acylkarnitiny v krvi</b> (Petr Chrastina, Sylvie Šťastná, Eva Košťálová) .....   | 89 |
| <b>Thiosírany kvalitativně</b> (Josef Bártil, Eva Košťálová, Sylvie Šťastná) .....   | 90 |
| <b>Thiosírany kvantitativně</b> (Josef Bártil, Eva Košťálová, Sylvie Šťastná) .....  | 91 |
| <b>Velmi dlouhé mastné kyseliny a kyselina fytanová</b> (Zdeněk Čánský, Eva Košťálová, Sylvie Šťastná, Petr Chrastina) .....             | 92 |

# Vyšetření metabolitů pro diagnostiku dědičných metabolických poruch

*Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Evžen Pospíšilová*

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

## **Rutinní biochemická a hematologická vyšetření**

Vyšetřování zaměřené na dědičné metabolické poruchy (DMP) začíná již vyšetřením v rutinní biochemické a hematologické laboratoři.

Pro diagnostiku DMP jsou důležitá základní vyšetření v krvi/séru/plazmě (glukóza, amoniak, acidobazická rovnováha, anion gap, kreatinin, močovina, kyselina močová, aktivity jaterních a svalových enzymů, triacylglyceroly, cholesterol, myoglobin, ferritin, krevní obraz, hemokoagulační vyšetření) a v moči (redukující látky, ketolátky).

## **Selektivní metabolický screening**

U DMP způsobených deficitem enzymu se před místem metabolického bloku hromadí substrát a za místem bloku je nedostatek nebo zcela chybí produkt reakce, což může být využito pro diagnostiku DMP.

Podezření na určitou DMP lze vyslovit na základě stanovení zvýšené koncentrace nebo naopak snížené koncentrace (popř. úplné nepřítomnosti) specifických metabolitů.

Základní laboratorní diagnostika DMP se provádí pomocí rozsáhlé multikomponentní analýzy tělních tekutin u klinicky vybraných pacientů – tzv. **selektivního metabolického screeningu**. Rozsah selektivního screeningu je obvykle kompromisem mezi technickou proveditelností, léčebnou nezbytností a finanční nákladností.

Podezření na DMP by mělo být ověřeno, nejlépe na úrovni enzymu nebo molekulárně genetickým vyšetřením, výjimečně i specializovaným vyšetřením tkáně.

## **Vyšetřované metabolity a skupiny metabolitů**

Selektivní metabolický screening zahrnuje vyšetření volných nebo konjugovaných intermediátů metabolismu aminokyselin, sacharidů, oligosacharidů, glykosaminoglykanů, lipidů, purinů, pyrimidinů a dalších látek.

Součástí vyšetření je i biochemická interpretace nálezů. Pro správnou interpretaci by měl být biochemik informován o pacientově stáří, rodinné a osobní anamnéze, stravě, medikaci, případně předpokládané diagnóze. Biochemik a lékař by měli vzájemně komunikovat o urgentnosti analýz a podmínkách odběru materiálu pro vyšetření.

## **Materiál**

Vyšetřovaným materiálem jsou nejčastěji tyto tělní tekutiny: srážlivá krev, nesrážlivá krev, sérum, plazma, suchá kapka krve, likvor, moč, sběr moči, popř. jiný materiál.

## **Rozdělení laboratorních metod**

Pro účinný selektivní screening DMP ve specializovaných metabolických laboratořích se používá široké spektrum metod, různých co do typu, citlivosti, specifity, technické, časové a finanční náročnosti.

Metody lze rozdělit na kvalitativní, semikvantitativní, kvantitativní a profilové.

Jednoduché a levné testy a metody, např. orientační zkoušky moči nebo chromatografie na tenké vrstvě, mají velký význam pro první orientaci. Vysoce specifické a extrémně citlivé metody, např. plynová chromatografie (GC) nebo vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), poskytují rozsáhlé profily metabolitů a pokud jsou tyto metody kombinovány s hmotnostní spektrometrií (GC-MS), může být pro řadu stanovení dosaženo téměř absolutní specifity.

### Používané instrumentální techniky

Z laboratorních technik mají v diagnostice DMP výsadní postavení separační metody, zejména chromatografie (papírová, tenkovrstvá, kapalinová, plynová, iontoměničová) a elektromigrační techniky (elektroforéza, kapilární elektroforéza).

V metabolických laboratořích jsou s výhodou používány metody vysokoučinné kapalinové chromatografie s různými typy detekcí (UV-VIS, diode array, fluorescenční) a kapilární plynová chromatografie s plamenově ionizačním (FID) nebo hmotnostně spektrometrickým (MS) detektorem. Velká skupina metod je založena na spektrofotometrické nebo fluorimetrické detekci finálního produktu nebo průběhu samotné reakce.

Pro diagnostiku DMP na úrovni metabolitů jsou někdy využívány i další speciální metody jako jsou např. radiochemické metody s použitím substrátů značených izotopy  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$  aj., SID metody (metody isotopového zředování s použitím stabilních izotopů  $^2\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$  aj.), nukleární magnetická rezonance (NMR) nebo v poslední době tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS).

Diagnostika DMP je rychle a neustále se rozvíjející obor, z čehož vyplývá nezbytnost dynamického laboratorního přístupu. Používané laboratorní metody by měly být pravidelně hodnoceny a nahrazovány novými, modernějšími, které poskytují lepší informace. S rozvojem oboru souvisí i kontinuální vzdělávání pracovníků laboratoří.

### Seznam vyšetření metabolitů

| Kvalitativní a semikvantitativní metody       |   |  |
|---|---|--|
| <b>2-oxokyseliny</b>                          | dinitrofenylhydrazinový test (DNPH)   | leucinóza  |
| <b>Redukující látky</b>                       | Benediktova zkouška (galaktóza, fruktóza, glukóza, kyselina homogentisová, salicyláty aj.)                                    | galaktosémie, esenciální fruktosurie, intolerance fruktózy, alkaptonurie, diabetes mellitus, Fanconiho syndrom aj. |
| <b>Disulfidy</b>                              | Brandova zkouška s nitroprussidem (cystin, homocystin, glutathion, některé léky a další disulfidy a trioly)                   | cystinurie, homocystinurie, glutathionurie, generalizovaná hyperaminuacidurie, Fanconiho syndrom                   |
| <b>Fenylpyruvát</b>                           | Føllingova zkouška s $\text{FeCl}_3$ (fenylpyruvát - lahově zelené zbarvení), různě zbarvené komplexy u řady jiných sloučenin | fenylketonurie   |
| <b>Thiosířany</b>                             | zkouška s jódem a azidem sodným   | deficit sulfitoxidázy a molybdenového kofaktoru  |
| <b>Sířčitany</b>                              | zkouška diagnostickým papírkem v čerstvé moči   | deficit sulfitoxidázy a molybdenového kofaktoru  |
| <b>Glykosaminoglykany (mukopolysacharidy)</b> | zkouška s azurovou modří  | mukopolysacharidózy  |
| Kvantitativní vyšetření                       |   |  |
| <b>Glykosaminoglykany (mukopolysacharidy)</b> | spektrofotometrie<br>dvourozměrná elektroforéza,<br>TLC   | mukopolysacharidózy,<br>polysulfatázový deficit  |
| <b>Sacharidy</b>                              | TLC   | poruchy metabolismu galaktózy a fruktózy   |
| <b>Laktát a pyruvát</b>                       | spektrofotometrie   | laktátové acidózy  |

|   |   |   |
|---|---|---|
| <b>3-hydroxybutyrát a acetoacetát</b>       | spektrofotometrie   | poruchy ketogeneze a ketolýzy   |
| <b>Karnitin (volný, acylovaný, celkový)</b> | radiochemická metoda  | poruchy metabolismu s hromaděním acyl-CoA susp. primární nebo sekundární karnitinový deficit kontrola pacientů na nízkobílkovinné dietě nebo na suplementaci karnitinem   |
| <b>Kyselina orotová</b>                     | spektrofotometrie<br>HPLC   | heterozygotie pro deficit OTC poruchy cyklu močoviny porucha pyrimidinového metabolismu allopurinolový test   |
| <b>Galaktóza galaktóza-1-fosfát</b>         | HPTLC   | poruchy metabolismu galaktózy   |
| <b>Galaktitol</b>                           | GC  | poruchy metabolismu galaktózy   |
| <b>Celkový homocystein</b>                  | HPLC  | homocystinurie hyperhomocysteinémie kontrola pacientů na dietě  |
| <b>Sfingolipidy</b>                         | HPTLC   | Fabryho choroba, metachromatická leukodystrofie, prosaposinový deficit, deficit proteinového aktivátoru B, polysulfatázový deficit, Farberova choroba   |
| <b>Kyselina sialová</b>                     | fotometrie  | porucha transportu kyseliny sialové Salla disease ISSD (Infantile sialic acid storage disease) sialurie   |
| <b>Profilová vyšetření</b>                  |   |   |
| <b>Aminokyseliny</b>                        | papírová chromatografie<br>automatický analyzátor<br>aminokyselin | hyperamonémie aminoacidopatie porucha energetického metabolismu nefrolitiáza Fanconiho syndrom epileptická encefalopatie kontrola nízkobílkovinné diety   |
| <b>Organické kyseliny</b>                   | GC/MS   | metabolické krize z nejasné příčiny (metabolická acidóza, hyperlaktacidémie, hypoglykémie, ketonémie, neonatální ketonurie, hyperamonémie atd.) klinické projevy systémové intoxikace organické acidurie aminoacidopatie poruchy oxidace mastných kyselin porucha energetického |

|   |   |  |
|---|---|--|
|   |   | metabolismu<br>hepatopatie<br>neurologická nebo<br>neuromuskulární onemocnění<br>epileptická encefalopatie<br>multisystémová onemocnění<br>monitorování kompenzace<br>onemocnění                       |
| <b>Velmi dlouhé mastné kyseliny (VLCFA) a kyselina fytanová</b> | GC  | peroxisomální onemocnění   |
| <b>Acylkarnitiny</b>  | MS/MS   | organická acidurie<br>poruchy oxidace mastných kyselin<br>hypoglykémie   |
| <b>Oligosacharidy</b>   | TLC<br>různé druhy detekce<br>různé vyvíjecí soustavy | susp. stádavé lysosomální<br>onemocnění ze skupiny<br>glykoproteinóz   |
| <b>Puriny a pyrimidiny</b>                                      | HPLC  | poruchy purinového nebo<br>pyrimidinového metabolismu<br>neurologická onemocnění<br>z nejasné příčiny<br>nefrolitiáza, renální poškození, dna<br>anémie, imunodeficit<br>monitoring léčby alopurinolem |
| <b>Pteriny</b>  | HPLC  | hyperfenylalaninémie<br>porucha neurotransmiterů   |

# Chromatografie

*Petr Chrastina*

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

**Chromatografie** je analytická metoda, která umožňuje rozdělit směs látek na její jednotlivé složky. Například ropa není jednoduchá sloučenina, ale směs tvořená organickými sloučeninami s tak podobnými chemickými vlastnostmi, že jejich oddělení a identifikace obvyklými analytickými postupy není možné. Jednotlivé složky umožnila oddělit teprve chromatografie. Bylo tak zjištěno, že v ropě je obsaženo přibližně 600 různých sloučenin.

Chromatografie má mezi ostatními analytickými metodami zcela ojedinělé postavení, protože nám dovoluje stanovit stovky látek v jediném vzorku a oddělit je od sebe bez jejich narušení. Pouze s použitím chromatografie se podařilo odhalit složení mnohých přírodních látek a izolovat účinné složky z biologického materiálu a objevit mezi miliardami atomů einsteinia jen několik atomů do roku 1955 neznámého mendělevia.

Chromatografie je separační metoda založená na postupném ustavování řady fázových rovnováh součástí analyzované směsi mezi dvěma popř. i více fázemi, které jsou vůči sobě v pohybu. Jedna fáze, zvaná **stacionární**, je umístěna v koloně (resp. ve vrstvě), druhá, která unáší separované látky ložem stacionární fáze, je fáze **mobilní**. Při styku stacionární i mobilní fáze s dělenými látkami dochází k vzájemným interakcím, které jsou základním předpokladem pro jejich úspěšnou separaci.

**Chromatografické metody** (tabulka 1) můžeme dělit podle tří hledisek:

## 1. podle skupenství mobilní fáze

kapalinová chromatografie - mobilní fáze je kapalina

plynová chromatografie - mobilní fáze je plyn

## 2. podle typu vzájemných interakcí

adsorpční chromatografie - dělení je založeno na různé adsorbovatelnosti dělených látek na daný adsorbent

rozdělovací chromatografie - dělení se uskutečňuje na základě různého rozdělovacího koeficientu dělených látek mezi fázemi

iontově výměnná chromatografie - rozdělování je dáno výměnnou iontů z kapalně mobilní fáze za ionty vázané na tuhém měničci iontů (ionexu)

gelová chromatografie - dělení se uskutečňuje na základě různé rychlosti průchodu rozličně velkých molekul jednotlivých látek vysoce porézními gely některých polymerů

afinitní chromatografie - dělení se uskutečňuje na základě interakcí dělené látky se skupinami či molekulami zabudovanými do syntetické molekuly matrice

## 3. podle způsobu provedení

kolonová chromatografie - stacionární fáze je umístěna v koloně

sloupcová chromatografie - sloupec stacionární fáze je umístěn v koloně s velkými rozměry (zejména s velkou šířkou), kde tok mobilní fáze je dán pouze gravitační silou

chromatografie v plochém provedení (papírová a tenkovrstvá) - k separaci látek dochází při průchodu rozpouštědla chromatografickým papírem či vrstvou sorbentu

## 4. podle složení mobilní fáze

isokratické dělení - mobilní fáze má po celou dobu dělení stejné složení

dělení s proměnlivým složením mobilní fáze - obvykle se některé složky analyzované směsi nejprve zachytí na stacionární fázi a ostatní složky se mobilní fází vymyjí, potom se mění složení mobilní fáze (postupně nebo skokem) a jednotlivé složky směsi se postupně vymývají z kolony.

V klinické biochemii jsou chromatografické metody široce využívány. Zejména se využívá plynová chromatografie na kapilárních kolonách a vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC). Tyto metody ve spojení s hmotnostní spektrometrií jsou využívány jako absolutní (definitivní) metody. Příklady metod a typů chromatografie využívané pro diagnostiku dědičných metabolických poruch jsou uvedeny v tabulce 2.

**Tabulka 1. Přehled chromatografických metod**

| Mobilní fáze | Stacionární fáze | Separční mechanismus a funkce      | Chromatografická technika  |
|--------------|------------------|------------------------------------|--|
| plyn         | kapalina         | rozdělování, rozdělovací rovnováha | plynová rozdělovací chromatografie (GLC)   |
|              | tuhá látka       | adsorpce, adsorpční izoterma       | plynová adsorpční chromatografie (GSC)   |
|              |                  | síťový efekt                       | plynová chromatografie na molekulových sítích  |
| kapalina     | kapalina         | rozdělování, rozdělovací rovnováha | kapalinová rozdělovací chromatografie (LLC)<br>papírová a tenkovrstvá chromatografie (PC, TLC) |
|              |                  | síťový efekt                       | gelová permeační chromatografie (GPC)<br>(tenkovrstvá chromatografie na gelech)                |
|              | tuhá látka       | adsorpce, adsorpční izoterma       | kapalinová chromatografie adsorpční (LSC)<br>tenkovrstvá chromatografie (TLC)                  |
|              |                  | iontová výměna, výměnná rovnováha  | iontově výměnná chromatografie (IEC)   |
|              |                  | biospecifická chemická reakce      | afinitní (bioafinitní) chromatografie  |

**Tabulka 2. Chromatografické metody v diagnostice dědičných metabolických poruch**

| Metabolity                  | Chromatografická technika          |
|-----------------------------|------------------------------------|
| Organické kyseliny<br>VLCFA | plynová rozdělovací chromatografie |
| Aminokyseliny               | iontově výměnná chromatografie     |

|  |   |
|--|---|
| Sacharidy  | dvojrozměrná tenkovrstevná chromatografie |
| Galaktóza<br>Galaktóza-1-fosfát<br>Oligosacharidy<br>Guanidinoacetát | tenkovrstvá chromatografie                |
| Puriny a pyrimidiny  | vysokoučinná kapalinová chromatografie    |
| Aminokyseliny  | papírová chromatografie                   |

# Plynová chromatografie

Zdeněk Čánský, Petr Chrastina

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

**Plynová chromatografie (GC)** je chromatografická separační metoda, založená na rozdílu v distribuci látek mezi dvě nemísitelné fáze – mobilní a stacionární. Stacionární fáze je obsažena v koloně a mobilní fáze je nosný plyn, který se pohybuje skrz nebo podél stacionární fáze. Jako nosné plyny se nejčastěji používají vodík, dusík, helium, argon. Při volbě nosného plynu se uvažují následující faktory: viskozita, účinnost, čistota, reaktivita, typ používaného detektoru a cena plynu.

Závislost výšky teoretického patra na průměrné lineární rychlosti pro daný typ nosného plynu lze získat z van Deemterových grafů.

## Plynový chromatograf

Přístroj se skládá z dávkovacího zařízení, chromatografické kolony, která je umístěna v termostatu, detektoru a systému na zpracování dat (např. integrátor, zapisovač). Stanovení se provádí při konstantní teplotě, nebo podle daného teplotního programu.

**Dávkovací zařízení** neboli injektor musí splňovat následující požadavky: vzorek vstupující na kolonu musí mít co nejmenší objem, nesmí dojít k rozkladu vzorku v injektoru během odpaření, signál rozpouštědla nesmí ovlivňovat plochu signálů analytů. Součástí injektoru může být skleněná vložka (liner, glass insert), ve které dochází k odpaření vzorku a ke správnému promíchání par vzorku s nosným plynem, a ve které se také zachytí netěkavé látky. Septum odděluje prostor injektoru od vnějšího prostoru a přes septum se pomocí injekční stříkačky s jehlou provádí nástřik vzorku.

**Splitování** je technika nástřiku, při které je směs vzorku a nosného plynu v injektoru rozdělena na dvě nestejně části - menší část vstupuje na kolonu, větší část odchází do odpadu.

**Splitovací poměr** závisí na relativní velikosti průtoků splitovacím ventilem a kolonou a lze jej vypočítat podle následujícího vztahu: (průtok splitovacím ventilem + průtok kolonou)/průtok kolonou.

**Nástřik bez splitu** (splitless injection) se používá při stopové analýze nebo pro analýzu směsí látek, které se výrazně liší v bodu varu.

**Kolona** je umístěna v peci, která je temperována na určitou teplotu. Teplota je důležitá proměnná v plynové chromatografii. Pokud je teplota kolony během analýzy vzorku konstantní, jedná se o izotermální analýzu. Naproti tomu pro analýzu vzorků multikomponentních směsí látek s rozdílnými body varu je vhodné použít teplotního gradientu. To znamená, že teplota kolony během analýzy se bude měnit podle vytvořeného teplotního programu. Výhodou použití teplotního gradientu je zlepšení tvaru chromatografických píků (zúžení signálu, vyšší citlivost) a výrazné zkrácení doby analýzy. V plynové chromatografii lze použít dva typy kolon: náplňové kolony a kapilární kolony.

**Detektor** - většina plynových chromatografů využívá plamenově ionizačního detektoru (FID - flame ionization detector). Skládá se z ocelové trysky, do které vstupuje směs nosného plynu, vodíku a doplňkového plynu. Na špičce mikrohořáku dochází v proudu vzduchu ke spálení této směsi na ionty, které se sbírají na polarizovaných elektrodách a generují proud, jenž se zesiluje a předává na zapisovač. Proudové pozadí je mezi  $10^{-13}$  a  $10^{-14}$  A, zatímco proud generovaný po spálení solutů je v rozmezí  $10^{-12}$  až  $10^{-6}$  A. Přesný mechanismus

plamenové ionizace není znám. Nicméně, její účinnost je dostatečná pro to, aby se dosáhlo vysoké citlivosti a linearity signálu. FID nedetekuje anorganické látky, avšak většina organických látek poskytuje odezvy úměrné obsahu uhlíku a vodíku v analytu. První látky určité homologické řady nebo sloučeniny s velkým obsahem kyslíku dávají obvykle na tomto detektoru sníženou odezvu. FID využívá tři plyny: doplňkový plyn, vodík a vzduch. Nastavení průtoku vodíku a vzduchu je velmi důležité a musí být provedeno i s ohledem na nosný plyn. Maximální linearitu a citlivosti se dosahuje při optimálním poměru doplňkový plyn/vodík. Odchytky od optimálního poměru mají za následek nestabilní plamen a velký šum.

**Záznam chromatografu** - výsledný proudový signál se převádí na napěťovou odezvu. Chromatogram se potom získá jako grafický záznam závislosti napěťové odezvy na čase. Ze získaných chromatogramů lze vyhodnotit retenční parametry jednotlivých signálů, plochy a výšky píků atd.

**Kvalitativní analýza** - chromatografie je separační metoda a jako taková neposkytuje informace o struktuře látek ve vzorku. Při kvalitativní analýze v chromatografii se identifikace analytu provádí na základě srovnání retenčních dat analytu a standardu. Retenční data analytu odrážejí specifické interakce analytu se stacionární a mobilní fází. Např. retenční čas lze považovat za specifickou vlastnost analytu v daném chromatografickém systému, a tedy retenční časy mohou sloužit jako prostředek pro identifikaci látek v daném chromatografickém systému.

Je však nutno si uvědomit, že retenční čas není neměnnou vlastností analytu, ale je důsledkem jeho retence v daném systému, přičemž změny chromatografického systému způsobují změny retenčního času. Též je jasné, že retenční čas sám o sobě nemůže sloužit k identifikaci daného analytu a že bez předchozí částečné znalosti vzorku se retenční čas nedá obecně použít pro identifikaci látek. Z toho vyplývá, že 100% identifikace v chromatografii není možná. Existuje vždy předpoklad o identitě, který závisí na předběžné znalosti analytu, efektivnosti systému a použité identifikační metodě.

**Kvantitativní analýza** - výška nebo plocha chromatografického píku příslušející dané komponentě jsou měřítkem množství této komponenty ve vzorku. Za předpokladu lineární odezvy detektoru je plocha či výška píku úměrná množství látky. To umožňuje určovat množství či koncentraci dané látky v neznámém vzorku na základě použití vzorku dané látky o známém množství či koncentraci, tzv. standardu.

Kvalita kvantitativní analýzy je především ovlivněna přípravou vzorků, správnou funkcí přístroje a kvalitou zpracování dat, s čímž také souvisí správná volba kalibrační metody.

# Kapalinová chromatografie

*Josef Bártil, Jakub Krijt*

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

**Chromatografie** je fyzikálně-chemická separační technika využívající dělení analytů ve směsi na základě jejich rozdílné distribuce mezi stacionární a mobilní fází.

Podle experimentálního uspořádání, mechanismu separace, druhu mobilní a stacionární fáze se rozlišují různé druhy chromatografií.

**Kapalinová chromatografie (LC)** je takový systém, v němž je mobilní fází kapalina a stacionární fází pevná látka (LSC) nebo nemísitelná kapalina zakotvená na pevném nosiči (LLC).

Podstata dělení analytů ze směsi:

1. rozdílné analyty mají rozdílnou afinitu ke stacionární fázi;
2. rozdílné analyty podléhají rozdílné distribuci mezi stacionární a mobilní fází;
3. rozdílné analyty jsou rozdílně retardovány a tedy rozdílně eluovány.

Podle experimentálního uspořádání kapalinové chromatografie je historicky starší **systém sloupcové techniky**, kdy je mobilní fáze spolu se směsí analytů za pouhé asistence gravitace promývána přes vertikální sloupec sorbentu, na jehož povrchu dochází k separaci.

Druhou možností je instrumentální technika **vysokoučinné (vysokotlaké) kapalinové chromatografie (HPLC)**, kde k separaci dochází stejným způsobem, ovšem za pomoci tlakového čerpadla, které zajišťuje kontinuální průtok mobilní fáze přes kolonu za vysokých tlaků.

Podle mechanismu separace se dá LC rozdělit na adsorpční (LSC), rozdělovací (LLC), iontově výměnou (IEC) a gelovou permeační (GPC).

Další možností, kde se jako mobilní fáze využívá kapaliny, je tzv. **planární chromatografie**. Jedná se o papírovou chromatografii (PC) a chromatografii na tenké vrstvě (TLC).

## HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Jedná se o nejčastější aplikaci v instrumentální analytické chemii. Tato metoda je dostatečně robustní a poskytuje reprodukovatelná data. Lze ji aplikovat na široké spektrum analytů v závislosti na druhu detekce.

HPLC lze podle chemické povahy mobilní a stacionární fáze rozdělit na dva základní druhy:

1. **chromatografie s normálními fázemi (NP-HPLC)**  
stacionární fáze je polární (silikagel) a mobilní fáze je nepolární (např. pentan, hexan, chloroform)
2. **chromatografie s obrácenými fázemi (reverzními) fázemi (RP-HPLC)**  
stacionární fáze je nepolární (modifikovaný silikagel) a mobilní fáze je polární (např. metanol, acetonitril, voda).  
Uvádí se, že tato technika tvoří zhruba 80 % všech HPLC aplikací.

Účinnost separace závisí na druhu použité kolony, která musí být kompatibilní s analyty.

Podobně důležitá je správná volba mobilní fáze a adekvátně zvolený způsob detekce.

Separaci lze ovlivnit několika způsoby. Důležité je pH systému, které ovlivňuje formu, v jaké se analyt nachází. Dále lze korigovat průtok mobilní fáze, teplotu během separace, detekčně neaktivní látky lze podrobit derivatizaci apod.

Velmi důležité je optimálně nadefinovat způsob eluce.

V HPLC se rozlišují dva způsoby eluce:

1. **izokratická eluce** – proces, při kterém se během celé analýzy nemění složení mobilní fáze (stačí jeden zásobník mobilní fáze)
2. **gradientová eluce** - během analýzy se mění podle matematicky nadefinovaného profilu složení mobilní fáze (nutnost mít více čerpadel a systém schopný míchání fází (velmi účinný nástroj pro ladění metody).

**Chromatogram** poskytuje jak kvalitativní informace (retenční čas), tak informace kvantitativní (plocha a výška píku).

Těžiště celé metody leží v detekci, která je závislá na fyzikálně-chemických vlastnostech analyzované látky.

V následující tabulce jsou uvedeny fyzikální veličiny, na základě kterých volíme detekční systém:

| <b>Veličina</b>        | <b>Typ detektoru</b>                |
|------------------------|-------------------------------------|
| Absorpce záření        | Fotometrické (UV, VIS, IR, DAD)     |
| Index lomu             | Refraktometrický                    |
| Fluorescence           | Fluorimetrický                      |
| Elektrolytický proud   | Polarografický                      |
| Elektrická vodivost    | Vodivostní                          |
| Permitivita            | Kapacitní, permitivitní             |
| Elektroodový potenciál | Potenciometrický (Pt, Cu, ISE)      |
| Ionizační proud        | Transportní plamenoionizační        |
| Radioaktivita          | Radiometrický                       |
| Rozptyl světla         | ELS (evaporative light scattering ) |
| M/Z                    | Hmotnostní                          |

Současný trend v oblasti HPLC jde směrem k urychlení a zefektivnění analýzy.

Objevují se mechanicky i chemicky stabilní kolony se zrny pod 2  $\mu\text{m}$ , které vyžadují vysoké pracovní tlaky. Analýzy jsou pak podstatně rychlejší a zvyšuje se separační účinnost. Zároveň klesají i náklady spojené s provozem.

Velké spektrum nabízených kolon velmi rozšířilo oblast aplikací HPLC v analytické chemii. HPLC se uplatňuje například v analýze aromatických uhlovodíků, polycyklických uhlovodíků, fenolů, sacharidů, karboxylových kyselin, aminokyselin, lipidů, anabolik, steroidů, katecholaminů, organických pesticidů atd.

V naší laboratoři používáme HPLC pro stanovení profilu purinových a pyrimidinových derivátů v moči, plazmě a likvoru. Také využíváme aplikace pro stanovení homocysteinu v plazmě (séru) a pterinů v moči.

# Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

*Zdeněk Čánský, Petr Chrastina*

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

**Plynová chromatografie (GC)** je citlivá chromatografická separační metoda, založená na rozdílu v distribuci látek mezi dvě nemísitelné fáze – mobilní a stacionární.

**Stacionární fáze** je obsažena v koloně a **mobilní fáze** je nosný plyn, který se pohybuje skrz nebo podél stacionární fáze. Jako nosné plyny se nejčastěji používají vodík, dusík, helium, argon. Svým chováním by se měl blížit plynu ideálnímu. K tomu má blízko helium, ale je drahé. Nejčastěji se proto používá dusík, argon nebo vodík. Nosný plyn nesmí obsahovat vodu a kyslík.

Přístroj se skládá z dávkovacího zařízení, **chromatografické kolony**, která je umístěna v termostatu, **detektoru** a systému na zpracování dat (např. integrátor, zapisovač). Stanovení se provádí při konstantní teplotě nebo podle daného teplotního programu.

Metoda plynové chromatografie dokáže rychle a účinně oddělovat složité směsi a pracovat s malými množstvími vzorků při použití relativně jednoduché aparatury. Vhodná je zejména k analýzám těkavých látek. Předností je vysoká selektivita separačního procesu.

**Hmotnostní spektrometrie (MS)** je instrumentální metoda s vysokou citlivostí detekce různých látek.

Z elektroneutrálních molekul nebo prvků se vytvářejí ionty, které se při přebytku získané vnitřní energie mohou dále štěpit na fragmenty nesoucí náboj, radikály a neutrální částice. Nabitě částice (molekulární a fragmentové ionty) jsou pak separovány podle poměru hmotnosti k náboji ( $m/z$ ) a detekovány.

Základními částmi většiny hmotnostních spektrometrů jsou iontový zdroj, ve kterém dochází ke generování iontů, analyzátor iontů, kde jsou ionty separovány v závislosti na poměru  $m/z$ , a detektor iontů.

Prvním krokem hmotnostní analýzy je převedení molekul nebo atomů analytů na ionty v plynné fázi. Proces, při kterém z neutrálních částic vznikají ionty, se nazývá **ionizace**. Tento proces probíhá v **iontovém zdroji**.

Do současnosti byla vyvinuta celá řada ionizačních technik.

Nejvíce používanou jsou elektronová ionizace (EI), chemická ionizace (CI), ionizace elektrickým polem (FI). V biologických aplikacích jsou nejčastějšími technikami ionizace elektrosprejem (ESI), chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI) a ionizace laserem za asistence matrice (MALDI).

Druhým krokem je analýza iontů. Existuje několik typů **hmotnostních analyzátorů**. Většina z nich je založena na interakci nabitých částic s elektrickým nebo magnetickým polem. Často používanými hmotnostními analyzátory jsou kvadrupólový hmotnostní filtr (Q), iontová past (IT), sektorové analyzátory, analyzátor doby letu (TOF) a iontová cyklotronová rezonance (ICR).

Třetím krokem je detekce iontů (kladných nebo záporných).

Základními typy **detektorů** jsou elektronový a fotonový násobič.

**Kombinace plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií (GC/MS)** představuje účinné řešení. Jde o efektivní separační metodu spojenou s velmi citlivou detekcí.

GC/MS je nepostradatelná při analýze neznámých složek směsi. Pro každou složku získá její hmotnostní spektrum a identifikuje ji porovnáním jejího spektra s databází spekter uložených v počítači. Navíc mez detekce je velmi nízká – řádově v desetinách až setinách  $\mu\text{mol/l}$ . Používáme nejběžnější kapilární kolonu, která je dlouhá 30 m, vnitřní průměr 0,25 mm s nanosenou fází tloušťky 0,25  $\mu\text{m}$  obsahující 5 % bifenyl- a 95 % dimethylpolysiloxanu. Z ionizačních technik používáme elektronovou ionizaci (EI) a z analyzátorů máme kvadrupólový hmotnostní filtr.

Na našem pracovišti používáme plynovou chromatografii s hmotnostním spektrometrem nejčastěji na **stanovení organických kyselin v moči**, dále pak na stanovení **organických kyseliny v séru** nebo **plazmě**. Také ho používáme na **stanovení 7-dehydrocholesterolu**, který je posledním meziproduktem v biosyntéze cholesterolu.

GC/MS používáme k potvrzení či vyloučení metabolitů a jejich kvantifikaci, které za normálních okolností nejsou v moči/séru detekovány, a které svědčí pro určité metabolické onemocnění. Pomocí charakteristického hmotnostního spektra pro daný metabolit ověřujeme, která z látek, jež eluují v jeden retenční čas, to je. Také kvantifikujeme určité metabolity při monitorování léčby.

# Tandemová hmotnostní spektrometrie

*Petr Chrastina, Sylvie Šťastná*

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Při **tandemové hmotnostní spektrometrii (MS/MS)** jsou ionty podrobeny dvěma hmotnostním analýzám. Tandemová hmotnostní spektrometrie umožňuje rychlou analýzu bez použití separačních metod (GC, HPLC) i ve složité matrici. Nejčastěji jsou pro MS/MS analýzu používány trojitě kvadrupólové analyzátory. Mohou ale být použity i jiné hmotnostní analyzátory pro analýzu v prostoru (hexapólové nebo oktapólové analyzátory, analyzátory doby letu, magnetické analyzátory) nebo v čase (iontová past).

Při stanovení skupiny strukturně podobných látek ve složité směsi, např. krvi nebo moči, využíváme toho, že tyto látky odštěpují společný charakteristický fragment. Kvantifikace se provádí pomocí vnitřních standardů stejné struktury jako stanovované látky, které jsou ale označené stabilními izotopy (např. deuteriem  $^2\text{H}$ , uhlíkem  $^{13}\text{C}$ , dusíkem  $^{15}\text{N}$ ).

Pomocí MS/MS můžeme stanovit i nízké koncentrace látek, a to mnohem rychleji než jinými metodami. Jedna analýza pak bez použití separační techniky s využitím přímého nástřiku vzorku do tandemového hmotnostního spektrometru trvá jen několik minut a během jednoho dne lze vyšetřit několik set vzorků. Vysoká citlivost přístroje umožňuje stanovit množství analytu řádově v pikogramech a tedy i množství biologického materiálu potřebného k vyšetření se pohybuje v několika mikrolitrech krve, moči atd. Omezením využitelnosti této metody je molekulová hmotnost stanovované látky (cca 1000 kiloDaltonů).

Tandemový hmotnostní spektrometr se skládá z iontového zdroje, hmotnostního analyzátoru a detektoru.

**Analýza** na trojitěm kvadrupólu probíhá ve čtyřech krocích:

1. ionizace molekuly a přechod ionizovaných molekul do plynné fáze
2. separace molekul podle poměru hmotností a náboje v prvním hmotnostním spektrometru
3. fragmentace separovaných molekul v kolizní cele - vybraný ion podrobíme kolizní aktivaci (nejčastěji srážkám s inertním plynem (dusík, argon) - tzv. terčový plyn). Dojde k rozpadu tohoto iontu na fragmentové ionty.
4. separace a detekce jednotlivých fragmentů molekul.

**Iontový zdroj** slouží k převedení analyzované látky do ionizovaného stavu.

Veškeré informace poskytované hmotnostním spektrometrem se týkají pouze částic nesoucích náboj, ionizace analyzované látky je nezbytným předpokladem analýzy.

Podle množství dodané energie se dělí **ionizační techniky** na tzv. **měkké**, při nichž je energetický přebytek dodaný ionizované molekule malý a pravděpodobnost fragmentace nízká, a na tzv. **tvrdé**, při nichž dodaná energie postačuje k rozsáhlejší fragmentaci primárně vzniklého iontu.

Při spojení hmotnostní spektrometrie s kapalinovou chromatografií se používají tyto ionizační techniky:

- ionizace elektrosprejem (ESI)
- chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI)
- fotoionizace za atmosférického tlaku (Atmospheric Pressure PhotoIonization, APPI)
- ionizace urychlenými atomy (Fast Atom Bombardment, FAB) nebo ionty (Fast Ion Bombardment, FIB)
- ionizace laserem za účasti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, MALDI)

Zatímco FAB, FIB a MALDI lze použít v uspořádání off-line, ESI, APCI a APPI jsou ionizační techniky, které lze použít on-line. Ionizace za atmosférického tlaku znamenala naprostý průlom v řešení spojení HPLC/MS.

**Ionizace elektrosprejem** je v současnosti nejčastěji používaným iontovým zdrojem pro kombinaci LC/MS.

K rozprašení kapalně přivedené do kovové kapiláry dochází vlivem vysokého napětí (3 – 5 kV) vloženého na kapiláru. Vznikají malé kapičky nesoucí velké množství nábojů. Ty jsou protiproudem horkého inertního plynu dále vysušovány. Odpařením rozpouštědla z povrchu kapičky dochází ke zvýšení hustoty povrchového náboje. Když hustota povrchového náboje dosáhne kritické hodnoty, dojde k tzv. Coulombické explozi, rozpadu nabitě kapičky na řadu ještě menších kapiček nesoucích náboj. Nakonec dojde k uvolnění kvazimolekulárního iontu. Vzniklé ionty se vedou vstupní štěrbinou přes iontovou optiku do hmotnostního spektrometru. V procesu ionizace mohou vznikat kladně i záporně jednou nebo vícenásobně nabitě ionty v závislosti na polaritě napětí vloženého na protielektrodu a charakteru látky. ESI se považuje za vůbec nejšetrnější ionizační techniku.

Další ionizační technikou je **chemická ionizace za atmosférického tlaku**.

Vstupní kapilára, kterou se přivádí kapalná fáze z chromatografické kolony, ústí do pneumatického rozprašovače, jehož plášť je vyhříván na teplotu až 700 °C. Dochází k efektivnímu rozprašení a odpaření kapalně fáze. V prostoru koronového výboje generovaného na hrotu tzv. koronové jehly, dochází k ionizaci par mobilní fáze nebo molekul zmlžovacího plynu a k tvorbě chemicko-ionizačního plazmatu. Molekuly analyzovaných látek jsou pak následně ionizovány mechanismem chemické ionizace přenosem protonu za vzniku kvazimolekulárních iontů typu  $[M+H]^+$  nebo  $[M-H]^-$ . Vznikají téměř výhradně ionty se sudým počtem e<sup>-</sup>; oproti ESI bývá nižší intenzita aduktů s ionty alkalických kovů.

APPI je analogií APCI, ale místo koronárního výboje se na ionizaci použije UV záření. Na rozdíl od ESI a APCI mohou často vznikat ionty s lichým počtem e<sup>-</sup>.

### Základní typy skenů MS/MS

- základní sken: změření hmotnostního spektra v celém studovaném rozsahu m/z
- sken produktových iontů (dříve nazýváno dceřinných) iontů: změříme MS/MS spektrum z vybraného prekurzoru
- sken prekurzorů (dříve rodičovských iontů): pro vybraný fragmentový ion zjistíme původní ion prekurzoru, ze kterého fragmentací vznikl
- sken neutrálních ztrát (Neutral Loss, NL): zjistíme charakterické dvojice iontů prekurzorů a produktů, u kterých dochází k odštěpení vybrané hmotnostní ztráty, např. m/z = 102 pro aminokyseliny
- selektivní záznam jednoho nebo více iontů (Selected Ion Monitoring, SIM): měříme pouze závislost signálu vybraného iontu na čase (nebo více iontů)
- selektivní záznam jedné nebo více reakcí (Selected Reaction Monitoring, SRM): prvním analyzátozem vybereme ion prekurzoru, který potom v kolizní cele podrobíme fragmentaci a my sledujeme pouze vybraný charakteristický fragmentový ion (lze sledovat i více reakcí naráz).

### Použití tandemové hmotnostní spektrometrie

#### 1. novorozenecký screening dědičných metabolických poruch

Stanovení koncentrací aminokyselin a acylkarnitinů v suché krevní kapce pro diagnostiku aminoacidopatií, organických acidurií a poruch oxidace mastných kyselin.

2. analýza proteinů a jejich identifikace

Stanovení kvantity proteinů (např. glykovaného hemoglobinu) a kvalitativních vlastností (např. vazba v membráně, sekundární, terciární a kvartérní struktura proteinu). Identifikace proteinu na základě fragmentových iontů vzniklých odštěpování aminokyselin.

3. analýza látek ve spojení s kapalinovou chromatografií.

# Kapilární elektroforéza

*Petr Horník*

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

**Kapilární elektroforéza (CE)** je analytická metoda, kterou lze použít k řešení běžných i speciálních klinicko-biochemických problémů. Své uplatnění nalézá především v analýze sérových proteinů, lipoproteinů, izoenzymů a v diagnostice hemoglobinopatií. CE je vhodnou komplementární separační metodou k vysokoúčinné kapalinové chromatografii (HPLC) pro monitorování hladin léčiv v tělních tekutinách. Ve specializovaných laboratořích (např. diagnostika dědičných metabolických poruch) CE postupně nahrazuje některé jiné separační techniky pro svou vysokou separační účinnost, rychlost analýzy, nízké nároky na množství vzorku a podstatně nižší náklady na analýzu.

**Princip** elektroforézy spočívá v migraci elektricky nabitých částic ve stejnosměrném elektrickém poli. V CE je kapilára naplněna základním elektrolytem a její konce, společně s elektrodami z inertního materiálu (Pt), jsou ponořeny do zásobníků s elektrolytem. Mezi elektrody se aplikuje vysoké napětí (10 – 30 kV). Malý objem vzorku se dává do konce kapiláry. Kapilára prochází přes detektor (UV, LIF).

Záznam závislosti odezvy detektoru na čase se nazývá **elektroforeogram**, který je podobný chromatogramu. Poloha píků určuje kvalitu, plocha nebo výška píků určuje kvantitu.

**Doba analýzy** v CE se oproti plošnému uspořádání zkracuje zejména z těchto důvodů:

1. teplo tvořené uvnitř kapiláry je účinně odváděno jejími stěnami, proto lze použít vysokých napětí;
2. kapilára prochází detektorem a je prováděna on-line detekce zón a počítačové vyhodnocení píků;
3. elektroosmotický tok (EOF) má za následek pohyb roztoku k detektoru. Snižuje analytické časy a k detektoru unáší i částice elektroforeticky migrující opačným směrem.

**Elektroosmotický tok (EOF)** je nejdůležitějším jevem doprovázejícím CE.

Jeho princip spočívá v tom, že stěny kapiláry z taveného křemene obsahují silanolové skupiny, které se při kontaktu s roztoky o vyšším pH disociují. Disociací se vytváří záporný náboj stěny.

K „záporné“ stěně je přitažena vrstva kovových iontů (kationtů) základního elektrolytu a vzniká elektrická dvojrstva. Je-li zavedeno napětí, tyto kationty migrují ke katodě (záporná elektroda). Vodíkové kationty bývají silně hydratovány a jejich pohyb společně s asociovanými molekulami vody vyvolá tok celého roztoku v kapiláře směrem k detektoru, který je umístěn před katodou. Tok bývá tak silný, že ke katodě nese i záporně nabití ionty. Neutrální částice se pohybují rychlostí elektroosmotického toku.

**Kapiláry** jsou vyráběny z taveného křemene a mají ochranný polyamidový povlak. V místě detekce je malý podíl povlaku odstraněn. Kapilára je běžně 25 – 100 cm dlouhá s vnitřním průměrem 50 – 75  $\mu\text{m}$ . Vnitřní povrch kapiláry může být chemicky modifikován kovalentním navázáním různých látek. Regulací teploty (vzduchem, kapalinou) kapiláry se zajišťují stálé podmínky separace. Roztok vzorku (10 – 100  $\text{nl}$ ) je dávkován obvykle do konce kapiláry vzdálenějšího od detektoru. Dávkovat lze tlakem plynu na hladinu vzorku (nejběžnější), rozdílem hladin nebo elektrokineticky. Detektory používané pro CE musí být hodně citlivé, protože průměr kapiláry je malý. Nejběžnější jsou UV detektory využívající diodové pole. Citlivost se pohybuje kolem  $10^{-6}$   $\text{mol/l}$ . Velmi citlivý (a také drahý) je detektor s laserem

indukovanou fluorescencí (LIF). V poslední době se často využívá kombinace s hmotnostní spektrometrií, což umožňuje získat informace o struktuře separovaných látek.

Je vypracována řada separačních technik a **modifikací prosté CE**.

Příkladem je kapilární zónová elektroforéza (CZE) neboli CE ve volném roztoku (FSCE). Separace je zde založená na rozdílech v náboji analytů.

Micelární elektrokinetická kapilární chromatografie (MECC) se používá k separaci neutrálních sloučenin a využívá povrchové aktivity micel.

Kapilární gelová elektroforéza (CGE) využívá molekulově-sítového efektu rozpuštěných látek v prostředí gelu.

Kapilární isoelektrická fokusace (CIEF) slouží k separaci amfolytů v gradientu pH.

Kapilární elektrochromatografie (CEC) využívá k pohybu mobilní fáze elektroosmotického toku a separace nastává na silikagelu jako stacionární fázi. Separace v CEC je kombinací elektroforézy a chromatografie.

CE je pro své již výše uvedené vlastnosti velmi perspektivní v **diagnostice dědičných metabolických poruch**.

Byl vyvinut postup umožňující stanovení fenylalaninu v séru, vhodný pro monitorování léčby pacientů s fenylketonurií. Stanovení kyseliny methylmalonové CE-LIF po derivatizaci umožňuje monitorování léčby pacientů s methylmalonovou acidémií a pro stanovení methylmalonové kyseliny v séru jako indikátoru kobalaminové deficiencie. CE lze použít pro diagnostiku a monitorování onemocnění spojených s poruchami aminokyselin obsahujících thiolovou skupinu. Perspektivní se CE jeví při diagnostice dědičných poruch metabolismu purinů a pyrimidinů, při screeningu metabolitů v moči, stanovení hladiny nukleotidů a aktivit purinových enzymů.

### **Literatura**

Klouda P.: Moderní analytické metody. Nakladatelství Pavel Klouda, Ostrava 2003, str. 33-41.

Adam T., Ševčík J.: Aplikace kapilární elektroforézy v klinické biochemii. *Klin Biochem Metab* 5(26);1997,265-69.

## Barva a zápach moče

*Petr Chrastina, Sylvie Šťastná, Eva Košťálová*

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

I v současné době, plně složitých analytických přístrojů a přístupů, nás takové informace, jako barva a zápach moče, mohou navést ke správné diagnóze.

U zdravých lidí má moč téměř průhlednou až jasně žlutou barvu.

### Barva moče

| Barva moče       | Sloučenina               | Onemocnění/Zdroj                          |
|------------------|--------------------------|---|
| Modrá            | Indikan                  | Hartnupova choroba<br>Blue Diaper Syndrom |
| Modrá/hnědá      | Homogentisát             | Alkaptonurie                              |
| Hnědá            | Methemoglobin            | Myoglobinurie                             |
| Červená až hnědá | Hemoglobin/methemoglobin | Hemoglobinurie                            |
| Červená          | Erytrocyty               | Hematurie                                 |
| Červená          | Porfyriny                | Porfyrie                                  |
| Červená          | Pyrazolon                | Léky                                      |
| Červená          | Fenolftalein             | Chemikálie                                |
| Světle červená   | Uráty                    | Hyperurikosurie                           |
| Červená          | Červená barviva          | Potraviny                                 |
| Žlutá            | Riboflavin               | Vitaminy                                  |

### Zápach moče

| Zápach moče             | Sloučenina                                | Onemocnění/Zdroj  |
|-------------------------|---|---|
| Plesnivina, myšina      | Fenylacetát                               | Klasická PKU  |
| Maggi, kari             | 2-oxoisovalerát                           | Leucinóza   |
| Javorový sirup, karamel | 2-oxoisoakaproát<br>2-oxo-3-methylvalerát | Leucinóza   |
| Zpocené nohy            | Isovalerát                                | Isovalerová acidémie<br>3-hydroxy-3-methylglutarová acidurie<br>Glutarová acidurie II |
| Kočí moč                | 3-hydroxyisovalerát                       | Deficit<br>3-methylkrotonyl-CoA-karboxylasy<br>Mnohočetný deficit karboxyláz          |
| Zelí                    | 2-hydroxybutyrát                          | Malabsorpce methioninu<br>Tyrosinémie typu I  |
| Žluklé máslo            | 2-oxo-4-methylbutyrát                     | Tyrosinémie typu I  |
| Kyselý zápach           | Methylmalonová kyselina                   | Methylmalonová acidémie   |
| Zápach síry             | Sírovodík                                 | Cystinurie  |
| Rybina                  | Trimethylamin                             | Trimethylaminurie   |

## Aminokyseliny semikvantitativně v krvi/séru/plazmě

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Název</b>                  | <b>Aminokyseliny (AMK) semikvantitativně v krvi/séru/plazmě</b>  |
| <b>Synonyma</b>               | screening AMK v krvi/séru/plazmě papírovou chromatografií  |
| <b>Typ metody</b>             | semikvantitativní  |
| <b>Princip stanovení</b>      | AMK se dělí v systému jednorozměrné chromatografie na papíře s ninhydrinovou detekcí<br>meze detekce fenylalaninu a tyrosinu jsou cca 0,2 mmol/l   |
| <b>Materiál</b>               | krev, sérum, krevní papírek  |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | vzorkem je suchá krevní kapka na testovací kartičce Schleicher-Schuell 903<br>kruhy vyznačené na testovací destičce musí být plně prosáknuty krví (viditelně z přední a zadní strany kartičky)<br>kartička nesmí být krví nasakována opakovaně<br>kartička musí být usušena při pokojové teplotě, nesmí být zahřívána<br>kartičky se skladují v suchu a temnu při pokojové teplotě<br>jsou známé lékové interference, hl. při podávání antibiotik (ampicilin, cefalosporiny aj.) |
| <b>Jednotky</b>               | mmol/l (pouze fenylalanin a tyrosin), arb. j. (ostatní)  |
| <b>Referenční meze</b>        | horní referenční meze jsou pro všechny stanovované aminokyseliny nižší než jejich mez detekce touto metodou  |

### Indikace k vyšetření

1. novorozenecký screening hyperfenylalaninémie/fenylketonurie (HPA/PKU), (viz Věstník MZd ČR, částka 7, září 2003)  
Povinný novorozenecký screening HPA byl zaveden v České republice v r.1975 metodickým návodem č. 15/1975 věstníku Ministerstva zdravotnictví ČR. V roce 2003 byl novelizován a vydán jako Metodické opatření č. 7/2003 **Metodický návod k zajištění celoplošného novorozeneckého laboratorního screeningu a následné péče.**  
Testovací kartičky se suchými krevními skvrnami posílají novorozenecká odd. a praktičtí lékaři pro děti a dorost.
  2. screening HPA gravidních (maternální HPA)  
Testovací kartičky se suchými krevními skvrnami posílají gynekologové.
  3. susp. hyperaminoacidémie v rámci selektivního screeningu
  4. selektivní screening  
Vyšetření se provádí se u každého poprvé vyšetřovaného pacienta.
  5. monitorování kompenzace pacientů s HPA/PKU.
- Pozn. Metoda je v letech 2008 (selektivní screening) a 2009 (novorozenecký screening) nahrazena vyšetřením tandemovou hmotnostní spektrometrií.

### Interpretace výsledků

Vyšetření umožňuje diagnostikovat většinu případů HPA a tyrosinémie.  
Zachytí mírné zvýšení koncentrace fenylalaninu, tyrosinu, větvených aminokyselin a výrazné zvýšení koncentrace glycinu, methioninu, glutaminu a alaninu.

Koncentrace ostatních AMK nelze touto metodou spolehlivě posoudit. Významné nálezy jsou ověřovány kvantitativní metodou, viz Aminokyseliny kvantitativně v séru/plasmě.

**Izolované zvýšení koncentrace fenylalaninu** nacházíme u HPA/PKU.

**Izolované zvýšení koncentrace tyrosinu** nacházíme u novorozenců (hlavně nezralých), zvláště při zvýšeném příjmu bílkovin, při hepatopatii, u tyrosinémie typu I (koncentrace se zvyšuje obvykle od 2. týdne po narození), tyrosinémie typu II a III.

**Izolované zvýšení koncentrace jednotlivých AMK** – viz Aminokyseliny kvantitativně v séru/plasmě.

**Hraniční koncentrace větvených AMK, fenylalaninu a tyrosinu** bývá postprandiálně a při hyperalimentaci.

**Zvýšení koncentrace řady AMK** nacházíme při postprandiálním odběru, parenterálním podávání AMK, hyperalimentaci, hepatopatii, dekompozici vzorku, kontaminaci, hemolýze, pozdním oddělení séra/plazmy aj.

## Aminokyseliny semikvantitativně v moči

Sylvie Štátná, Petr Chrastina, Eva Košťálová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Aminokyseliny (AMK) semikvantitativně v moči</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | screening AMK v moči papírovou chromatografií   |
| <b>Typ metody</b>             | semikvantitativní   |
| <b>Princip stanovení</b>      | AMK se dělí v systému jednorozměrné chromatografie na papíře s ninhydrinovou detekcí.   |
| <b>Materiál</b>               | moč, močový papírek   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | vzorkem je suchá močová kapka na testovací kartičce Schleicher-Schuell 903 kruhy vyznačené na testovací destičce musí být plně prosáknuty močí (viditelně z přední a zadní strany kartičky) kartička nesmí být močí nasakována opakovaně kartička musí být usušena při pokojové teplotě, nesmí být zahřívána kartičky se skladují v suchu a temnu při pokojové teplotě jsou známé lékové interference, hl. při podávání antibiotik (ampicilin, cefalosporiny aj.)<br>výsledek vyšetření je ovlivněn koncentrovaností moče u výrazně koncentrovaných močí (koncentrace kreatininu nad 10-15 mmol/l) je riziko falešně pozitivního výsledku s nálezem generalizované hyperaminoacidurie<br>v nedostatečně koncentrované moči (koncentrace kreatininu pod 1 mmol/l) není vyšetření touto metodou spolehlivé a je riziko falešně negativního výsledku |
| <b>Jednotky</b>               | arb. j.   |
| <b>Referenční meze</b>        | -   |

**Indikací** je susp. hyperaminoacidurie, tubulopatie nebo cystinurie v rámci selektivního screeningu.

Vyšetření se provádí u každého poprvé vyšetřovaného pacienta.

**Metodika umožňuje** zachytit v dostatečně koncentrované moči (koncentrace kreatininu nad 1 mmol/l) středně zvýšenou koncentraci cystinu, histidinu, fenylalaninu, tyrosinu, výrazně zvýšenou koncentraci glycinu, alaninu a prolinu, a významnou generalizovanou hyperaminoacidurii.

Koncentrace ostatních aminokyselin nelze touto metodou spolehlivě posoudit.

Významné nálezy jsou ověřovány kvantitativní metodou, viz Aminokyseliny kvantitativně v moči.

## Aminokyseliny kvantitativně v séru/plazmě

Michala Klímová, Sylvie Šťastná, Petr Chrástina

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Název</b>                  | <b>Aminokyseliny (AMK) kvantitativně v séru/plazmě</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | profil aminokyselin v séru/plazmě kvantitativně  |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní, profilová   |
| <b>Princip stanovení</b>      | deproteinace plazmy/séra, automatický analyzátor aminokyselin, ionexová chromatografie, ninhydrinová detekce   |
| <b>Materiál</b>               | plazma/sérum   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | odběr ideálně 4-6 hodin po posledním jídle<br>odběr postprandiálně - zvýšené hladiny esenciálních aminokyselin<br>odběr nalačno - zvýšení koncentrace větvených aminokyselin, koncentrace většiny ostatních aminokyselin je nízká<br>vzorky určené pro diagnostiku DPM je nutno odebrat v době, kdy nejsou podávány i.v. aminokyseliny<br>při podezření na intermitentně probíhající DMP je nutné vyšetření vzorku z akutního stavu při atace<br>izolace plazmy/séra a deproteinace ideálně do 60 minut po odběru<br>minimální množství vzorku je 0,3 ml plazmy/séra<br>hemolýza - změna hladin aminokyselin vlivem vysokých koncentrací aminokyselin v krevních buňkách (taurinu z krevních destiček) nebo vlivem erytrocytárních enzymů (argináza přeměňuje arginin na ornithin)<br>transport při běžné teplotě – zvýšení koncentrací glutamátu a aspartátu, snížení koncentrací glutaminu, asparaginu, cysteinu a homocysteinu<br>minimální ovlivnění koncentrace aminokyselin během transportu - fenylalanin, tyrosin a větvené aminokyseliny (valin, isoleucin, leucin), jsou minimálně ovlivněny transportem, jsou vhodné pro hodnocení kompenzace |
| <b>Jednotky</b>               | μmol/l   |
| <b>Referenční meze</b>        | podle interních norem  |

**Aminokyseliny** jsou stavební kameny bílkovin, významné metabolity v intermediárním metabolismu, součást metylačních reakcí v cytosolu a metabolismu neurotransmiterů aj. Metabolismus aminokyselin může být postižen řadou dědičných metabolických poruch, tyto poruchy mohou být diagnostikovány analýzou tělesných tekutin na aminokyseliny, organické kyseliny, kyselinu orotovou aj.

Některé aminokyseliny, zvláště homocystein a tryptofan, vyžadují specifické metody pro přesnou kvantifikaci (obvykle HPLC).

**Indikací** jsou **klinické symptomy** – intolerance stravy, neobvyklé dietní zvyky, zvracení, neprospívání, hypotonie, letargie, křeče, koma, mentální retardace, mikrocefalie, ataxie, choreoatetóza, spastická paraparéza nebo diplegie, poruchy chůze, problémy s učením, poruchy chování, neuropsychiatrické symptomy, atrofie optiku, retinitis pigmentosa,

dysmorfie, atypický zápach, hepatomegalie, pankreatitis, tubulopatie, tachypnoe, systémové kostní změny, atypické vlasy, kožní léze, akutní dekompenzace.

Indikací jsou také **laboratorní symptomy** – metabolická acidóza, hyperammonémie, hypoglykémie, ketonurie, vyšší anion gap, neutropenie, megaloblastická anemie, deficit vitamínu B<sub>12</sub> nebo folátu, hepatopatie, hypokreatininémie.

Okamžitá analýza by měla být provedena u pacientů s hyperamonií a v jiných akutních stavech.

Stanovení aminokyselin postprandiálně (a nalačno) je vhodné při podezření na poruchy energetického metabolismu.

Opakovaná analýza aminokyselin nalačno je potřebná u pacientů s restrikcí bílkovin nebo specifickou metabolickou dietní léčbou k posouzení příjmu aminokyselin a ke zjištění deficitu esenciálních aminokyselin.

Stanovení koncentrace AMK se provádí u každého poprvé vyšetřovaného pacienta.

### Specifické odchylky v aminogramu v séru/plazmě

| Aminokyselina  | Dědičné metabolické poruchy (DMP) se zvýšenou koncentrací aminokyseliny   |
|--|---|
| Alanin   | Mitochondriální poruchy s laktátovou acidózou<br>DMP s hyperammonémií   |
| Alloisoleucin  | Leucinóza<br>Deficit E3 podjednotky   |
| Arginin  | Argininémie   |
| Argininojantarová kyselina (argininosukcinát)                  | Argininojantarová acidurie  |
| Citrulin   | Citrulinémie<br>Argininojantarová acidurie  |
| Cystathionin   | Deficit $\gamma$ -cystathionázy   |
| Fenylalanin  | Hyperfenylalaninémie<br>Fenylketonurie<br>Poruchy metabolismu pterinů   |
| Fosfoethanolamin   | Hypofosfatázie  |
| $\gamma$ -aminomáselná kyselina (GABA, $\gamma$ -aminobutyryl) | Deficit GABA transaminázy   |
| Glutamová kyselina (glutamát)                                  | DMP s hyperammonémií<br>Glutamová acidémie  |
| Glutamin   | DMP s hyperammonémií  |
| Glycin   | Neketotická hyperglycinémie<br>Ketotická hyperglycinémie u organických acidurií   |
| Histidin   | Histidinémie  |
| Homocystin   | Deficit cblC, cblD a cblE<br>Deficit cystathionin $\beta$ -syntázy<br>Deficit methylenetetrahydrofolátreduktázy (MTHFR) |
| Hydroxyprolin  | Hydroxyprolinémie   |
| Isoleucin  | Leucinóza<br>Deficit E3 podjednotky   |
| Karnosin   | Karnosinémie  |

|           |  |
|-----------|--|
| Leucin    | Leucinóza<br>Deficit E3 podjednotky  |
| Lysin     | Hyperlysinémie I<br>Saccharopinurie  |
| Methionin | Deficit methioninadenosyltransferázy<br>Deficit cystathionin $\beta$ -syntázy            |
| Ornithin  | Gyrátová atrofie<br>HHH syndrom (hyperammonémie, hyperornithinémie,<br>homocitrulinurie) |
| Prolin    | Hyperprolinémie I, II  |
| Sarkosin  | Sarkosinémie   |
| Tyrosin   | Tyrosinémie (I), II, III<br>(Tranzitorní neonatální hypertyrosinémie)                    |
| Valin     | Leucinóza<br>Deficit E3 podjednotky  |

Metoda umožňuje diagnostikovat většinu aminoacidopatií, kromě intermitentně probíhajících DMP, neketotické hyperglycinémie (diagnostika je spolehlivá pouze vyšetřením glycinu v likvoru) a poruch ledvinného transportu (pro potvrzení transportních poruch je nutné vyšetření moči).

Standardně jsou stanovovány **běžné AMK**: alanin, arginin, citrulin, fenylalanin, glutamin, glutamát, glycin, histidin, hydroxyprolin, isoleucin, leucin, lysin, methionin, ornithin, prolin, tyroxin, valin.

Kromě toho lze stanovit také **AMK, které obvykle nejsou v séru/plasmě přítomné**: alloisoleucin, kyselina argininojantarová a její anhydridy, cystathionin, fosfoethanolamin, GABA, homocystin, karnosin, methylhistidiny, sarkosin aj.

Významné **interference** mohou způsobit léky, hlavně antibiotika.

Časté jsou **sekundární a nespecifické odchylky**, příčinami jsou postprandiální odběr, parenterální podávání AMK, hyperalimentace, hepatopatie, dekompozice vzorku, kontaminace, hemolýza, pozdní oddělení séra/plazmy aj.

## Aminokyseliny kvantitativně v moči

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Název</b>                  | <b>Aminokyseliny (AMK) kvantitativně v moči</b>  |
| <b>Synonyma</b>               | profil AMK v moči kvantitativně  |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní, profilová   |
| <b>Princip stanovení</b>      | deproteinace plazmy/séra, automatický analyzátor aminokyselin, ionexová chromatografie, ninhydrinová detekce   |
| <b>Materiál</b>               | nejvhodnější je sběr moči nebo ranní moč, minimálně 10 ml moči   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | spolehlivé je vyšetření v přiměřeně koncentrované moči (1-15 mmol/l) bakteriálně kontaminované vzorky (pH $\geq$ 8,5 a pozitivní nitrity) nejsou vhodné k analýze, bakterie svým aktivním metabolismem mění koncentraci AMK v moči |
| <b>Jednotky</b>               | mmol/mol kreatininu  |
| <b>Referenční meze</b>        | podle interních norem  |

**Analýza AMK v moči** je obvykle méně přínosná než v séru/plazmě, neboť AMK jsou normálně rezorbovány v renálních tubulech, proto mírné až středně významné změny v homeostáze aminokyselin nemohou být zjištěny analýzou moči.

Indikací k vyšetření jsou susp. hyperaminoacidurie, porucha renální tubulární resorpce, např. cystinurie.

### Specifické odchylky v aminogramu v moči

| Aminokyselina  | Dědičné metabolické poruchy (DMP) se zvýšeným vylučováním aminokyseliny  |
|--|--|
| Většina aminokyselin                                     | Povšechná hyperaminoacidémie<br>Fanconiho syndrom<br>Klasická galaktosémie<br>Tyrosinémie I<br>Loweho syndrom<br>Hereditární intolerance fruktózy<br>Vitamin D-dependentní rachitida |
| Neutrální aminokyseliny                                  | Hartnupova choroba   |
| Alanin   | DMP s laktátovou acidózou<br>DMP s hyperammonémií  |
| Alloisoleucin  | Leucinóza<br>deficit E3 podjednotky  |
| $\alpha$ -aminoadipová kyselina ( $\alpha$ -aminoadipát) | $\alpha$ -aminoadipová acidurie  |
| Arginin  | Argininémie<br>Cystinurie<br>Intolerance bílkovin s lysinurií (LPI)  |
| Argininojantarová kyselina (argininosukcinát)            | Argininojantarová acidurie   |

|   |   |
|---|---|
| Asparagová kyselina (aspartát)                        | Dikarboxylová aminoacidurie   |
| Aspartylglukosamin                                    | Aspartylglukosaminurie  |
| Citrulin  | Citrulinémie<br>Argininojantarová acidurie  |
| Cystathionin  | Deficit cystathioninázy   |
| Cystin  | Cystinurie  |
| δ-aminolevulová kyselina<br>(δ-aminolevulát)          | Tyrosinémie I<br>Porfyrie   |
| Fenylalanin   | Hyperfenylalaninémie<br>Fenylketonurie<br>Poruchy metabolismu pterinů   |
| Fosfoethanolamin                                      | Hypofosfatázie  |
| Kyselina<br>γ-aminomáselná<br>(GABA, γ-aminobutyrate) | Deficit GABA transaminázy   |
| Glutamin  | DMP s hyperammonémií  |
| Glutamová kyselina (glutamát)                         | DMP s hyperammonémií<br>Dikarboxylová aminoacidurie   |
| Glycin  | Neketotická hyperglycinémie<br>Ketotická hyperglycinémie u organických acidurií<br>Iminoglycinurie                |
| Histidin  | Histidinémie  |
| Homocitrulin  | HHH syndrom (hyperammonémie, hyperornithinémie,<br>homocitrulinurie)<br>Citrulinémie<br>Argininémie               |
| Homocystin  | Deficit cblC, cblD a cblE<br>Deficit cystathionin β syntázy<br>Deficit methylenetetrahydrofolát reduktázy (MTHFR) |
| Hydroxyprolin   | Hydroxyprolinémie<br>Hyperprolinémie I, II<br>Iminoglycinurie   |
| Iminodipeptidy  | Deficit prolidázy   |
| Isoleucin   | Leucinóza<br>Deficit E3 podjednotky   |
| Leucin  | Leucinóza<br>Deficit E3 podjednotky   |
| Lysin   | Hyperlysinémie<br>Cystinurie<br>Intolerance bílkovin s lysinurií (LPI)<br>Saccharopinurie                         |
| Methionin   | Deficit methioninadenosyltransferázy<br>Deficit cystathionin β syntázy  |
| Ornithin  | Hyperornithinémie<br>Cystinurie<br>Intolerance bílkovin s lysinurií (LPI)   |
| Prolin  | Hyperprolinémie I, II<br>Iminoglycinurie  |

|             |   |
|-------------|---|
| Saccharopin | Saccharopinurie   |
| Tryptofan   | Tryptofanurie   |
| Tyrosin     | Tyrosinémie (I), II, III<br>(Tranzitorní neonatální hypertyrosinémie) |
| Valin       | Leucinóza<br>Deficit E3 podjednotky                                   |

Standardně jsou stanovovány koncentrace **běžných AMK**:

Kromě toho lze stanovit také **AMK obvykle v moči nepřítomné a další ninhydrin-positivní látky**:  $\alpha$ -aminoadipovou kyselinu, argininojantarovou kyselinu a její anhydridy, aspartylglukosamin, citrulin,  $\delta$ -aminolevulovou kyselinu, fosfoethanolamin, homocystin, hydroxyprolin, iminodipeptidy, ornithin, prolin, saccharopin, aj.

Významné **interference** mohou způsobit metabolity některých léků (2-merkaptoethansulfonát, ampicilin, vigabatrin aj.)

## Aminokyseliny kvantitativně v likvoru

Sylvie Šťastná, Petr Chrástina, Eva Košťálová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Název</b>                  | <b>Aminokyseliny (AMK) kvantitativně v likvoru</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | profil AMK v likvoru (CSF) kvantitativně   |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní, profilová   |
| <b>Princip stanovení</b>      | deproteinace plazmy/séra, automatický analyzátor aminokyselin, ionexová chromatografie, ninhydrinová detekce   |
| <b>Materiál</b>               | ideální je likvor, který byl po odběru ihned zamražen<br>minimální množství vzorku je 1 ml likvoru   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | vzorek je nutné uchovávat a posílat na suchém ledu spolu se vzorkem séra/plazmy, získaným v okamžiku lumbální punkce<br>vzorky CSF s větší příměsí krve nejsou použitelné, při malé příměsí krve by měly být vzorky ihned centrifugovány a supernatant zamražen pro analýzu (je třeba informovat laboratoř)<br>hemolytické a jinak nestandardní vzorky nejsou vhodné k analýze<br>okamžité hluboké zamražení a speciální analytické metody jsou potřebné pro stanovení $\gamma$ -aminobutyátu (GABA) |
| <b>Jednotky</b>               | $\mu\text{mol/l}$  |
| <b>Referenční meze</b>        | podle interních norem  |

**Koncentrace AMK v CSF** jsou ovlivněny koncentrací AMK v séru/plazmě, metabolismem AMK v mozku a funkcí hematoencefalické bariéry.

**Indikací** k analýze aminokyselin v CSF je podezření na neurometabolickou poruchu, zvláště u těžké (novorozenecké) epileptické encefalopatie, podezření na neketotickou hyperglycinémií (psychomotorická retardace, hypotonie, křeče) a poruchu biosyntézy serinu (vrozená mikrocefalie, psychomotorická retardace, křeče).

### Specifické odchylky v aminogramu v likvoru

|  |  |
|--|--|
| <b>Aminokyselina</b>   | <b>Dědičné metabolické poruchy se zvýšenou koncentrací aminokyseliny</b> |
| Alanin   | DMP s laktátovou acidosou  |
| Argininojantarová kyselina (argininosukcinát)                  | Argininojantarová acidurie   |
| $\gamma$ -aminomáselná kyselina (GABA, $\gamma$ -aminobutyrát) | Deficit GABA transaminázy  |
| Glycin   | Neketotická hyperglycinémie  |

|                      |  |
|----------------------|--|
| <b>Aminokyselina</b> | <b>Dědičné metabolické poruchy se sníženou koncentrací aminokyseliny</b> |
| Serin                | Porucha v biosyntéze serinu  |

### **Interpretace**

Současné získání vzorku plasmy pro analýzu aminokyselin je důležité, protože výpočet poměru koncentrace aminokyselin v plasmě/v CSF může být nutný pro diagnostiku **neketotické hyperglycinémie** (poměr glycinu v likvoru k plasmě  $> 0,06$ ) a **poruch biosyntézy serinu** (poměr koncentrace serinu v likvoru/v plasmě  $< 0,2$ ).

Zvýšení poměru koncentrace glycinu v likvoru/v plasmě má význam pouze při zvýšených koncentracích glycinu v likvoru. Je-li koncentrace glycinu v plasmě nízká, izolované zvýšení poměru koncentrace glycinu v likvoru/v plasmě způsobené normální koncentrací glycinu v likvoru neznamena neketotickou hyperglycinémií.

Také interpretace koncentrací aminokyselin v CSF mimo normy je spolehlivější, jsou-li dostupné současné koncentrace v plasmě.

**Nespecifické odchylky** v koncentraci AMK v likvoru nacházíme při příměsi krve v likvoru a při poruše hematoencefalické bariéry různého původu.

## Biotinidáza kvalitativně

*Eva Košťálová, Petr Chrastina, Sylvie Šťastná*

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Název</b>                  | <b>Biotinidáza kvalitativně</b>  |
| <b>Synonyma</b>               | -  |
| <b>Typ metody</b>             | kvalitativní   |
| <b>Princip stanovení</b>      | inkubace se substrátem n-biotinyl-PABA, naftolové činidlo, vizuální hodnocení  |
| <b>Materiál</b>               | krevní nebo sérový papírek   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | nelze vyšetřovat v plasmě, interference při léčbě sulfonamidy<br>riziko falešně pozitivního výsledku po transfuzi krve, erymasy a plasmy labilní enzym, možnost poklesu aktivity v čase při nevhodném skladování nebo při vyšších teplotách (např. v létě)<br>nižší aktivita u nezralých novorozenců |
| <b>Jednotky</b>               | -  |
| <b>Referenční meze</b>        | negativní  |

**Biotin** je vitamín ve vodě rozpustný, který je vázaný na bílkoviny. Je nezbytný jako koenzym čtyř významných karboxyláz intermediárního metabolismu sacharidů, mastných kyselin a aminokyselin.

**Biotinidáza** je enzym, který uvolňuje biotin z biotinylovaných peptidů exogenního nebo endogenního původu. Tím se biotin stává dostupný pro aktivaci výše uvedených karboxyláz.

**Deficit biotinidázy** způsobuje depleci biotinu. Endogenní biotin nemůže být recyklován, organismus nemůže využít biotin vázaný na bílkoviny ze stravy.

Může se projevat jako ataky ketoacidózy se zvracením, torpidní dermatitida, jako progredující neurologické a oční postižení (psychomotorická retardace, křeče, hypotonie, ataxie, atrofie optiku, keratokonjunktivis) nebo recidivující infekty.

Symptomy deficitu biotinidázy jsou variabilní a nespecifické, mohou se objevit od novorozeneckého věku po dospělost, proto je vysoké riziko pozdní diagnostiky.

V některých zemích se provádí novorozenecký screening, který umožní časně stanovení diagnózy a zlepšení prognózy pacientů.

Vyšetření se provádí se u každého poprvé vyšetřovaného pacienta.

Sníženou aktivitu je nutno ověřit kvantitativní metodou.

## Biotinidáza kvantitativně

Eva Košťálová, Petr Chrastina, Sylvie Šťastná

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Název</b>                  | <b>Biotinidáza kvantitativně</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | -  |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní  |
| <b>Princip stanovení</b>      | inkubace se substrátem n-biotynyl-PABA, naftolové činidlo, fotometrické stanovení, 546 nm  |
| <b>Materiál</b>               | sérum  |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | nelze vyšetřovat v plasmě, interference při léčbě sulfonamidy<br>riziko falešně pozitivního výsledku po transfuzi krve, erymasy a plasmy labilní enzym, možnost poklesu aktivity v čase při nevhodném skladování nebo při vyšších teplotách (např. v létě)<br>nižší aktivita u nezralých novorozenců |
| <b>Jednotky</b>               | nmol/min/ml  |
| <b>Referenční meze</b>        | zdraví homozygoti > 5,4<br>heterozygoti 5,4 - 2,2<br>nemocní homozygoti < 2,2  |

**Biotin** je vitamín ve vodě rozpustný, který je vázaný na bílkoviny. Je nezbytný jako koenzym čtyř významných karboxyláz intermediárního metabolismu sacharidů, mastných kyselin a aminokyselin.

**Biotinidáza** je enzym, který uvolňuje biotin z biotinylovaných peptidů exogenního nebo endogenního původu. Tím se biotin stává dostupný pro aktivaci výše uvedených karboxyláz.

**Deficit biotinidázy** způsobuje depleci biotinu. Endogenní biotin nemůže být recyklován, organismus nemůže využít biotin vázaný na bílkoviny ze stravy.

Může se projevat jako ataky ketoacidózy se zvracením, torpidní dermatitida, jako progredující neurologické a oční postižení (psychomotorická retardace, křeče, hypotonie, ataxie, atrofie optiku, keratokonjunktivis) nebo recidivující infekty.

Symptomy deficitu biotinidázy jsou variabilní a nespecifické, mohou se objevit od novorozeneckého věku po dospělost, proto je vysoké riziko pozdní diagnostiky.

V některých zemích se provádí novorozenecký screening, který umožní časné stanovení diagnózy a zlepšení prognózy pacientů.

Kvantitativní metoda slouží k ověření snížené aktivity biotinidázy, zjištěné screeningovým vyšetřením.

## 7-Dehydrocholesterol a cholesterol

Sylvie Šťastná, Zdeněk Čánský

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Název</b>                  | <b>7-Dehydrocholesterol (7-DHC) a cholesterol</b>  |
| <b>Synonyma</b>               | -  |
| <b>Typ metody</b>             | semikvantitativní  |
| <b>Princip stanovení</b>      | GC/MS, alkalická hydrolýza, extrakce do hexanu, derivatizace                                   |
| <b>Materiál</b>               | sérum, plazma  |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | -  |
| <b>Jednotky</b>               | mg/g kreatininu  |
| <b>Referenční meze</b>        | mírná forma: poměr 7-DHC/ cholesterol < 0,500<br>těžká forma: poměr 7-DHC/ cholesterol > 1,000 |

**7-dehydrocholesterol (7-DHC, cholesta-5,7-dien-3 $\beta$ -ol)** je poslední meziprodukt v biosyntéze cholesterolu. Účinkem enzymu 7-dehydrocholesterolreduktázy se přeměňuje na cholesterol, látku nezbytnou pro řadu metabolických funkcí.

**Deficit 7-dehydrocholesterolreduktázy** vede k hromadění 7-DHC a jeho zvýšená koncentrace je spolu se sníženou koncentrací cholesterolu charakteristická pro **Smith-Lemli-Opitzův syndrom (SLOS)**. SLOS je nejčastěji diagnostikovanou poruchou syntézy cholesterolu s incidencí 1:20 000-40 000.

Klinicky se rozlišují mírné a těžké formy – od pouhé syndaktylie 2. a 3. prstu na nohou, přes výraznější dysmorfii s mikrocefalií, malformacemi genitálu, růstovou retardací, neprospíváním, psychomotorickou retardací, až po závažnou dysmorfii s holoprosencephalií a intrauterinním úmrtím.

Při **vyšetření** se stanovuje koncentrace 7-DHC a cholesterolu a vypočítává se poměr 7-DHC/ cholesterol.

Vyšetření je **indikováno** při podezření na SLOS syndrom a u nejasných dysmorfii a při monitorování léčby u pacientů se SLOS.

Diagnózu SLOS syndromu je vhodné potvrdit na molekulárně genetické úrovni.

## Disulfidy

Sylvie Šťastná, Petr Chrástina, Eva Košťálová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Název</b>                  | <b>Disulfidy</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | Brandův test, nitroprussidový test   |
| <b>Typ metody</b>             | semikvantitativní  |
| <b>Princip stanovení</b>      | orientační test s kyanidem sodným a nitroprussidem sodným  |
| <b>Materiál</b>               | moč  |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | cystin je relativně nerozpustný a po vymočení krystalizuje na dně nádoby<br>před odlitím vzorku moči je nutné celý objem moči v nádobě důkladně promíchat, aby v odlitém vzorku i ve zbylé moči v nádobě byla stejná koncentrace cystinu |
| <b>Jednotky</b>               | arb. j.  |
| <b>Referenční meze:</b>       | negativní  |

Pozitivní nález znamená přítomnost sloučenin obsahujících síru, zvláště disulfidů (viz tabulka).

| <b>Sloučenina</b>             | <b>Onemocnění/Zdroj</b>  |
|-------------------------------|--|
| Cystin                        | Cystinurie<br>Hyperargininémie<br>Generalizovaná hyperaminoacidurie  |
| Homocystin                    | Homocystinurie<br>Kobalaminové deficiency<br>Deficit vitamínu B <sub>12</sub><br>Deficit methylenetetrahydrofolátreduktázy<br>Cystathioninurie |
| Glutathion                    | Poruchy $\gamma$ -glutamylvého cyklu   |
| Ketolátky                     | Dehydratace  |
| Léky obsahující sirné skupiny | N-acetylcystein, penicilamin, captopril,<br>2-merkptoethansulfonát, ampicilin aj.  |

Test by měl být prováděn pouze v laboratoři, neboť kyanid sodný je velmi toxický. Metoda se používá zejména jako screeningové vyšetření cystinurie. Pozitivní nález je nutno ověřit kvantitativním stanovením aminokyselin v moči. Vyšetření se provádí u každého poprvé vyšetřovaného pacienta.

## Fenylalanin a tyrosin

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Košťálová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Fenylalanin (Phe) a tyrosin (Tyr)</b>  |
| <b>Synonyma</b>               | -   |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní   |
| <b>Princip stanovení</b>      | automatický analyzátor aminokyselin, ionexová chromatografie, ninhydrinová detekce, zkrácený program            |
| <b>Materiál</b>               | nesrážlivá krev   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | -   |
| <b>Jednotky</b>               | μmol/l  |
| <b>Referenční meze</b>        | pro diagnostiku:<br>Phe < 120 μmol/l; Tyr < 180 μmol/l<br>pro monitorování kompenzace: interní normy podle věku |

Vyšetření slouží hlavně k monitorování koncentrací Phe a Tyr u pacientů s hyperfenylalaninemií/ /fenylketonurií (HPA/PKU) ke **zhodnocení dietní kompenzace**.

Z hlediska **diagnostického** se využívá pro:

1. stanovení koncentrace Phe a Tyr u novorozenců zachycených **novorozeneckým screeningem** HPA/PKU
2. stanovení koncentrace Phe a Tyr u žen zachycených **screeningem HPA gravidních**
3. stanovení koncentrace Phe a Tyr během **zátěžového testu s Phe**, který je jedním z vyšetření používaných při diagnostice heterozygotie pro HPA/PKU z deficitu fenylalaninhydroxylázy

# Galaktitol

Eva Košťálová, Petr Chrastina, Sylvie Šťastná  
Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |                   |
|-------------------------------|---|-------------------|
| <b>Název</b>                  | <b>Galaktitol</b>   |                   |
| <b>Synonyma</b>               | -   |                   |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní   |                   |
| <b>Princip stanovení</b>      | plynová chromatografie, trimethylsilyl-deriváty, vnitřní standard manoheptulóza, extrakce do hexanu |                   |
| <b>Materiál</b>               | moč   |                   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | riziko falešně negativního nálezu při nedostatečné expozici galaktózou                              |                   |
| <b>Jednotky</b>               | mmol/mol kreatininu   |                   |
| <b>Referenční meze</b>        | <b>Věk</b>  | <b>Vylučování</b> |
|                               | 0 – 1 měsíc   | < 90              |
|                               | 1 měsíc – 1 rok   | < 80              |
|                               | 1 – 2 roky  | < 22              |
|                               | 2 – 15 let  | < 20              |
|                               | > 15 let  | < 10              |

**Galaktitol** je produktem přeměny galaktózy účinkem aldóza reduktázy.

Vylučování galaktitolu močí závisí na příjmu galaktózy ve stravě a na věku.

Za normálních okolností je jeho vylučování minimální (viz referenční meze).

U enzymopatií v metabolismu galaktózy (u deficitu GALT, GALE a GALK) se hromadí galaktóza a galaktóza-1-fosfát a vznikají alternativní metabolity – galaktitol a galaktonát, které se ve zvýšené míře vylučují močí, a to i při bezgalaktózové stravě.

**Galaktonát** vzniká účinkem galaktóza dehydrogenázy, pro diagnostiku poruch metabolismu galaktózy se nevyužívá.

Přítomnost galaktózy v moči způsobuje pozitivitu **testu na redukující látky**.

**Galaktosémie z deficitu GALT (klasická galaktosémie)** se u novorozence po expozici laktózou projevuje jako stav připomínající sepsi s hepatopatií a hypoglykemií s rozvojem akutního jaterního selhání, v pozdějším věku katarakta, hepatopatie, neprospívání, mentální retardace.

Vylučování galaktitolu je nejvyšší u novorozenců s deficitem GALT při dostatečně vysokém příjmu galaktózy, kdy může dosahovat až řádově tisícových hodnot mmol/mol kreatininu.

U **deficitu GALE a GALK** bez diety je vylučování galaktitolu močí obvykle o řád nižší (stovky mmol/mol kreatininu).

**Po zavedení diety** s omezením příjmu galaktózy vylučování galaktitolu rychle klesá, ne však do normálních hodnot, což je způsobeno endogenní produkcí galaktózy.

Zvýšené vylučování galaktitolu močí nacházíme také při **sekundárních poruchách metabolismu galaktózy** při hepatopatiích různé etiologie, hodnoty mohou dosahovat až stovek mmol/mol kreatininu.

Diagnózu je nutné potvrdit stanovením aktivity příslušného enzymu v erytrocytech.

Heterozygoti mají obvykle intermediární hodnoty aktivit enzymů v erytrocytech.

Dostupná je molekulárně genetická diagnostika.

Galaktitol se rovněž využívá pro **monitorování dietní kompenzace** všech typů galaktosémie.

V řadě zemí se provádí **novorozenecký screening galaktosémie**. Screening je založen na stanovení koncentrace galaktózy a/nebo aktivity GALT v suchých krevních kapkách (Guthrieho karty).

**Zkratky:**

*GALE* galaktóza-4-epimeráza

*GALK* galaktokináza

*GALT* galaktóza-1-fosfát uridylyltransferáza

## Galaktóza a galaktóza-1-fosfát

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Zdeněk Čánský

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Galaktóza a galaktóza-1-fosfát</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | -   |
| <b>Typ metody</b>             | semikvantitativní   |
| <b>Princip stanovení</b>      | tenkovrstevná chromatografie, extrakce isopropanolem, detekce kyselinou p-aminobenzoovou (PABA)   |
| <b>Materiál</b>               | krevní papírek  |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | riziko falešně negativního výsledku při nedostatečné expozici laktózou;<br>falešně negativní nálezy při vyšetření do 3 měsíců od krevní transfuze |
| <b>Jednotky</b>               | mmol/l  |
| <b>Referenční meze</b>        | galaktóza < 0,5 mmol/l<br>galaktóza-1-fosfát < 0,5 mmol/l   |

**Galaktóza** spolu s glukózou tvoří disacharid laktózu, která je hlavním sacharidem mléka. Bezmléčná strava však neznamena bezgalaktózovou dietu, neboť galaktóza je v určitém množství přítomna v podstatě ve všech potravinách, a v těle také probíhá syntéza galaktózy. Po požití laktózy je v tenkém střevě laktóza hydrolyzována účinkem **laktázy** na galaktózu a glukózu. Galaktóza je poté aktivována na **galaktóza-1-fosfát**, reakci katalyzuje **galaktokináza** (GALK).

U dvou ze tří enzymopatií v metabolismu galaktózy (u **deficitu GALT** a **GALE**) se hromadí galaktóza a galaktóza-1-fosfát, u **deficitu GALK** se hromadí pouze galaktóza, která se nefosforyluje na galaktóza-1-fosfát.

**Galaktosémie z deficitu GALT (klasická galaktosémie)** se u novorozence po expozici laktózou projevuje jako stav připomínající sepsi s hepatopatií a hypoglykemií s rozvojem akutního jaterního selhání, v pozdějším věku katarakta, hepatopatie, neprospívání, mentální retardace.

Diagnózu je nutné potvrdit stanovením aktivity příslušného enzymu v erytrocytech.

Heterozygoti mají obvykle intermediární hodnoty aktivit enzymů v erytrocytech.

Dostupná je molekulárně genetická diagnostika.

Hladina galaktózy v krvi závisí na příjmu galaktózy ve stravě a na věku.

Za normálních okolností je její koncentrace velmi nízká (viz referenční meze).

Hladiny galaktózy a galaktóza-1-fosfátu jsou nejvyšší u novorozenců s deficitem GALT při dostatečně vysokém příjmu galaktózy.

Hraniční až mírně zvýšené koncentrace vídáme u hepatopatií různé etiologie.

Přítomnost galaktózy v moči způsobuje pozitivitu **testu na redukující látky**.

**Po zavedení diety** s omezením příjmu galaktózy hladina galaktózy v krvi rychle klesá. Dosud není známo, jaké množství galaktózy ve výživě dítěte s galaktosémií je nutné nebo naopak škodlivé pro jeho vývoj.

Tato metoda není určena pro **monitorování dietní kompenzace** žádného typu galaktosémie.

V řadě zemí se provádí **novorozenecký screening galaktosémie**. Screening je založen na stanovení koncentrace galaktózy a/nebo aktivity GALT v suchých krevních kapkách. Následně se vždy provádí stanovení koncentrace galaktózy v krvi, které slouží pro diferenciaci pozitivních pacientů pro rozhodnutí, zda stačí zaslání kontrolního vzorku nebo jsou nutná další vyšetření nebo zda je nutná hospitalizace s okamžitým zahájením bezgalaktózové diety. K tomu je však nutné používat přesnější kvantitativní metodu.

**Zkratky:**

*GALE* galaktóza-4-epimeráza

*GALK* galaktokináza

*GALT* galaktóza-1-fosfát uridyltransferáza

## Globotriaosylceramid

*Petr Chrastina, Jana Ledvinová, Milan Elleder*

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Globotriaosylceramid (Gb<sub>3</sub>Cer)</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | Gb <sub>3</sub>   |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní   |
| <b>Princip stanovení</b>      | přímá analýza bez předchozí extrakce, deproteinace, nástřik do tandemového hmotnostního spektrometru s trojitým kvadrupolem s ionizací elektrosprejem (FIA-ESI-MS/MS), stanovuje se 11 izoforem Gb <sub>3</sub> Cer, které se vyskytují v moči nebo plasmě, vnitřní standard Gb <sub>3</sub> Cer s mastnou kyselinou se 17 uhlíky (C17:0-Gb <sub>3</sub> Cer), který se ve vzorcích přirozeně nevyskytuje |
| <b>Materiál</b>               | plazma, celý sběr moči/24 hod   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | -   |
| <b>Jednotky</b>               | plazma mg/l<br>moč mg/mol kreatininu  |
| <b>Referenční meze</b>        | podle interních norem   |

**Gb<sub>3</sub>Cer** se hromadí u Fabryho choroby při deficitu lysosomální  $\alpha$ -galaktosidázy A, která katalyzuje uvolňování galaktózy z Gb<sub>3</sub>Cer a příbuzných glykosfingolipidů. Důsledkem je Gb<sub>3</sub>Cer vznik depozit Gb<sub>3</sub>Cer ve tkáních.

Vyšetření se provádí při podezření na **Fabryho chorobu** (bolesti nebo parestesie v končetinách, angiokeratomy, hypohidróza, korneální zákaly, postižení srdce, ledvin). Nález je specifický pro Fabryho chorobu.

Při současném zvýšení exkrece sulfatidů se může jednat o **deficit saposinu B** (dříve SAP1) nebo **deficit prosaposinu** (prekursor saposinů A,B,C,D) – viz Sulfatidy.

# Glykogen v erytrocytech

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Název</b>                  | <b>Glykogen v erytrocytech</b>   |
| <b>Synonyma</b>               |  |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní  |
| <b>Princip stanovení</b>      | enzymatické spektrofotometrické stanovení, amyloglukosidáza, hexokináza/glukóza-6-fosfát dehydrogenáza, 340 nm |
| <b>Materiál</b>               | nesrážlivá krev, vyšetření se provádí z izolovaných erytrocytů   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | -  |
| <b>Jednotky</b>               | mg/l   |
| <b>Referenční meze</b>        | norma < 100, hraniční 100-150, patologie > 150   |

**Glykogen** je makromolekula složená z glukózových jednotek.

Slouží jako zásobní zdroj energie při hladovění (v játrech) a pro svalovou kontrakci (ve svalech).

Hromadí se v tkáních u glykogenóz (GSD).

Vyšetření se provádí při podezření na **jaterní GSD, zejména typu III.**

**Zvýšenou až výrazně zvýšenou** koncentrace nacházíme u GSD III.

**Mírně zvýšená** koncentrace může být u GSD VI a jaterní formy GSD IX.

**Fysiologickou** koncentraci nacházíme u ostatních GSD.

Typ GSD musí být stanoven enzymatickým nebo molekulárně genetickým vyšetřením.

Po transfuzi krve nebo erymasy je riziko falešně negativního nálezu.

## Guanidinoacetát, kreatin a kreatinin

*Eva Košťálová, Josef Bárta, Sylvie Šťastná*

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Guanidinoacetát, kreatin a kreatinin</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | -   |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní   |
| <b>Princip stanovení</b>      | přímá analýza bez předchozí extrakce<br>nástřík do tandemového hmotnostního spektrometru s trojitým kvadrupolem s ionizací elektrosprejem (FIA-ESI-MS/MS)<br>vnitřní standard deuteriem značené standardy guanidinoacetátu, kreatinu a kreatininu |
| <b>Materiál</b>               | moč   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | -   |
| <b>Jednotky</b>               | mg/mol kreatininu   |
| <b>Referenční meze</b>        | podle interních norem   |

**Kreatin** vzniká z argininu účinkem argininyglycinaminotransferázy (AGAT) za vzniku **guanidinoacetátu** a S-adenosyl-L-methionin-N-guanidinoacetátmetyltransferázy (GAMT). Kreatin je transportován do buněk kreatinovým transportérem (CRTR).

Kreatin je fosforylován na kreatinfosfát.

Většina celkové tělesné zásoby kreatinu a kreatinfosfátu je ve svalech.

Kreatin a kreatinfosfát přecházejí neenzymaticky na **kreatinin**.

Vyšetření stanovuje během jediné analýzy všechny 3 vyšetřované metabolity – guanidinoacetát, kreatin i kreatinin.

**Vyšetření je indikováno** při klinické nebo laboratorní symptomatologii vedoucí k podezření na poruchu biosyntézy nebo transportu kreatinu.

**Klinické symptomy** - mentální/psychomotorická retardace/regres, porucha vývoje řeči, hypotonie, extrapyramidové příznaky, epilepsie, autistické příznaky

**Laboratorní symptomy** - při snížené koncentraci kreatininu v séru nebo při nízké koncentraci kreatinu při MRS vyšetření mozku.

U **deficitu GAMT** nacházíme zvýšené vylučování guanidinoacetátu močí a snížené vylučování kreatinu a kreatininu močí.

U **deficitu AGAT** nacházíme nízké vylučování guanidinoacetátu, kreatinu a kreatininu močí. Tento defekt je vzácnější. Biochemicky se projevuje sníženou koncentrací GA v moči, plazmě a mozkomíšním moku, dále sníženou koncentrací CT v mozku a plazmě.

U **deficitu CRTR** nacházíme normální vylučování guanidinoacetátu a zvýšené vylučování kreatinu močí. Důležitým ukazatelem je zvýšený poměr CT/CTN v moči.

Deficity AGAT a GAMT jsou léčitelné choroby. Jsou léčeny suplementací kreatinmonohydrátem, který zmírňuje klinické příznaky a zlepšuje celkový motorický a intelektuální vývoj.

## Homocitrulin

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                              |  |
|------------------------------|--|
| <b>Název</b>                 | <b>Homocitrulin</b>  |
| <b>Synonyma</b>              | -  |
| <b>Typ metody</b>            | kvantitativní  |
| <b>Princip stanovení</b>     | automatický analyzátor aminokyselin, ionexová chromatografie, ninhydrinová detekce, zkrácený program |
| <b>Materiál</b>              | moč  |
| <b>Prenalytické poznámky</b> | -  |
| <b>Jednotky</b>              | mmol/mol kreat.  |
| <b>Referenční meze</b>       | 0-5  |

**Homocitrulin** vzniká ve zvýšeném množství při poruše vstupu ornithinu do mitochondrie. Deficit ornithinu v mitochondrii vede k alternativnímu využití karbamoylfosfátu se vznikem homocitrulinu z lysinu.

Většina klinických projevů poruchy souvisí s toxicitou amoniaku, není postižení zraku.

Vyšetření se provádí při **diferenciální diagnostice hyperamonémie**, zvláště při podezření na **HHH syndrom** (hyperammonémie, hyperornithinémie a homocitrulinurie).

Významné **zvýšené vylučování homocitrulinu močí** nacházíme u HHH syndromu.

Mírně zvýšené vylučování je možné u citrulinémie, argininojantarové acidurie a argininémie.

Hraniční až mírně zvýšené vylučování může být alimentárního původu, zvl. u kojenců.

Trvale zvýšené vylučování homocitrulinu močí je patologické.

Diagnóza HHH syndromu musí být potvrzena na úrovni DNA a/nebo studií ve fibroblastech.

# Homocystein celkový

Josef Bártl, Viktor Kožich

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |   |
|-------------------------------|--|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Homocystein celkový</b>   |   |
| <b>Synonyma</b>               | -  |   |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní  |   |
| <b>Princip stanovení</b>      | redukce TCEP, derivatizace SBD-F, HPLC, fluorimetrická detekce   |   |
| <b>Materiál</b>               | plazma   |   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | nesrážlivou krev odebranou do EDTA (zkumavka částečně ponořená do vody s ledem)<br>dopřít do 1 hodiny do laboratoře k separaci plasmu<br>při delším transportu krev po odběru do 1 hodiny centrifugovat, plasmu odsát ihned po centrifugaci a zamrazit, k vyšetření poslat zamraženou plasmu |   |
| <b>Jednotky</b>               | μmol/l   |   |
| <b>Referenční meze</b>        | <b>věk</b>   | <b>koncentrace</b>                                    |
|                               | < 15 let   | 0-12  |
|                               | > 15 let   | 0-15<br>též v závislosti na věku, pohlaví a menopauze |

## Indikace k vyšetření

1. trvalé monitorování pacientů s homocystinurií všech typů
2. monitorování pacientů s homocystinurií všech typů v rámci kolemoperační péče
3. marfanoidní habitus, včetně subluxe či luxace čočky (k dif.dg. Marfanova syndromu a homocystinurie)
4. tromboembolické příhody nejasné etiologie (k dif.dg. střední či těžké hyperhomocystinémie jako příčiny trombózy)
5. neurologické poruchy s postižením bílé hmoty (k dif.dg. remetylačních forem homocystinurie)
6. megaloblastová anemie nejasné etiologie (k dif.dg. remetylačních forem homocystinurie)
7. metilmalonová acidurie
8. psychomotorická retardace a encefalopatie nejasné etiologie
9. veganská strava, deficit vitamínu B<sub>12</sub>
10. indikace k vyšetřování mírně zvýšených koncentrací celkového homocysteinu u kardiovaskulárních onemocnění je omezena a podrobněji uvedena v publikaci René M. Malinow; Andrew G. Bostom; Ronald M. Krauss: Homocyst(e)ine, Diet, and Cardiovascular Diseases: A Statement for Healthcare Professionals From the Nutrition Committee, American Heart Association, Circulation 1999; 99:178-182, viz též <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/full/99/1/178>

## Interpretace výsledků vyšetření

1. **těžká hyperhomocysteinémie (nad 100 μmol/l)**  
klasická homocystinurie z homozygotního deficitu cystathionin-β-syntázy (CBS)

homozygotní deficit enzymů remethylační cesty - methylenetrahydrofolátreduktáza (MTHFR), methioninsyntáza, poruchy syntézy methylcobalaminu  
sekundárně při deficitu vitaminů (folátů, vitaminu B<sub>12</sub>), při renální insuficienci

**2. střední hyperhomocysteinémie (nad 30  $\mu\text{mol/l}$ )**

mírnější varianty homozygotních genetických deficitů zmíněných výše  
získané příčiny: renální insuficience, deficit folátu, B6, B12, podávání methotrexátu, fibrátů a jiné

**3. mírná hyperhomocysteinémie (od hranice referenčního rozmezí do 30  $\mu\text{mol/l}$ )**

běžné polymorfismy jako např. MTHFR A222V, deficit vitaminů, lékové interference

## 3-Hydroxybutyrát

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Název</b>                  | <b>3-Hydroxybutyrát</b>  |
| <b>Synonyma</b>               | -  |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní  |
| <b>Princip stanovení</b>      | enzymatické spektrofotometrické stanovení, 340 nm, 3-hydroxybutyrátdehydrogenáza, NAD  |
| <b>Materiál</b>               | krev   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | odběr krve bez ischemizace končetiny do dvojnásobného objemu studené 8% kyseliny chloristé, důkladně protřepat, transport zkumavky v malém množství vody s ledem, centrifugovat, odsát deproteinát<br>společný odběr pro stanovení laktátu, pyruvátu a 3-hydroxybutyrátu |
| <b>Jednotky</b>               | mmol/l   |
| <b>Referenční meze</b>        | < 1,5 (na lačno)<br>< 0,2 (po jídle)   |

**Zdrojem ketolátek** jsou mastné kyseliny a aminokyseliny isoleucin a leucin.

Mezi **ketolátky** patří **acetoacetát** a **3-hydroxybutyrát**, rovnováhu mezi nimi udržuje 3-hydroxybutyrátdehydrogenáza, **aceton** vzniká neenzymaticky z acetoacetátu.

Ketolátky vznikají v jaterních mitochondriích, krví se dostávají do ostatních tkání.

Ketolátky jsou během hladovění významným zdrojem energie pro řadu tkání, pro srdeční a kosterní svaly a zejména pro mozek, kde neprobíhá oxidace mastných kyselin.

**Indikací** k vyšetření je závažná nebo opakovaná ketonurie/ketóza a ketoacidóza.

**Fyziologická ketóza** je nejčastěji důsledkem hladovění (i fyziologického hladovění přes noc) a mizí po najezení.

V batolecím věku, dětství i adolescenci je ketóza fyziologickým projevem katabolismu, není-li spojena s acidózou, hyperlaktacidémií nebo hypoglykemií. Je obvykle normálním odrazem nutričního stavu (hladovění, katabolismus, zvracení, dieta obohacená triacylglyceroly se středně dlouhým řetězcem nebo jiný druh ketogenní diety).

**Ketonurie u novorozence** je vždy patologická a je důležitou známkou metabolické poruchy.

**Patologickou ketózu** (závažnou nebo opakovanou nebo vede-li k metabolické acidóze) nacházíme u primárních poruch ketolýzy.

**Nepřítomnost ketózy event. jen mírná ketóza po prolongovaném hladovění** je známkou primární poruchy ketogeneze nebo poruchy oxidace mastných kyselin.

Porucha ketolýzy, ketogeneze nebo oxidace mastných kyselin musí být potvrzena na enzymatické a/nebo molekulárně genetické úrovni.

## Karnitin v séru

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová  
Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF Praha

|  |   |                    |
|--|---|--------------------|
| <b>Název</b>                                 | <b>Karnitin v séru</b>  |                    |
| <b>Synonyma</b>                              | -   |                    |
| <b>Typ metody</b>                            | kvantitativní   |                    |
| <b>Princip stanovení</b>                     | radiometrické enzymatické stanovení, <sup>14</sup> C-acetylkarnitin, karnitinacetyltransferáza<br>stanovuje se volný, celkový a acylovaný karnitin a poměr acylovaný/volný karnitin |                    |
| <b>Materiál</b>                              | sérum   |                    |
| <b>Preanalytické poznámky</b>                | -   |                    |
| <b>Jednotky</b>                              | μmol/l  |                    |
| <b>Referenční meze</b>                       | <b>Volný karnitin (FC) v séru</b>   |                    |
|  | <b>Věk</b>  | <b>Koncentrace</b> |
|  | 0 – 1 den   | 11,5 – 36,0        |
|  | 1 den – 1 týden   | 10,1 – 21,0        |
|  | 1 – 4 týdny   | 12,3 – 46,2        |
|  | 4 týdny – 1 rok   | 26,9 – 49,0        |
|  | 1 – 6 let   | 24,3 – 62,5        |
|  | 6 – 10 let  | 21,7 – 66,4        |
|  | 10 – 17 let   | 21,7 – 64,5        |
|  | > 17 let  | 25,4 – 54,1        |
|  | <b>Celkový karnitin (TC) v séru</b>   |                    |
|  | <b>Věk</b>  | <b>Koncentrace</b> |
|  | 0 – 1 den   | 23,3 – 67,9        |
|  | 1 den – 1 týden   | 17,4 – 40,6        |
|  | 1 – 4 týdny   | 18,5 – 58,7        |
|  | 4 týdny – 1 rok   | 38,1 – 68,0        |
|  | 1 – 6 let   | 34,6 – 83,6        |
|  | 6 – 10 let  | 27,8 – 82,9        |
|  | 10 – 17 let   | 33,7 – 77,0        |
|  | > 17 let  | 33,7 – 77,5        |
|  | <b>Acylovaný karnitin (AC) v séru</b>   |                    |
|  | <b>Věk</b>  | <b>Koncentrace</b> |
|  | 0 – 1 den   | 7,0 – 36,6         |
|  | 1 den – 1 týden   | 2,9 – 23,8         |
| 1 – 4 týdny                                  | 4,1 – 14,5  |                    |
| 4 týdny – 1 rok                              | 7,4 – 19,0  |                    |
| 1 – 6 let                                    | 4,0 – 28,3  |                    |
| 6 – 10 let                                   | 3,1 – 32,1  |                    |
| 10 – 17 let                                  | 3,7 – 29,2  |                    |
| > 17 let                                     | 5,4 - 30,1  |                    |
| <b>Poměr acylovaný/volný karnitin v séru</b> |   |                    |
| <b>Věk</b>                                   | <b>Hodnota</b>  |                    |
| < 1 týden                                    | 0,1 – 1,44  |                    |
| > 1 týden                                    | 0,1 – 0,9   |                    |

**Oxidace mastných kyselin** hraje zásadní roli v tvorbě energie, zvláště při delším hladovění. Zahrnuje karnitinový cyklus, cyklus  $\beta$ -oxidace, přenos elektronů a syntézu ketoláttek.

**Karnitin** hraje klíčovou roli v počáteční fázi oxidace mastných kyselin, v **karnitinovém cyklu**.

Volné **mastné kyseliny s dlouhým řetězcem** jsou v cytosolu aktivovány na své estery-CoA (acyly-CoA mastných kyselin), které jsou transportovány do mitochondrie.

Tento proces vyžaduje vazbu na karnitin na vnější straně a zpětné uvolnění z vazby na karnitin na vnitřní straně vnitřní mitochondriální membrány.

**Mastné kyseliny se středně dlouhým a krátkým řetězcem** vstupují do mitochondrie přímo, jsou aktivovány na své acyl-CoA deriváty v mitochondriální matrix.

Acyl-CoA mastných kyselin, které se hromadí v mitochondrii, mohou být přeměněny na estery karnitinu (**acylkarnitiny**), odstraněny z mitochondrie a vylučovány močí. Tento **detoxikační mechanismus** způsobuje sekundární deficit karnitinu u většiny poruch, které postihují metabolismus mitochondriálních CoA-aktivovaných karboxylových kyselin, včetně organických acidurií, poruch oxidace mastných kyselin a poruch respiračního řetězce.

**Indikací k vyšetření karnitinu je:**

**1. susp. porucha transportu karnitinu nebo oxidace mastných kyselin**

ataky hypoglykémie při hladovění nebo zvýšené zátěži organismu, s hepatomegalií a hepatopatií, hypertrofická nebo dilatační kardiomyopatie, myopatický syndrom, svalová slabost, ataky rhabdomyolýzy při fyzické zátěži, SIDS, Reye-like ataky, maternální HELLP syndrom (hypertension, elevated liver enzymes, low platelets) a AFLP syndrom (acute fatty liver pregnancy syndrome)

**2. susp. sekundární karnitinový deficit**

u organických acidurií, u pacientů na nízkobílkovinné dietě, u pacientů s epilepsií na terapii valproátem, u pacientů na dlouhodobé parenterální výživě, při poruchách příjmu potravy, při ketose a ketoacidóze

**3. monitorování u pacientů na suplementaci karnitinem**

**Interpretace výsledků:**

**1. výrazně snížená koncentrace volného a celkového karnitinu**

u primárního karnitinového deficitu

**2. zvýšená koncentrace volného a celkového karnitinu se sníženým podílem acylovaného karnitinu**

u deficitu karnitinpalmitoyltransferázy I (CPT I)

**3. sekundární karnitinový deficit s normálním nebo zvýšeným podílem acylovaných karnitinů**

u všech ostatních poruch transportu karnitinu a oxidace mastných kyselin, u organických acidurií, u poruch respiračního řetězce, u pacientů na nízkobílkovinné dietě, u pacientů s epilepsií na terapii valproátem, u pacientů na dlouhodobé parenterální léčbě, při poruchách příjmu potravy, při ketóze a ketoacidóze

Nálezy mohou být intermitentní.

Vyšetření je vhodné opakovat v atace dekompenzace.

## Karnitin v moči

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Karnitin v moči</b>  |
| <b>Synonyma</b>               |   |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní   |
| <b>Princip stanovení</b>      | radiometrické enzymatické stanovení, <sup>14</sup> C-acetylkarnitin, karnitinacetyltransferáza<br>stanovuje se volný, celkový a acylovaný karnitin a poměr acylovaný/volný karnitin |
| <b>Materiál</b>               | moč   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | -   |
| <b>Jednotky</b>               | mmol/mol kreatininu   |
| <b>Referenční meze</b>        | <b>Karnitin volný, celkový a acylovaný v moči</b>   |
|                               | 100 – 1000  |
|                               | <b>Poměr acylovaný karnitin/volný karnitin v moči</b>   |
|                               | < 3,5   |

**Volný karnitin** je téměř kompletně resorbován v renálních tubulech.

**Acylkarnitiny** nejsou resorbovány a jsou vylučovány močí.

Analýza karnitinu v moči je **indikována**, jsou-li patologické hodnoty v séru nebo při monitorování léčby.

### Interpretace

**Zvýšené vylučování acylkarnitinů v moči** se objevuje :

u poruch transportu karnitinu, poruch oxidace mastných kyselin a některých organických acidurií

u pacientů na terapii valproátem, při ketonurii

Zvýšené vylučování acylkarnitinů v moči spolu s normální hladinou karnitinu v séru svědčí pro dobrou detoxikační kapacitu.

## Ketokyseliny

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Ketokyseliny</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | $\alpha$ -ketokyseliny, 2,4-dinitrofenylhydrazinový (DNPH) test               |
| <b>Typ metody</b>             | semikvantitativní   |
| <b>Princip stanovení</b>      | orientační test s 2,4-dinitrofenylhydrazinem (DNPH)                           |
| <b>Materiál</b>               | moč   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | DNPH reaguje také s fyziologickými ketolátkami, ty nutné se odstraní zahřátím |
| <b>Jednotky</b>               | arb. j.   |
| <b>Referenční meze</b>        | negativní   |

**Test s dinitrofenylhydrazinem (DNPH)** zjišťuje orientačně přítomnost  **$\alpha$ -ketokyselin**, je nespecifický.

**Indikací** k vyšetření je:

1. **susp. leucinóza** (maple sirup urine disease, MSUD)  
těžká forma: u novorozence po krátkém bezpříznakovém období progredující encefalopatie (porucha vědomí, problémy s krmením, tonusové změny, křeče, edém mozku),  
existují i mírnější a intermitentní formy v pozdějším věku s atakami dekompenzace, je typický zápach moči
2. **orientační monitorování kompenzace pacientů s leucinózou**,
3. **susp. deficit E3 podjednotky** - výrazný hypotonický syndrom a ataky laktátové acidózy, psychomotorická retardace, mozečkové příznaky

Test se také provádí se u každého poprvé vyšetřovaného pacienta a u všech pacientů v atace dekompenzace.

**Pozitivní nález** je u leucinózy a deficitu E3 podjednotky.

**Falešně pozitivní nález** bývá při ketonurii, glykosurii a ve výrazně koncentrované moči.

Přítomnost ketolátek lze odstranit zahřátím.

**Falešně negativní nález** může být v málo koncentrované moči nebo mimo ataku obtíží u intermitentní formy leucinózy.

Pozitivní nález je doplněn kvantitativním vyšetřením (aminokyseliny v séru/plasmě, laktát v krvi a organické kyseliny v moči) a poté cíleným enzymatickým a/nebo molekulárně genetickým vyšetřením.

### Zkřížená pozitivita ketolátek a $\alpha$ -ketokyselin

| DNPH | Ketolátky<br>(Phan) | Sloučenina            | Příčina  |
|------|---------------------|-----------------------|--|
| +    | -                   | Fenylpyruvát          | Klasická PKU   |
| +    | -                   | 2-oxoisovalerát       | Leucinóza  |
| +    | -                   | 2-oxoisokaproát       |  |
| +    | -                   | 2-oxo-3-methylvalerát |  |
| (+)  | -                   | Imidazolpyruvát       | Histidinémie   |
| +    | +                   | Aceton                | Deficit $\beta$ -ketothiolázy                        |
| -    | +                   | 2-methylacetoacetát   | Deficit $\beta$ -ketothiolázy<br>Propionová acidémie |
| -    | +                   | Butanon               | Methylmalonová acidémie                              |
| -    | +                   | Acetoacetát           | Deficit SCOT   |
| +    | -                   | p-hydroxyfenylpyruvát | Tyrosinémie typu I a II<br>Jaterní onemocnění        |
| +    | -                   | 2-oxobutyrát          | Malabsorpce methioninu                               |
| +    | +                   | Pyruvát               | Laktátová acidóza                                    |

## Kreatinin v séru

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová  
Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |                    |
|-------------------------------|--|--------------------|
| <b>Název</b>                  | <b>Kreatinin v séru</b>  |                    |
| <b>Synonyma</b>               | -  |                    |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní  |                    |
| <b>Princip stanovení</b>      | Jaffého reakce, kinetické stanovení  |                    |
| <b>Materiál</b>               | sérum  |                    |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | stanovení není zcela specifické a může být ovlivněno redukujícími látkami<br>kinetické měření na počátku reakce omezuje možnost interference jiných látek<br>falešně snížené hodnoty v ikterickém séru |                    |
| <b>Jednotky</b>               | μmol/l   |                    |
| <b>Referenční meze</b>        | <b>Věk</b>   | <b>Koncentrace</b> |
|                               | < 15 let   | 28 – 80            |
|                               | > 15 let   | 28 – 100           |

**Kreatinin** vzniká neenzymatickou přeměnou z kreatinu a kreatinfosfátu.

**Kreatin** vzniká z argininu účinkem argininyglycinaminotransferázy (AGAT) za vzniku **guanidinoacetátu** a S-adenosyl-L-methionin-N-guanidinoacetátmetyltransferázy (GAMT). Kreatin je transportován do buněk kreatinovým transportérem (CRTR). Kreatin je fosforylován na kreatinfosfát.

Většina celkové tělesné zásoby kreatinu a kreatinfosfátu je ve svalích.

### Indikace vyšetření

1. vyšetření kreatininu v séru je součástí **vyšetření kyseliny močové pro výpočet indexů** (index dle Stapletona, exkretční frakce)
2. susp. **porucha syntézy kreatinu** (mentální/psychomotorická retardace/regres, porucha vývoje řeči, hypotonie, extrapyramidové příznaky, epilepsie, autistické příznaky)

### Interpretace výsledků

**snížená koncentrace** – u primárních poruch syntézy kreatinu

**sekundárně snížená koncentrace** – při úbytku svalové hmoty

**zvýšená koncentrace** – u nefropatie, při rhabdomyolýze a zmnožení svalové hmoty

## Kreatinin v moči

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Kreatinin v moči</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | -   |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní   |
| <b>Princip stanovení</b>      | Jaffého reakce, kinetické stanovení   |
| <b>Materiál</b>               | moč   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | stanovení není zcela specifické a může být ovlivněno redukcujícími látkami<br>kinetické měření na počátku reakce omezuje možnost interference jiných látek<br>koncentrace kreatininu < 1 mmol/l - snižuje přesnost kvantifikace látek vylučovaných močí, výsledky některých semikvantitativních metod mohou být falešně negativní<br>koncentrace kreatininu > 10-15 mmol/l - výsledky některých semikvantitativních metod mohou být falešně pozitivní |
| <b>Jednotky</b>               | mmol/l  |
| <b>Referenční meze:</b>       | 1,0-5,0   |

**Kreatinin** vzniká neenzymatickou přeměnou z kreatinu a kreatinfosfátu.

**Kreatin** vzniká z argininu účinkem argininglycinaminotransferázy (AGAT) za vzniku **guanidinoacetátu** a S-adenosyl-L-methionin-N-guanidinoacetátmetyltransferázy (GAMT). Kreatin je transportován do buněk kreatinovým transportérem (CRTR).

Kreatin je fosforylován na kreatinfosfát.

Většina celkové tělesné zásoby kreatinu a kreatinfosfátu je ve svalech.

### Indikace vyšetření

Vyšetření se provádí v každém přijatém vzorku moče pro standardizaci vylučování látek močí.

### Interpretace

Koncentrace v moči je ovlivněna pitným režimem, množstvím svalové hmoty a funkcí ledvin.

## Kyselina fenylpyrohroznová

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Kyselina fenylpyrohroznová</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | fenylpyruvát  |
| <b>Typ metody</b>             | semikvantitativní   |
| <b>Princip stanovení</b>      | Føllingův orientační test s chloridem železitým   |
| <b>Materiál</b>               | moč   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | nespecifická zkouška<br>pozitivní barevná reakce i s dalšími látkami (viz níže)<br>nespecifické barevné reakce s metabolity léků (viz níže) |
| <b>Jednotky</b>               | arb. j.   |
| <b>Referenční meze</b>        | negativní   |

**Fenylpyruvát** (a také fenylacetát a fenyllaktát) se hromadí jako produkt patologického metabolismu u klasické formy fenylketonurie při vysoké koncentraci fenylalaninu v krvi (cca nad 1200  $\mu\text{mol/l}$  nebo vyšší) při významném deficitu jaterní fenylalaninhydroxylázy.

Vyšetření se provádí při **podezření na fenylketonurii**.

Pozitivní nález je doplněn kvantitativním vyšetřením fenylalaninu v séru.

Provádí se u každého poprvé vyšetřovaného pacienta jako součást screeningu při dodání dostatečného množství moče.

**Chlorid železitý** vytváří s oxokyselinami v roztocích různě **barevné komplexy**.

Tato reakce byla jako tzv. Føllingův test používána pro zachycení pacientů s klasickou fenylketonurií, neboť s reakcí s kyselinou fenylpyrohroznovou vzniká zeleně zbarvený komplex.

| <b>Barva</b>          | <b>Sloučenina</b>   | <b>Příčina</b>  |
|-----------------------|---|---|
| Zelená až modrá       | Kyselina fenylhroznová<br>Kyselina imidazolhroznová<br>Katecholaminy<br>Kyselina xanthurenová | Klasická PKU<br>Histidinémie<br>Feocytochrom<br>Xanthurenová acidurie |
| Dočasně modrozelená   | Homogentisát  | Alkaptonurie  |
| Nazelenale šedá       | Větvené oxokyseliny   | Leucinóza   |
| Zelená                | 4-hydroxyfenylpyruvát   | Tyrosinémie typu I a II   |
| Šedá až černá         | Melanin   | Melanom   |
| Temně zelená          | Bilirubin   | Konjugované hyperbilirubinurie  |
| Třešňově červená      | Acetoacetát   | Diabetická ketoacidóza<br>Deficit $\beta$ -ketothiolázy               |
| Purpurová až hnědá    | 2-oxobutyrát  | Malabsorpce methioninu  |
| Purpurová             | Ketolátky<br>Salicyláty   | Deficit $\beta$ -ketothiolázy<br>Léky                                 |
| Purpurová nebo zelená | Fenothiazin   | Léky  |

## Kyselina metylmalonová

Zdeněk Čánský, Sylvie Šťastná, Petr Chrastina

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Kyselina metylmalonová</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | -   |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní   |
| <b>Princip stanovení</b>      | SID GC/MS, extrakce do etylacetátu, trimethylsilylace, vnitřní standard deuterovaná kyselina methylmalonová |
| <b>Materiál</b>               | plazma  |
| <b>Preanalytické poznámky</b> |   |
| <b>Jednotky</b>               | μmol/l  |
| <b>Referenční meze</b>        | individuální hodnocení u jednotlivých pacientů  |

**Indikací** k vyšetření je monitorování pacientů s definovanou methylmalonovou acidémií.

### **Příčiny zvýšeného vylučování kyseliny metylmalonové:**

1. methylmalonová acidurie z deficitu metylmalonyl-CoA mutázy
2. poruchy metabolismu vitamínu B<sub>12</sub> (kobalaminové deficiency) s poruchou syntézy adenosylkobalaminu
3. deficit vitamínu B<sub>12</sub>
4. deficit transkobalaminu II

## Kyselina močová

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Ivan Šebesta

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |                    |
|-------------------------------|--|--------------------|
| <b>Název</b>                  | <b>Kyselina močová</b>   |                    |
| <b>Synonyma</b>               | uráty  |                    |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní  |                    |
| <b>Princip stanovení</b>      | enzymatické fotometrické stanovení, 546 nm, urikáza, peroxidáza  |                    |
| <b>Materiál</b>               | sérum, moč   |                    |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | standardizované vyšetření kyseliny močové a purinového metabolismu se provádí po 3 denní bezpurinové dietě před odlitím vzorku moči je nutné celý objem moči v nádobě důkladně promíchat, aby v odlitém vzorku i ve zbylé moči v nádobě byla stejná koncentrace kyseliny močové výsledky stanovení nejsou ovlivněny přítomností kys. askorbové |                    |
| <b>Jednotky</b>               | μmol/l (sérum), mmol/l (moč)   |                    |
| <b>Referenční meze</b>        | <b>Sérum</b>   |                    |
|                               | <b>Věk</b>   | <b>Koncentrace</b> |
|                               | < 6 týdnů  | 140 – 340          |
|                               | 6 týdnů – 15 let   | 120 – 340          |
|                               | muži > 15 let  | 120 – 416          |
| ženy > 15 let                 | 120 - 340  |                    |

**Kyselina močová** je u člověka konečným metabolitem v katabolismu purinů. Je ve velkých kvantech vylučována močí.

**Puriny** jsou obsaženy ve většině potravin (nejvíce ve vnitřnostech) a vznikají v těle při rozpadu buněk.

Opakovaně zjištěné patologické hodnoty kyseliny močové v séru, zvýšené i snížené, ukazují na možnou poruchu metabolismu purinů a jsou indikací k současnému vyšetření kyseliny močové v séru a moči a k vyšetření purinového metabolismu.

Po vyloučení sekundárních příčin je indikováno cílené enzymatické vyšetření.

Dědičné poruchy metabolismu purinů je nutné potvrdit na enzymatické a/nebo molekulárně genetické úrovni.

### Diferenciální diagnostika hyperurikémie

- familiární dna, zejména u žen v mladém věku, akutní dnavá arthritida, urolitiáza, zvl. familiární, familiární intersticiální nefritida
- kompletní deficit hypoxantinosyltransferázy (HPRT) (Lesch-Nyhanův syndrom) – psychomotorická retardace, křeče, automutilace, extrapyramidové symptomy, dna, urolitiáza, dnavá nefropatie
- parciální deficit HPRT (Kelley-Seegmillerův syndrom) – bez neurologických symptomů
- zvýšená aktivita fosforibosylpyrofosfátsyntetázy (PRPPs) – ataxie, psychomotorická retardace, dysmorfie, hluchota, dna, urolitiáza, dnavá nefropatie

5. familiární juvenilní hyperurikemická nefropatie (FJHN) – dna, progresivní nefropatie s chronickým renálním selháním, autosomálně dominantní dědičnost
6. glykogenózy jaterní i svalové aj. sekundární hyperurikémie

#### **Diferenciální diagnostika hypourikémie**

1. xanthinurie (deficit xanthinoxidázy) – xanthinová urolitiáza
2. kombinovaný deficit xanthinoxidázy a sulfitoxidázy - xanthinová urolitiáza, psychomotorická retardace, křeče, ataxie, dislokace oční čočky
3. deficit purinnukleosidfosforylázy – SCID, imunodeficit s postižením buněčné imunity
4. deficit fosforibosylpyrofosfátsyntetázy (PRPPs) – mentální retardace, křeče, megaloblastická anémie
5. dědičná renální hypourikémie – izolovaná hypourikémie

## Kyselina močová – Index podle Kaufmana

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Ivan Šebesta

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |                |
|-------------------------------|--|----------------|
| <b>Název</b>                  | <b>Kyselina močová - Index podle Kaufmana</b>                          |                |
| <b>Synonyma</b>               | IK   |                |
| <b>Typ metody</b>             | výpočtová  |                |
| <b>Princip stanovení</b>      | IK = kyselina močová v moči / kreatinin v moči                         |                |
| <b>Materiál</b>               | moč  |                |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | moč by měla být přiměřeně koncentrovaná (kreatinin v moči 1-10 mmol/l) |                |
| <b>Jednotky</b>               | -  |                |
| <b>Referenční meze</b>        | <b>Věk</b>   | <b>Hodnota</b> |
|                               | < 2 měsíce   | 0,10 – 1,80    |
|                               | 2 měsíce – 2 roky  | 0,10 – 1,60    |
|                               | 2 – 8 let  | 0,10 – 1,00    |
|                               | 8 – 15 let   | 0,10 – 0,80    |
|                               | > 15 let   | 0,10 – 0,45    |

**Index podle Kaufmana (IK)** udává vylučování kyseliny močové močí.

Je určen k dynamickému vyšetření kyseliny močové a metabolismu purinů.

### Interpretace výsledků

**Zvýšené vylučování** může znamenat hyperurikurii při endogenní nadprodukci kyseliny močové, např. z deficitu hypoxantinfosforibosyltransferázy (HPRT) či při zvýšené aktivitě fosforibosylpyrofosfátsyntetázy (PRPPs).

**Snížené vylučování** – příčinou může být dědičná xanthinurie z deficitu xanthinoxidázy nebo kombinovaný deficit xanthinoxidázy i sulfitoxidázy

viz též Kyselina močová

## Kyselina močová - Index podle Stapletona

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Ivan Šebesta

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Kyselina močová - Index podle Stapletona</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | IS  |
| <b>Typ metody</b>             | výpočtová   |
| <b>Princip stanovení</b>      | $IS = (\text{kyselina močová v moči} / \text{kreatinin v moči}) \times \text{kreatinin v séru}$ |
| <b>Materiál</b>               | sérum, moč  |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | -   |
| <b>Jednotky</b>               | $\mu\text{mol/l}$   |
| <b>Referenční meze</b>        | < 100   |

**Index podle Stapletona (IS)** hodnotí vylučování kyseliny močové ve vztahu ke kreatininu v séru.

Slouží k dynamickému vyšetření kyseliny močové a metabolismu purinů.

**Zvýšené hodnoty** mohou znamenat hyperurikurii při endogenní nadprodukci kyseliny močové, např. z deficitu hypoxantinfosforibosyltransferázy (HPRT) či při zvýšené aktivitě fosforibosylpyrofosfátsyntetázy (PRPPs).

viz též Kyselina močová

## Kyselina močová - Exkreceční frakce

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Ivan Šebesta

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |                |
|-------------------------------|--|----------------|
| <b>Název</b>                  | <b>Kyselina močová<br/>Exkreceční frakce kyseliny močové</b>   |                |
| <b>Synonyma</b>               | EF <sub>KM</sub>   |                |
| <b>Typ metody</b>             | výpočtová  |                |
| <b>Princip stanovení</b>      | EF <sub>KM</sub> = (kys. močová v moči : kreatinin v moči) x (kreatinin v séru : kys. močová v séru) x 100 |                |
| <b>Materiál</b>               | sérum, moč   |                |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | -  |                |
| <b>Jednotky</b>               | %  |                |
| <b>Referenční meze</b>        | <b>Věk</b>   | <b>Hodnota</b> |
|                               | < 6 týdnů  | 17,0 – 41,0    |
|                               | 6 týdnů – 1 rok  | 14,0 – 34,0    |
|                               | 1 – 3 roky   | 9,0 – 21,0     |
|                               | 3 – 13 let   | 7,0 – 18,0     |
|                               | muži > 13 let  | 4,0 -12,0      |
|                               | ženy > 13 let  | 6,0 – 15,0     |

**Indikací** k vyšetření je susp. familiární dna, hyperurikémie, hyperurikemická nefropatie, susp. dědičná renální hypourikémie.

**Snížení EF<sub>KM</sub>** nacházíme u familiární juvenilní hyperurikemická nefropatie (FJHN).

**Výrazné zvýšení EF<sub>KM</sub>** nacházíme u dědičné renální hypourikémie.

viz též Kyselina močová

## Kyselina orotová

*Eva Košťálová, Josef Bárta, Sylvie Šťastná, Petr Chrastina*

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |                   |
|-------------------------------|--|-------------------|
| <b>Název</b>                  | <b>Kyselina orotová</b>  |                   |
| <b>Synonyma</b>               | -  |                   |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní stanovení  |                   |
| <b>Princip stanovení</b>      | fotometrické stanovení při 480 nm<br>s p-dimethylaminobenzaldehydem po odsolení moči<br>na ionexu, bromaci a redukci kys. askorbovou |                   |
| <b>Materiál</b>               | moč  |                   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | nutné uvést léky (allopurinol)<br>u intermitentní symptomatologie je nutné vyšetřit také moč<br>z akutní ataky                       |                   |
| <b>Jednotky</b>               | mmol/mol kreat.  |                   |
| <b>Referenční meze</b>        | <b>Věk</b>   | <b>Vylučování</b> |
|                               | < 1 rok  | < 6,6             |
|                               | 1 – 10 let   | < 3,5             |
|                               | > 10 let   | < 2,4             |

**Cyklus močovinny** je hlavní metabolická cesta k vyloučení nepotřebného dusíku.

Do cyklu vstupuje toxický **amoniak** podobě karbamoylfosfátu, z cyklu vystupuje netoxická **močovina**, která se vylučuje močí. Celý cyklus je přítomen pouze v játrech, částečně v mitochondrii, částečně v cytosolu.

Důsledkem bloku v cyklu močovinny je **hyperamonémie**.

Cyklus močovinny úzce souvisí s dalšími metabolickými cestami intermediárního metabolismu, proto se hyperamonémie může objevit i u transportních poruch intermediárních metabolitů cyklu močovinny – u intolerance bílkovin s lysinurií (LPI), HHH syndromu (hyperammonémie, hyperornithinémie, homocitrulinurie), deficitu citrinu (citrulinémie typu II), dále u organických acidémií, poruch oxidace mastných kyselin, jiných dědičných metabolických poruchách a při sekundárních poruchách.

**Kyselina orotová** je intermediární metabolit, který spojuje cyklus močovinny s de novo syntézou pyrimidinů.

Kyselina orotová se hromadí při bloku v cyklu močovinny distálně od karbamoylfosfátu, hlavně u deficitu ornithintranskarmoylázy (OTC, X-vázané onemocnění), dále u citrulinémie, argininojantarové acidurie a deficitu arginázy, může se hromadit i u transportních poruch intermediárních metabolitů cyklu močovinny. U těchto poruch se hromadí v mitochondrii karbamoylfosfát, který přechází do cytosolu a zde se v de novo syntéze pyrimidinů metabolizuje na kyselinu orotovou, orotidin a uridin.

Zvýšené vylučování kyseliny orotové může být intermitentní, proto je důležité opakované vyšetření, zvláště v období akutní dekompenzace.

Vylučování kyseliny orotové může být v mezidobí u mírného deficitu OTC u mužů a u heterozygotních žen-přenašeček normální.

### **Test s alopurinolem**

Podání alopurinolu vede k vzestupu biosyntézy pyrimidinů blokadou uridinmonofosfátsyntázy (UMPS), enzymu, který katalyzuje přeměnu kyseliny orotové na uridinmonofosfát.

Blokáda vede v případě pozitivního nálezu k výraznému vzestupu vylučování kyseliny orotové a jejího metabolitu orotidinu.

Test se používá zejména k **detekci žen-heterozygotek pro deficit OTC nebo mírné formy deficitu OTC u mužů**, kde nejsou specifické změny v koncentraci nebo vylučování aminokyselin, v případech nejasné tranzitorní nebo intermitentní hyperamonémie, nejasných atak komatu, encefalopatie, mentální retardace nebo regrese u obou pohlaví.

**Pozitivní** nález byl kromě u deficitu OTC zjištěn také u jiných genetických poruch, včetně poruch transportu aminokyselin, poruch syntézy kreatinu a mitochondriálních poruch a Rettova syndromu.

**Negativní** nález (normální vylučování kyseliny orotové) nemůže zcela vyloučit heterozygotii pro deficit OTC u žen, neboť mozaicismus v játrech (lyonizace) může být posunut ve prospěch normálních hepatocytů do té míry, že znemožňuje detekci přednášečství X-vázaných poruch.

**Indikací** k vyšetření je:

1. hyperamonemie
2. susp. deficit OTC
3. susp. další poruchy cyklu močoviny
4. susp. HHH syndrom (hyperammonémie, hyperornithinémie, homocitrulinurie)
5. susp. intolerance bílkovin s lysinurií (LPI)
6. susp. deficitu citrinu (citrulinémie typu II)
7. zátěžový test s alopurinolem k detekci heterozygotek pro deficit OTC
8. susp. dědičná orotová acidurie z deficitu uridinmonofosfátsyntázy (UMPS) - megaloblastická anemie rezistentní na léčbu, urolitiáza

### **Interpretace zvýšeného vylučování kyseliny orotové**

1. dědičné metabolické poruchy se zvýšenou produkcí karbamoylfosfátu - deficit OTC, citrulinémie, argininojantarová acidurie, argininémie, HHH syndrom, LPI, deficitu citrinu (citrulinémie typu II)
2. dědičná orotová acidurie z deficitu UMPS
3. sekundárně zvýšené vylučování

Pozitivní nález je nutné doplnit kvantitativním vyšetřením (aminokyseliny v séru/plasmě, moči, puriny a pyrimidiny v moči), event. cíleným enzymatickým nebo molekulárně genetickým vyšetřením.

Analýza mutací v genu pro OTC by měla být zvažována, zůstává-li deficit OTC i přes negativní test s alopurinolem jednou z diagnostických možností.

## Kyselina sialová

Jana Ledvinová, Sylvie Šťastná, Milan Elleder

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |                               |                                 |
|-------------------------------|---|-------------------------------|---------------------------------|
| <b>Název</b>                  | <b>Kyselina sialová</b>                                     |                               |                                 |
| <b>Synonyma</b>               | -   |                               |                                 |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní   |                               |                                 |
| <b>Princip stanovení</b>      | fotometrická metoda, 549 nm, s kyselinou 2-thiobarbiturovou |                               |                                 |
| <b>Materiál</b>               | moč   |                               |                                 |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | -   |                               |                                 |
| <b>Jednotky</b>               | mmol/g kreatininu   |                               |                                 |
| <b>Referenční meze</b>        | <b>Věk</b>  | <b>Volná kyselina sialová</b> | <b>Celková kyselina sialová</b> |
|                               | 0 – 6 měsíců  | 1,06 ± 0,64                   | 1,97 ± 1,05                     |
|                               | 7 měsíců – 1 rok  | 0,79 ± 0,50                   | 1,49 ± 0,82                     |
|                               | 1 – 2 roky  | 0,55 ± 0,24                   | 1,01 ± 0,46                     |
|                               | 2 roky – 5 let  | 0,44 ± 0,20                   | 0,84 ± 0,30                     |
|                               | 5 – 10 let  | 0,24 ± 0,14                   | 0,41 ± 0,23                     |
|                               | > 10 let  | 0,21 ± 0,11                   | 0,35 ± 0,21                     |

**Kyselina sialová** je transportována z lysosomů za účasti transportního proteinu sialinu.

### Indikace k vyšetření:

susp. zvýšené vylučování kyseliny sialové u poruchy jejího transportu přes lysosomální membránu:

1. **infantilní forma (ISSD – infantile free sialic acid storage disease)**

časné neprospívání, hepatosplenomegalie, těžká psychomotorická retardace, faciální dysmorfie s hrubšími rysy obličeje, dysostosis multiplex

2. **pozdější forma (Salla disease)**

po bezpříznakovém období opoždování psychomotorického vývoje až regres, ataxie

**Pozitivní nález** je specifický pro obě formy poruchy transportu kyseliny sialové přes lysosomální membránu.

Současně bývá zvýšené vylučování **sialyloligosacharidů v moči**, viz Oligosacharidy.

## Laktát a pyruvát

*Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová*

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                                     |  |                   |
|-------------------------------------|--|-------------------|
| <b>Název</b>                        | <b>Laktát a pyruvát</b>  |                   |
| <b>Synonyma</b>                     | kyselina mléčná a kyselina pyrohroznová  |                   |
| <b>Typ metody</b>                   | kvantitativní  |                   |
| <b>Princip stanovení</b>            | enzymatické spektrofotometrické stanovení, 340 nm, laktátdehydrogenáza, NAD, NADH  |                   |
| <b>Materiál</b>                     | krev (laktát, pyruvát), likvor (laktát), moč (laktát)  |                   |
| <b>Preanalytické poznámky</b>       | <p>odběr krve bez ischemizace končetiny do dvojnásobného objemu studené 8% kyseliny chloristé, důkladně protřepat, transport zkumavky v malém množství vody s ledem, centrifugovat, odsát deproteinát</p> <p>stanovuje se pouze L-laktát (nikoliv D-laktát)</p> <p>metabolická acidóza se objevuje až při koncentraci laktátu v krvi &gt; 5 mmol/l</p> <p>společný odběr pro stanovení laktátu, pyruvátu a 3-hydroxybutyrátu v krvi</p> <p>poměr L/P v krvi = koncentrace laktátu / koncentrace pyruvátu</p> <p>poměr L/P se vypočte pouze v případě zvýšené koncentrace laktátu</p> |                   |
| <b>Jednotky</b>                     | mmol/l (krev, likvor), mmol/mol kreat. (moč)   |                   |
| <b>Referenční meze:</b>             | <b>Laktát - krev</b> < 2,0, hraniční 2-3   |                   |
|                                     | <b>Laktát - likvor</b> < 2,0, hraniční 2-3   |                   |
|                                     | <b>Laktát - moč</b>  |                   |
|                                     | <b>Věk</b>   | <b>Vylučování</b> |
|                                     | < 1 měsíc  | < 150             |
|                                     | 1 – 6 měsíců   | < 100             |
|                                     | 6 měsíců – 2 roky  | < 70              |
|                                     | 2 – 10 let   | < 40              |
|                                     | > 10 let   | < 30              |
| <b>Poměr laktát/pyruvát</b> 10 – 20 |  |                   |

**Laktát a pyruvát** jsou fyziologické metabolity v intermediárním metabolismu sacharidů. Jejich hladiny v plasmě odrážejí rovnováhu mezi jejich produkcí během glykolýzy v cytoplasmě a jejich spotřebou v mitochondriích. Hladiny laktátu a pyruvátu v krvi a poměr L/P odrážejí redox stav buněk v cytosolu.

**Laktát** se hromadí v krvi při kardiopulmonální dysfunkci různé etiologie a při dalších stavech, může být i svalového původu. Tyto stavy musí být vyloučeny předtím, než se začne pátrat po dědičných poruchách oxidace laktátu a pyruvátu.

Hladina laktátu neumožní rozlišit její příčinu. Některé získané poruchy jsou spojeny s velmi vysokými hladinami, kdežto u některých DMP laktátového/pyruvátového metabolismu jsou hladiny jen mírně zvýšeny. Také nutriční stav má vliv na hladiny laktátu a pyruvátu.

Zvýšená hladina laktátu v nepřítomnosti infekce a tkáňové hypoxie je významný nález. Mírné zvýšení koncentrace je často pozorováno u organických acidémií a hyperamonémií, vysoké hladiny jsou časté u hypoxie.

Hladiny laktátu v krvi kolísají, je známo, že i u pacientů se známou mitochondriální poruchou není koncentrace laktátu vždy zvýšená.

U intermitentní laktátové acidózy nemusí být současně hyperlaktacidémie a hyperlaktacidurie. V likvoru může být zvýšená koncentrace laktátu u mitochondriálních encefalopatií i bez hyperlaktacidémie.

Tato metoda nestanovuje **D-laktát**, který je tvořen střevními bakteriemi. Vzniká při malabsorpci nebo syndromu krátkého střeva, pacienti mívají metabolickou acidózu a masivní laktátovou acidurie, zjištěnou analýzou močových organických kyselin (stanovuje L- i D-laktát).

Krátká léčba perorálním neomycinem nebo metronidazolem vede k rychlému poklesu tvorby D-laktátu a ústupu metabolické acidózy i laktátové acidurie.

Hromadění **pyruvátu** nevede k výraznému zvýšení koncentrace pyruvátu, ale k jeho přeměně na jeho dva metabolity, laktát a alanin. Koncentrace alaninu není falešně zvýšená při nevhodném odběru. Stanovení pyruvátu je důležité pro posouzení poměru koncentrací laktát/pyruvát v krvi.

**Indikací** k vyšetření laktátu a pyruvátu jsou metabolická acidóza, susp. laktátová acidóza – ataky dekompenzace, Kussmaulovo dýchání, hepatomegalie, myopatie, encefalopatie, psychomotorická retardace až regres, hypoglykémie, hyperurikémie.

#### **Příčiny laktátové acidózy (L-laktát):**

##### **1. primární laktátové acidózy**

poruchy metabolismu glykogenu v játrech (glykogenózy)

poruchy jaterní glukoneogeneze

poruchy oxidace laktátu na pyruvát

deficit pyruvátdehydrogenázy (PDH)

poruchy Krebsova cyklu

poruchy respiračního řetězce

##### **2. sekundární laktátové acidózy u DMP**

organické acidurie (methylmalonová, propionová, izovalerová, 3-hydroxy-3-metylglukotanová a pyroglutamová)

poruchy cyklu močoviny (zejména citrulinémie)

poruchy oxidace mastných kyselin

##### **3. ostatní sekundární laktátové acidózy**

hypoxémie, hypoventilace, porucha cirkulace, šok, sepse, srdeční a plicní onemocnění,

jedy poškozující buněčnou respiraci

anaerobní cvičení, křeče, křik dětí při odběru (k vzestupu koncentrace v krvi nedochází u poruch glykogenolýzy a glykolýzy ve svalech), chronická infekce (zvláště močových cest), průjmy, hepatopatie, poruchy výživy

#### **Příčiny zvýšeného poměru laktát/pyruvát:**

1. deficit pyruvátkarboxylázy (PC) (izolovaného nebo sekundárního při deficitu biotinidázy nebo holokarboxylázysyntetázy)

2. deficit  $\alpha$ -ketoglutarátdehydrogenázy

3. poruchy respiračního řetězce

Je-li **zvýšená koncentrace pyruvátu** spojena s **normálním nebo sníženým poměrem L/P**, je vhodné zvážit bez ohledu na hladinu laktátu diagnózu **deficit pyruvátdehydrogenázy (PDH)** nebo **poruchu přenašeče pyruvátu**.

Příčinu laktátové acidózy je nutné potvrdit na úrovni metabolitů/enzymu/proteinu/DNA/mtDNA.

## Mukopolysacharidy semikvantitativně v moči

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Josef Bártil, Eva Košťálová  
Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Mukopolysacharidy (MPS) semikvantitativně v moči</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | screening mukopolysacharidů v moči<br>glykosaminoglykany (GAG)  |
| <b>Typ metody</b>             | semikvantitativní   |
| <b>Princip stanovení</b>      | screeningový test s azurovou modří  |
| <b>Materiál</b>               | moč   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | výsledek vyšetření je ovlivněn koncentrovaností moče u výrazně koncentrovaných močí (koncentrace kreatininu nad 10-15 mmol/l) je riziko falešně pozitivního výsledku s nálezem zvýšeného vylučování mukopolysacharidů v nedostatečně koncentrované moči (koncentrace kreatininu pod 1 mmol/l) není vyšetření touto metodou spolehlivé a je riziko falešně negativního výsledku před odlitím vzorku moči je nutné celý objem moči v nádobě důkladně promíchat, aby v odlitém vzorku i ve zbylé moči v nádobě byla stejná koncentrace mukopolysacharidů |
| <b>Jednotky</b>               | arb. j.   |
| <b>Referenční meze</b>        | negativní   |

**Mukopolysacharidy (MPS, glykosaminoglykany, GAG)** jsou základními složkami pojivových tkání včetně chrupavek a cévních stěn.

Mukopolysacharidy v moči pocházejí z rozpadlých tubulárních buněk.

**Mukopolysacharidózy (MPS)** jsou dědičné poruchy degradace mukopolysacharidů v lysosomech.

**Indikací k vyšetření** je podezření na stádavé onemocnění ze skupiny mukopolysacharidóz u pacientů s faciální dysmorfii s hrubšími rysy, kostními deformitami, retardací nebo regrese psychomotorického vývoje, hepatosplenomegalií, zákalý rohovek, herniemi.

Vyšetření se provádí se u každého poprvé vyšetřovaného pacienta, je-li dodáno dostatečné množství moče.

### Interpretace

Při pozitivním nálezu je doplněno kvantitativní a event. i elektroforetické vyšetření moče.

Specificky zvýšené vylučování nacházíme u mukopolysacharidóz.

Nespecificky zvýšené vylučování nacházíme u rachtida, revmatismu, myokarditida, u pacientů v těžkém stavu na intenzivní terapii, při kortikoterapii nebo léčbě heparinem.

Fyziologický nález nevylučuje diagnózu mukopolysacharidózy.

## Mukopolysacharidy kvantitativně v moči

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Josef Bártl, Eva Košťálová  
Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |                   |
|-------------------------------|---|-------------------|
| <b>Název</b>                  | <b>Mukopolysacharidy (MPS) kvantitativně v moči</b>   |                   |
| <b>Synonyma</b>               | glykosaminoglykany (GAG)  |                   |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní   |                   |
| <b>Princip stanovení</b>      | fotometrické stanovení, 520 nm, dimethylmethylenová modř, modifikovaná metoda s TRIS  |                   |
| <b>Materiál</b>               | moč, sběr moči  |                   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | vylučování mukopolysacharidů kolísá během dne a klesá s věkem, k vyšetření je proto vhodný vzorek z krátkodobého sběru nebo více porcí moče<br>před odlitím vzorku moči je nutné celý objem moči v nádobě důkladně promíchat, aby v odlitém vzorku i ve zbylé moči v nádobě byla stejná koncentrace mukopolysacharidů |                   |
| <b>Jednotky</b>               | g/mol kreat.  |                   |
| <b>Referenční meze</b>        | <b>Věk</b>  | <b>Vylučování</b> |
|                               | < 6 měsíců  | < 50,0            |
|                               | 6 měsíců – 1 rok  | < 30,3            |
|                               | 1 – 2 roky  | < 26,4            |
|                               | 2 – 4 roky  | < 18,4            |
|                               | 4 – 6 let   | < 15,5            |
|                               | 6 – 8 let   | < 12,8            |
|                               | 8 – 10 let  | < 10,0            |
|                               | 10 – 18 let   | < 7,7             |
|                               | > 18 let  | < 4,6             |

**Mukopolysacharidy (MPS, glykosaminoglykany, GAG)** jsou základními složkami pojivových tkání včetně chrupavek a cévních stěn.

Mukopolysacharidy v moči pocházejí z rozpadlých tubulárních buněk.

**Mukopolysacharidózy (MPS)** jsou dědičné poruchy degradace mukopolysacharidů v lysosomech.

**Indikací k vyšetření** je podezření na stádavé onemocnění ze skupiny mukopolysacharidóz u pacientů s faciální dysmorfii s hrubšími rysy, kostními deformitami, retardací nebo regrese psychomotorického vývoje, hepatosplenomegalií, zákalý rohovek, herniemi. Vyšetření slouží k ověření zvýšeného vylučování zjištěného orientačním vyšetřením.

### Interpretace

**Specificky zvýšené vylučování** nacházíme u mukopolysacharidóz.

**Nespecificky zvýšené vylučování** nacházíme u rachitidy, revmatismu, myokarditidy, u pacientů v těžkém stavu na intenzivní terapii, při kortikoterapii nebo léčbě heparinem.

Zvýšené vylučování mukopolysacharidů bude doplněno elektroforetickým vyšetřením mukopolysacharidů a vyšetřením oligosacharidů v moči.

Fyziologický nález nevylučuje diagnosu mukopolysacharidózy, zvláště u větších dětí a dospělých a u MPS III a IV.

Při přetrvávajícím podezření na MPS je nutné provést cílené enzymatické vyšetření i při fyziologickém vylučování mukopolysacharidů.

## Mukopolysacharidy kvalitativně (elektroforéza) v moči

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Josef Bárta, Eva Košťálová  
Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Název</b>                  | <b>Mukopolysacharidy kvalitativně (elektroforéza) v moči</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | glykosaminoglykany (GAG)   |
| <b>Typ metody</b>             | kvalitativní, profilová  |
| <b>Princip stanovení</b>      | izolace s cetylpyridinium chloridem, jednorozměrná elektroforéza, barvení alciánovou modří   |
| <b>Materiál</b>               | moč, sběr moči   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | vyšetření se provádí v dostatečně koncentrované moči (koncentrace kreatininu < 1 mmol/l)<br>před odlitím vzorku moči je nutné celý objem moči v nádobě důkladně promíchat, aby v odlitém vzorku i ve zbylé moči v nádobě byla stejná koncentrace mukopolysacharidů |
| <b>Jednotky</b>               | -  |
| <b>Referenční meze</b>        | vždy jsou přítomny chondroitinsulfáty (CS)<br>heparansulfát (HS) a dermatansulfát (DS) může být ve stopách, přítomnost keratansulfátu (KS) je vždy patologická   |

**Mukopolysacharidy (glykosaminoglykany, GAG)** jsou základními složkami pojivových tkání včetně chrupavek a cévních stěn.

Mukopolysacharidy v moči pocházejí z rozpadlých tubulárních buněk.

**Mukopolysacharidózy (MPS)** jsou dědičné poruchy degradace mukopolysacharidů v lysosomech.

**Indikací k vyšetření** je podezření na střádavé onemocnění ze skupiny MPS u pacientů s faciální dysmorfii s hrubšími rysy, kostními deformitami, retardací nebo regrese psychomotorického vývoje, hepatosplenomegalií, zákaly rohovek, herniemi.

Vyšetření slouží k posouzení frakcí MPS separovaných elektroforeticky.

### Interpretace

Vyšetření stanovuje jednotlivé frakce mukopolysacharidů a slouží k předběžné typizaci MPS:

↑HS, (↑DS); HS > DS – nález je susp. pro MPS III

↑DS, (↑HS); DS > HS – nález je susp. pro MPS I, II nebo VI

↑KS – nález je susp. pro MPS IV

↑CS, (↑DS, ↑HS) – nález je susp. pro MPS VII

Diagnostika MPS IV je obtížná, v dospělosti je u některých pacientů vylučování KS pod mezi detekce.

Fyziologický nález nevylučuje diagnózu MPS, při trvajícím podezření na MPS je nutné provést cílené enzymatické vyšetření.

Vyšetření bude doplněno vyšetřením oligosacharidů v moči.

Typ MPS musí být stanoven enzymatickým vyšetřením.

## Mukopolysacharidy kvantitativně v plodové vodě

*Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Josef Bártl, Eva Košťálová*  
Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Název</b>                  | <b>Mukopolysacharidy kvantitativně v plodové vodě</b>                                |
| <b>Synonyma</b>               | glykosaminoglykany (GAG)   |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní  |
| <b>Princip stanovení</b>      | fotometrické stanovení, 520 nm, dimethylmethylenová modř, modifikovaná metoda s TRIS |
| <b>Materiál</b>               | plodová voda   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | 10 ml supernatantu plodové vody  |
| <b>Jednotky</b>               | mg/l   |
| <b>Referenční meze</b>        | < 40,5   |

Vyšetření se provádí v rámci **prenatální diagnostiky pro riziko mukopolysacharidózy**.

Zvýšené vylučování mukopolysacharidů bude doplněno elektroforetickým vyšetřením mukopolysacharidů v plodové vodě.

Vyšetření doplňuje výsledek enzymatického, elektronmikroskopického event. molekulárně genetického vyšetření.

Negativní vyšetření nevylučuje MPS u plodu, je nutno vyčkat na výsledky dalších uvedených vyšetření.

## Mukopolysacharidy kvalitativně (elektroforéza) v plodové vodě

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Josef Bárta, Eva Košťálová  
Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Mukopolysacharidy kvalitativně (elektroforéza) v plodové vodě</b>                      |
| <b>Synonyma</b>               | glykosaminoglykany (GAG)  |
| <b>Typ metody</b>             | kvalitativní, profilová   |
| <b>Princip stanovení</b>      | izolace s cetylpyridinium chloridem, dvourozměrná elektroforéza, barvení alciánovou modří |
| <b>Materiál</b>               | plodová voda  |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | 10 ml supernatantu plodové vody   |
| <b>Jednotky</b>               | -   |
| <b>Referenční meze</b>        | vždy jsou přítomny chondroitinsulfáty a kyselina hyaluronová                              |

Vyšetření se provádí v rámci **prenatální diagnostiky pro riziko mukopolysacharidózy**.

Vyšetření nelze použít pro diagnózu MPS IV a VII.

Vyšetření stanovuje jednotlivé frakce mukopolysacharidů a slouží k typizaci MPS:

MPS I, II, VI - ↑DS, (↑HS)

MPS III - ↑HS, (↑DS)

Vyšetření doplňuje výsledek enzymatického, elektronmikroskopického event. molekulárně genetického vyšetření.

Negativní vyšetření nevylučuje MPS u plodu, je nutno vyčkat na výsledky dalších uvedených vyšetření.

## Oligosacharidy, sialyloligosacharidy

Eva Košťálová, Petr Chrastina, Sylvie Šťastná

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Název</b>                  | <b>Oligosacharidy, sialyloligosacharidy</b>  |
| <b>Synonyma</b>               | -  |
| <b>Typ metody</b>             | kvalitativní, profilová  |
| <b>Princip stanovení</b>      | TLC, detekce orcinolem, resorcinolem, ninhydrinem  |
| <b>Materiál</b>               | moč, sběr moči (nejlépe 12 hodinový)   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | vylučování oligosacharidů klesá s věkem<br>vysoká koncentrace solí a barviv (orcinolpozitivní látky) v moči způsobuje sníženou transparentci chromatogramu a znemožňuje správnou interpretaci nálezu<br>vysoká koncentrace solí způsobuje zdeformování frakcí a znemožňuje správnou interpretaci nálezu<br>k vyšetření je vhodný vzorek z 12 hodinového sběru, protože vylučování oligosacharidů kolísá během dne<br>před odlitím vzorku moči je nutné celý objem moči v nádobě důkladně promíchat, aby v odlitém vzorku i ve zbylé moči v nádobě byla stejná koncentrace oligosacharidů |
| <b>Jednotky</b>               | -  |
| <b>Referenční meze</b>        | -  |

Významná část lysosomálních stárávých poruch způsobuje hromadění specifických **oligosacharidů**, které mohou být kvalitativně detekovány v moči tenkovrstevnou chromatografií. Kvantitativní analýza je dostupná pouze pro volnou kyselinu sialovou pro diagnostiku choroby se stáráváním kyseliny sialové (infantilní forma ISSD – infantile free sialic acid storage disease a pozdější forma Salla disease).

Zdrojem oligosacharidů v moči jsou zejména tubulární buňky ledvin.

**Indikací** k vyšetření je podezření na stárávé onemocnění ze skupiny glykoproteinóz nebo lipidóz (enzymatické poruchy v odbourávání oligosacharidů a lipidů v lysosomech), které mají za následek stárávání inkompletně odbouraných substrátů.

### Hodnocení profilu oligosacharidů:

#### 1. vysoce specifické nálezy

$\alpha$ -mannosidóza,  $\beta$ -mannosidóza, fukosidóza,  $G_{M1}$  gangliosidóza, Schindlerova choroba, sialidóza, galaktosialidóza, aspartylglykosaminurie

#### 2. méně specifické nálezy

glykogenóza II, mukolipidóza II, Gaucherova choroba,  $G_{M2}$  gangliosidóza, mukopolysacharidóza I

### Analýza oligosacharidů umožňuje diagnostiku těchto poruch:

fukosidózy,  $\alpha$ -mannosidózy,  $\beta$ -mannosidózy, aspartylglykosaminurie, Schindlerovy choroby, sialidózy,  $G_{M1}$ - a  $G_{M2}$ -gangliosidózy, galaktosialidózy, Gaucherovy choroby, Pompeho choroby a choroby se stáráváním kyseliny sialové.

### **Hodnocení**

Patologický nález u tenkovrstevné chromatografie může být variabilní a hodnocení bývá obtížné. Všechny případy (nejčastěji adultní formy) nemusejí být zachyceny.

Nález u kojenců na mateřském mléce může připomínat  $\alpha$ -mannosidózu.

Zvýšené vylučování sialyloligosacharidů by mělo být doplněno vyšetřením kyseliny sialové v moči – viz Kyselina sialová.

Positivní nález je vždy nutné ověřit enzymatickým vyšetřením.

Je-li u pacienta z klinického obrazu podezření na konkrétní střádavé onemocnění ze skupiny glykoproteinóz nebo lipidóz, je nutné provést cílené enzymatické vyšetření i při fyziologickém profilu oligosacharidů a sialyloligosacharidů

## Organické kyseliny v séru/plazmě

Zdeněk Čánský, Lucia Varholáková, Eva Košťálová, Petr Chrastina  
Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Organické kyseliny v séru/plazmě</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | -   |
| <b>Typ metody</b>             | profilová, semikvantitativní  |
| <b>Princip stanovení</b>      | GC/MS, deproteinace, ethoximace, vnitřní standard kyselina fenylmásečná, extrakce do etylacetátu, trimethylsilylace   |
| <b>Materiál</b>               | sérum, plazma   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | nutné uvést výživu, dietu, léky<br>u intermitentní symptomatologie je nutné vyšetření séra/plazmy také v akutní atace |
| <b>Jednotky</b>               | μmol/l  |
| <b>Referenční meze</b>        | podle interních norem   |

Stanovení **organických kyselin v séru/plazmě** se provádí jako doplňující vyšetření k vyšetření organických kyselin v moči nebo event. nelze-li získat moč.

**Indikace** k vyšetření je zejména podezření na některou z poruch  $\beta$ -oxidace mastných kyselin (deficit MCAD, VLCAD, LCHAD, glutarovou acidurii typu II).

**Riziko falešně negativního nálezu** je u intermitentních forem některých uvedených DMP.

## Organické kyseliny v moči

Lucia Varholáková, Petr Chrastina, Eva Košťálová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Název</b>                  | <b>Organické kyseliny v moči</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | -  |
| <b>Typ metody</b>             | profilová, semikvantitativní   |
| <b>Princip stanovení</b>      | GC/MS, ethoximace, V.S. kys. fenylmásečná, extrakce do ethylacetátu, trimethylsilylace                         |
| <b>Materiál</b>               | moč, sběr moči (nejlépe 12 hodinový)   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | nutno uvést výživu, dietu, léky<br>u intermitentní symptomatologie je nutné vyšetření moče také v akutní atace |
| <b>Jednotky</b>               | mg/g kreatininu  |
| <b>Referenční meze</b>        | podle interních norem  |

**Organické kyseliny** jsou nejlépe analyzovány v **moči**, neboť se obvykle dobře vylučují ledvinami a jejich hladiny jsou v moči obvykle v mnohem vyšších koncentracích než v jiných tělesných tekutinách.

**Indikací k** vyšetření jsou:

1. susp. organická acidurie
2. susp. aminoacidopatie
3. susp. poruchy oxidace mastných kyselin
4. susp. poruchy mitochondriálního energetického metabolismu
5. nejasné akutní, recidivující nebo chronické stavy s metabolickou acidosou nebo alkalosou, vysokým anion gapem, hyperamonémií, hyperlaktacidémií, hypoglykemií, ketózou, novorozeneckou ketonurií
6. nejasné intoxikace, metabolické krize, hepatopatie
7. epileptická encefalopatie
8. progredující neurologické, neuromuskulární nebo multisystémové onemocnění

Vyšetření stanovuje sumu L-laktát + D-laktát.

Hodnota vylučování laktátu naměřená touto metodou je nižší než hodnota získaná fotometricky.

Riziko **falešně negativního nálezu** je u intermitentních forem některých uvedených DMP.

## Pteriny

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Eva Košťálová

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Název</b>                  | <b>Pteriny</b>   |
| <b>Synonyma</b>               |  |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní, profilová   |
| <b>Princip stanovení</b>      | HPLC, oxidace oxidem manganičitým, fluorimetrická detekce                |
| <b>Materiál</b>               | moč  |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | moč je nutné chránit před světlem (zkumavku zabalit do alobalu) zamrazit |
| <b>Jednotky</b>               | mmol/mol kreatininu  |
| <b>Referenční meze:</b>       | podle interních norem  |

Zvýšená hladina fenylalaninu v plasmě (**hyperfenylalaninémie/fenylketonurie, HPA/PKU**), která je obvykle zachycena novorozeneckým screeningem, je většinou způsobena **deficitem fenylalaninhydroxylázy (PAH)**, ale někdy je příčinou deficit kofaktoru PAH **tetrahydrobiopterinu (BH<sub>4</sub>)**, tj. porucha metabolismu pterinů.

Vzhledem ke zcela odlišné léčebné strategii u obou poruch je nezbytné tyto 2 příčiny od sebe jednoznačně odlišit.

**Vyšetření pterinů v v moči** je standardní součástí diferenciativně diagnostického vyšetření novorozence s HPA/PKU (vedle testu s BH<sub>4</sub> a stanovení aktivity dihydropteridinreduktázy v suché krevní kapce).

**Indikací k vyšetření pterinů v moči** je

1. diagnostika poruch metabolismu pterinů u všech novorozenců s HPA/PKU při koncentraci fenylalaninu v krvi nad 120 μmol/l;
2. klinické podezření na poruchu metabolismu pterinů u starších dětí (u některých poruch metabolismu pterinů není přítomna hyperfenylalaninémie).

**Interpretace výsledků:**

1. **fyziologický** profil pterinů v moči – deficit PAH jako příčinu HPA/PKU je nutné potvrdit stanovením mutací v genu pro PAH
2. **hraniční nebo patologický** profil pterinů v moči - podezření na poruchu metabolismu pterinů je nutné potvrdit na enzymatické a/nebo molekulárně genetické úrovni.

## Puriny a pyrimidiny

Josef Bártl, Eva Košťálová, Sylvie Šťastná, Jakub Krijt  
Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Puriny a pyrimidiny</b>  |
| <b>Synonyma</b>               | -   |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní, profilová  |
| <b>Princip stanovení</b>      | HPLC, UV detekce  |
| <b>Materiál</b>               | moč, plazma, likvor   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | nejlépe ranní moč ihned zamražená po odběru<br>sběr moči – každou porci je nutné ihned zamrazit<br>přítomnost bakterií (moč uchovávaná při pokojové teplotě,<br>infekce močových cest) významně snižuje množství purinů<br>a pyrimidinů v moči<br>labilní metabolity (hl. SAICAr, marker deficitu<br>adenylosukcinázy) se při pokojové teplotě rozkládají<br>interference některých běžně užívaných léků (ibuprofen,<br>acetaminophen, acycloguanosin aj.)<br>den před sběrem a v den sběru moče nutno vyloučit ze stravy<br>nápoje a jídla obsahující metylxantiny (káva, černý čaj,<br>kakao, lékořice) |
| <b>Jednotky</b>               | mmol/mol kreatininu (moč), μmol/l (plazma, likvor)  |
| <b>Referenční meze</b>        | podle interních norem   |

**Puriny a pyrimidiny** jsou látky, které se účastní přenosu energie, regulací metabolismu a syntézy DNA a RNA.

Purinový i pyrimidinový metabolismus zahrnuje de novo syntézu, katabolismus a recyklaci purinů a pyrimidinů.

Dědičné poruchy jsou známy v obou skupinách ve všech 3 metabolických cestách.

Téměř všechny poruchy metabolismu purinů a pyrimidinů mají odchylky při vyšetření moči metodou **HPLC**.

K vyloučení některých poruch metabolismu pyrimidinů by měla být vyšetřena moč na přítomnost dihydropyrimidinů metodou **GS-MS** (analýzou **organických kyselin**), neboť HPLC tyto látky nedetekuje.

### Indikací k vyšetření profilu purinů a pyrimidinů jsou:

1. **moč** – mentální nebo psychomotorická retardace, tonusové poruchy (hypotonie, hypertonie, dystonie), ataxie, automutilace, křeče, poruchy chování, urolitiáza, nefrolitiáza, nejasná hyperurikémie s hyperurikurií, zejména v mladém věku nebo familiární, renální selhání, SCID, nejasný imunodeficit s postižením buněčné imunity, susp. deficit ornithinkarbamoyltransferázy (OTC), anemie megaloblastická/hemolytická, monitorování pacientů léčených allopurinolem
2. **krev** - monitorování léčby allopurinolem k vyloučení rizika nežádoucích účinků
3. **likvor** - susp. deficit adenylosukcinátlyázy (ADSL)

Konečné potvrzení zvažovaného defektu purinového nebo pyrimidinového metabolismu vyžaduje **enzymatické** nebo **molekulárně genetické vyšetření**.

## Redukující látky

Sylvie Šťastná, Petr Chrastina, Zdeněk Čánský

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Redukující látky</b>                               |
| <b>Synonyma</b>               | Benedictova zkouška                                   |
| <b>Typ metody</b>             | semikvantitativní                                     |
| <b>Princip stanovení</b>      | Benedictova zkouška se síranem měďnatým               |
| <b>Materiál</b>               | moč   |
| <b>Preamalytické poznámky</b> | falešně pozitivní nález - vysoká koncentrovanost moče |
| <b>Jednotky:</b>              | arb. j.   |
| <b>Referenční meze:</b>       | negativní   |

V přítomnosti redukujících látek v moči se v alkalickém prostředí měďnatá sůl ( $\text{CuSO}_4$ ) po povaření zredukuje na červený oxid měďný.

Test prokazuje zvýšenou koncentraci sacharidů a jiných redukujících látek v moči, viz tabulka.

| <b>Sloučenina</b>      | <b>Příčina</b>  |
|------------------------|---|
| Glukóza                | Diabetes mellitus<br>Fanconiho syndrom                    |
| Galaktóza              | Galaktosémie – všechny typy<br>Fanconi-Bickelova choroba  |
| Fruktóza               | Hereditární intolerace fruktózy<br>Esenciální fruktosurie |
| Maltóza                | Požítí maltózy  |
| Laktóza                | Deficit laktázy<br>Kojené děti                            |
| Xylulóza               | Esenciální pentosurie<br>Test s xylulózou                 |
| Dextróza               | Požítí dextrózy   |
| 4-hydroxyfenylpyruvát  | Tyrosinémie typu I  |
| Kyselina homogentisová | Alkaptonurie  |
| Oxalát                 | Hyperoxalurie primární i sekundární                       |
| Salicyláty             | Léčba   |
| Uráty                  | Hyperurikosurie   |
| Hippurát               | Léčba benzoátem   |
| Kyselina askorbová     | Velké dávky vitamínu C                                    |

Sacharóza není redukující látka.

Pozitivní nález doplní vyšetření sacharidů, organických kyselin (kyselina homogentisová, sukcinylaceton), aminokyselin, kyseliny močové a oxalátu v moči.

Vyšetření se provádí u každého poprvé vyšetřovaného pacienta.

## Sacharidy

*Olga Martincová, Petr Chrastina, Zdeněk Čánský, Sylvie Šťastná*  
Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Název</b>                  | <b>Sacharidy</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | Glycidy  |
| <b>Typ metody</b>             | kvalitativní, profilová  |
| <b>Princip stanovení</b>      | dvourozměrná tenkovrstevná chromatografie (TLC)<br>detekce naftolresorcinolem                                    |
| <b>Materiál</b>               | moč  |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | hodnotí semikvantitativně zvýšenou koncentraci sacharidů<br>proti standardům                                     |
| <b>Jednotky</b>               | -  |
| <b>Referenční meze</b>        | chromatogram fyziologické moči má skvrny jednotlivých<br>cukrů zhruba stejné intenzity a velikosti jako standard |

**Sacharidy** (glycidy, nepřesně cukry, chybně uhlovodany nebo karbohydráty) jsou organické látky patřící do skupiny polyhydroxylovaných aldehydů nebo ketonů. Mnohé ze sacharidů jsou významné přírodní látky, řada dalších byla připravena synteticky.

V potravě se sacharidy vyskytují především ve formě disacharidů (např. laktóza, sacharóza) a polysacharidů (škrob). Tyto složky jsou ve střevě enzymaticky hydrolyzovány na monosacharidy (glukózu, galaktózu a fruktózu), které jsou resorbovány enterocyty do krve pomocí specifických transportérů.

Nejvýznamnějším monosacharidem pro lidský organismus je glukóza, která hraje významnou roli v různých metabolických procesech, zejména při tvorbě glukóza-6-fosfátu.

**Vyšetření sacharidů** se provádí jako doplňující vyšetření při průkazu redukcujících látek v moči.

**Standardní roztok obsahuje směs sacharidů laktózy, maltózy, sacharózy, D-fruktózy, D-galaktózy, D-glukózy, D-ribózy, L-arabinózy a D-xylózy.**

Mezi sacharidy, které jsou vyšetřovány, patří glukóza, galaktóza, fruktóza a laktóza.

U **dospělých** se zvýšené vylučování cukrů vyskytuje zřídka, nejčastějším nálezem je glykosurie u diabetes mellitus.

U **děti** se jedná o častější nález zvláště v důsledku alimentární meliturie. V moči kojenců a novorozenců se fyziologicky objevuje galaktóza, laktóza, sacharóza, event. stopy glukózy.

Vyšetření je důležité pro posouzení **renálních tubulárních defektů** a pro diagnostiku některých **poruch metabolismu sacharidů**.

**Z hlediska dědičných metabolických poruch (DMP)** jsou diagnosticky důležité zejména zvýšená glykosurie, galaktosurie a fruktosurie.

**Glykosurie** může být součástí laboratorního obrazu Fanconiho tubulopatie (tyrosinémie typ I, galaktosémie, hereditární intolerance fruktózy, cystinóza, některé glykogenózy, Loweho syndrom, Wilsonova choroba, poruchy respiračního řetězce) a glukózo-galaktózové malabsorpce.

**Galaktosurie** je specifickým nálezem u všech typů galaktosémie a malabsorpce glukózy a galaktózy.

**Fruktosurie** bývá u hereditární intolerance fruktózy, deficitu fruktóza-1,6-bifosfatázy, esenciální fruktosurie a u deficitu disacharidáz.

Nález jiných sacharidů je z hlediska DMP nevýznamný.

## Sfingolipidy

*Jana Ledvinová, Helena Jahnová, Milan Elleder*

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Název</b>                  | <b>Sfingolipidy</b>  |
| <b>Synonyma</b>               | -  |
| <b>Typ metody</b>             | kvalitativní, event. semikvantitativní   |
| <b>Princip stanovení</b>      | extrakce lipidů směsí chloroformu a metanolu, HPTLC, detekce orcinolem, resorcinolem, (event. densitometrie) |
| <b>Materiál</b>               | tkáň   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | autoptický materiál (játra, slezina, ledviny, mozek atd.)  |
| <b>Jednotky</b>               | -  |
| <b>Referenční meze:</b>       | negativní  |

**Sfingolipidy** jsou degradovány v lysosomech za účasti sfingohydroláz a jejich aktivačních proteinů.

**Indikací** k vyšetření je podezření na lysosomální stádavé onemocnění s hromaděním sfingolipidů, zejména pro post mortem vyšetření, kdy není k dispozici materiál ke stanovení enzymatické aktivity

**Pozitivní nález** svědčí pro lysosomální stádavé onemocnění ze skupiny sfingolipidóz.

## Siřičitany

Josef Bártil, Eva Košťálová, Sylvie Šťastná

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Název</b>                  | <b>Siřičitany</b>  |
| <b>Synonyma</b>               | sulfity  |
| <b>Typ metody</b>             | semikvantitativní  |
| <b>Princip stanovení</b>      | diagnostický papírek Sulfitest Merck   |
| <b>Materiál</b>               | moč  |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | siřičitany jsou nestabilní, test je nutno provést v čerstvé moči<br>přítomnost kys. askorbové ruší stanovení<br>v nedostatečně koncentrované moči (koncentrace kreatininu<br>pod 1 mmol/l) není vyšetření spolehlivé |
| <b>Jednotky</b>               | mg/l   |
| <b>Referenční meze:</b>       | negativní  |

**Sulfitoxidáza** katalyzuje poslední krok v oxidaci atomu síry cysteinu na anorganický sulfát.

**Deficit sulfitoxidázy** vede ke hromadění sulfitů spolu s jejich degradačními produkty S-sulfocysteinem a thiosulfátem, se sníženou tvorbou sulfátů.

**Indikací** k vyšetření je podezření na **deficit sulfitoxidázy, izolovaný nebo při deficitu molybdenového kofaktoru** (novorozenecké nebo kojenecké křeče refrakterní na léčbu antiepileptiky, těžká psychomotorická retardace, mikrocefalie, hypotonie s přechodem do hypertonie, neospívání, dislokace čočky, časná smrt).

Vyšetření se provádí u každého poprvé vyšetřovaného pacienta.

### Interpretace

**Positivní** nález (zvýšená koncentrace siřičitanů v moči) - deficit sulfitoxidázy a deficit molybdenového kofaktoru.

**Falešně pozitivní** - různé léky (např. 2-merkaptosulfonát) a jiné příčiny, které vedou ke zvýšené koncentraci močových siřičitanů, staré vzorky moči.

**Falešně negativní** – při nízké koncentrovanosti moče (koncentrace kreatininu < 1 mmol/l).

**Negativní** výsledek nevylučuje deficit sulfitoxidázy.

viz též Thiosírany kvantitativně

## Sukcinylaceton fotometricky

Sylvie Šťastná, Zdeněk Čánský, Eva Košťálová, Petr Chrastina  
Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Sukcinylaceton fotometricky</b>  |
| <b>Synonyma</b>               | -   |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní   |
| <b>Princip stanovení</b>      | enzymatické fotometrické stanovení, 555 nm, inhibiční metoda, $\delta$ -aminolevulinát-hydratáza, Ehrlichovo činidlo        |
| <b>Materiál</b>               | moč   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | se stanovením může interferovat řada Ehrlich-pozitivních látek, ale vzhledem ke značnému zředění moči je jejich vliv omezen |
| <b>Jednotky</b>               | $\mu\text{mol/l}$   |
| <b>Referenční meze</b>        | < 2,0   |

**Sukcinylaceton** a jiné intermediární metabolity v katabolismu tyrosinu se hromadí nad blokem u tyrosinémie typu I a mají závažné patogenní účinky na tkáň, zvláště na funkci jater.

Sukcinylaceton je významný inhibitor 5-aminolevulinátdehydratázy (porfobilinogensyntázy). Hromadící se 5-aminolevulinát je neurotoxický a je pravděpodobně příčinou akutních neurologických krizí při dekompenzaci tyrosinémie typu I.

### Indikací k vyšetření je

1. podezření na tyrosinémii typu I.
2. monitorování kompenzace u pacientů s tyrosinémií typu I léčených NTBC
3. ověření nálezu zvýšeného vylučování sukcinylacetonu v rámci vyšetření organických kyselin v moči.

Zvýšené vylučování sukcinylacetonu v moči je **nález specifický pro tyrosinémii I. typu** z deficitu fumarylacetoacetázy (FAA).

Je vhodné nález ověřit vyšetřením sukcinylacetonu v rámci vyšetření organických kyselin v moči.

Tyrosinémie typu I musí být potvrzena enzymatickým nebo molekulárně genetickým vyšetřením.

Je známa mutace s pseudodeficitem FAA.

## Sukcinylaminoimidazolkarboxamidribosid (SAICAr)

*Sylvie Šťastná, Josef Bárta, Eva Košťálová*

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. UK Praha

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Název</b>                  | <b>Sukcinylaminoimidazolkarboxamidribosid (SAICAr)</b>   |
| <b>Synonyma</b>               |  |
| <b>Typ metody</b>             | kvalitativní   |
| <b>Princip stanovení</b>      | TLC, detekce Paulyho činidlem  |
| <b>Materiál</b>               | moč  |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | při pokojové teplotě je nestabilní, moč nutno uchovávat zamraženou<br>vylučování během dne kolísá, nejvyšší vylučování je v ranní moči<br>riziko falešně negativního nálezu v alkalické moči a při nízké koncentrovanosti moče |
| <b>Jednotky</b>               | -  |
| <b>Referenční meze</b>        | negativní  |

**SAICAr** je intermediární metabolit v de novo syntéze v purinovém metabolismu. Hromadí se v tkáních a vylučuje se ve zvýšeném množství při deficitu adenylosukcinátlyázy (adenylosukcináza, ADSL).

Vyšetření se provádí při **podezření na adenylosukcinátlyázy (ADSL)** - psychomotorická retardace, autistické rysy, křeče, hypotonie, ataxie

Nález je specificky pozitivní u deficitu ADSL.

## Sulfatidy

Helena Poupětová, Helena Jahnová, Milan Elleder  
Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Sulfatidy</b>  |
| <b>Synonyma</b>               | -   |
| <b>Typ metody</b>             | kvalitativní, event. semikvantitativní  |
| <b>Princip stanovení</b>      | extrakce směsí chloroformu a metanolu, HPTLC, detekce orcinolem, kreslyovou violetí, azurem A |
| <b>Materiál</b>               | celý sběr moče/24 h   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | -   |
| <b>Jednotky</b>               | -   |
| <b>Referenční meze</b>        | negativní   |

**Sulfatidy (sulfátované glykolipidy)** jsou hlavní lipidovou složkou myelinové pochvy. Sulfatidy jsou degradovány za účasti arylsulfatázy A, která tvoří komplex s proteinovým aktivátorem saposinem B (sap-B, dříve SAP1).

**Diferenciální diagnostika zvýšeného vylučování sulfatidů v moči** zahrnuje tyto poruchy:

1. metachromatická leukodystrofie (MLD) s deficitem arylsulfatázy A
2. mnohočetný deficit sulfatáz (MSD, Austinova choroba) - v moči prokážeme též zvýšené vylučování mukopolysacharidů
3. deficit saposinu B
4. deficit prosaposinu (prekursor saposinů A,B,C,D) – je normální aktivita arylsulfatázy A in vitro, v moči je kromě sulfatidů též zvýšené vylučování globotriaosylceramidu, viz též Globotriaosylceramid

V klinickém obraze všech uvedených poruch dominuje neurologické postižení.

Sulfatidy se hromadí v centrálním a periferním nervovém systému s následnou destrukcí myelinu a demyelinizací.

Zdrojem sulfatidů v moči jsou tubulární buňky ledvin.

Diagnóza musí být vždy potvrzena cíleným enzymatickým a/nebo molekulárně genetickým vyšetřením.

Jsou známy 2 polymorfismy, které jsou příčinou pseudodeficitu arylsulfatázy A.

## Tandemová hmotnostní spektrometrie - aminokyseliny a acylkarnitiny v krvi

*Petr Chrastina, Sylvie Šťastná, Eva Košťálová*

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Název</b>                  | <b>Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)<br/>aminokyseliny a acylkarnitiny v krvi</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | -  |
| <b>Typ metody</b>             | screeningová, profilová, kvantitativní   |
| <b>Princip stanovení</b>      | MS/MS, extrakce do methanolu, butylace, kvantifikace pomocí deuterovaných vnitřních standardů  |
| <b>Materiál</b>               | krevní papírek   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | pokud pacient dostal transfuzi plné krve nebo erymasy, doporučujeme kontrolní vyšetření z nového vzorku odebraného tři měsíce po poslední transfuzi<br>při opakovaných transfuzích doporučujeme kontrolní vyšetření před další transfuzí |
| <b>Jednotky</b>               | μmol/l, poměry koncentrací acylkarnitinů bez rozměru   |
| <b>Referenční meze</b>        | podle interních norem  |

**Tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS)** je výkonná analytická metoda, která se používá ke stanovení koncentrací některých aminokyselin a acylkarnitinů a během jediného vyšetření slouží k diagnostice vybraných aminoacidopatií, organických acidurií a poruch oxidace mastných kyselin.

Součástí hodnocení je výpočet poměrů koncentrací aminokyselin a acylkarnitinů.

Vyšetření se provádí u každého poprvé vyšetřovaného pacienta.

Vyšetření je vhodné pro novorozenecký screening uvedených DMP.

**Indikací k vyšetření jsou:**

- 1. susp. poruchy metabolismu aminokyselin**  
hyperfenylalaninémie, hypertyrosinémie, leucinóza
- 2. susp. organické acidurie se zvýšeným vylučováním specifických acylkarnitinů**  
glutarová acidurie I. typu, metylmalonová acidémie, propionová acidémie, isovalerová acidémie, deficit  $\beta$ -ketothiolázy, deficit 3-metylkrotonyl-CoA-karboxylázy, 3-hydroxy-3-metylglutarová acidurie
- 3. poruchy oxidace mastných kyselin se zvýšeným vylučováním specifických acylkarnitinů**  
deficit karnitinacylkarnitintranslokázy, deficit SCAD, MCAD, LCHAD, VLCAD, glutarová acidurie typu II, deficit CPT I a CPT II

**Hodnocení**

**Pozitivní nález** (zvýšená koncentrace aminokyselin nebo acylkarnitinů, zvýšený poměr aminokyselin nebo acylkarnitinů) - susp. porucha metabolismu aminokyselin nebo organická acidurie nebo porucha oxidace mastných kyselin.

**Artefakty a nespecifické odchylky** – MCT nebo olej ve stravě, ketogenní dieta, hladovění, ketosa, laktátová acidóza, podávání valproátu, karnitinu, benzoátu, hepatopatie, dialýza, syndrom krátkého střeva.

**Riziko falešně negativního nálezu** – u intermitentních forem některých uvedených DMP (je nutné vyšetření zopakovat v akutní atace) a po transfuzi krve nebo erymasy.

## Thiosírany kvalitativně

Josef Bártl, Eva Košťálová, Sylvie Šťastná

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Thiosírany kvalitativně</b>  |
| <b>Synonyma</b>               | thiosulfáty   |
| <b>Typ metody</b>             | kvalitativní  |
| <b>Princip stanovení</b>      | orientační test s azidem sodným a jodem   |
| <b>Materiál</b>               | moč   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | v nedostatečně koncentrované moči (koncentrace kreatininu pod 1 mmol/l) není vyšetření spolehlivé<br>nadbytek kys. askorbové ruší stanovení |
| <b>Jednotky</b>               | arb. j.   |
| <b>Referenční meze:</b>       | negativní   |

**Sulfitoxidáza** katalyzuje poslední krok v oxidaci atomu síry cysteinu na anorganický sulfát.

**Deficit sulfitoxidázy** vede ke hromadění sulfitů spolu s jejich degradačními produkty S-sulfocysteinem a **thiosulfátem**, se sníženou tvorbou sulfátů.

**Indikací** k vyšetření je podezření na **deficit sulfitoxidázy, izolovaný nebo při deficitu molybdenového kofaktoru** (novorozenecké nebo kojenecké křeče refrakterní na léčbu antiepileptiky, těžká psychomotorická retardace, mikrocefalie, hypotonie s přechodem do hypertonie, neospívání, dislokace čočky, časná smrt).

Vyšetření se provádí u každého poprvé vyšetřovaného pacienta.

### Interpretace

**Positivní** nález (zvýšená koncentrace thiosíranů v moči) – susp. deficit sulfitoxidázy a deficit molybdenového kofaktoru.

V případě pozitivního výsledku je nutno provést kvantitativní stanovení thiosíranů.

**Falešně pozitivní** - různé léky (např. 2-merkaptotansulfonát) a jiné příčiny, které vedou ke zvýšené koncentraci thiosíranů v moči, staré vzorky moči.

**Falešně negativní** – při nízké koncentrovanosti moče (koncentrace kreatininu < 1 mmol/l).

**Negativní** výsledek nevylučuje deficit sulfitoxidázy.

viz též Siřičitany, Thiosírany kvantitativně

## Thiosírany kvantitativně

Josef Bártil, Eva Košťálová, Sylvie Šťastná

Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Thiosírany kvantitativně</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | thiosulfáty   |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní   |
| <b>Princip stanovení</b>      | thiosíran vytváří s kyanidem a železitými ionty barevný rhodanid  |
| <b>Materiál</b>               | moč   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | v nedostatečně koncentrované moči (koncentrace kreatininu pod 1 mmol/l) není vyšetření spolehlivé<br>ampicilin a salicyláty (vč. paracetamolu) ruší stanovení |
| <b>Jednotky</b>               | mmol/mol kreatininu   |
| <b>Referenční meze</b>        | negativní   |

**Sulfitoxidáza** katalyzuje poslední krok v oxidaci atomu síry cysteinu na anorganický sulfát.

**Deficit sulfitoxidázy** vede ke hromadění sulfitů spolu s jejich degradačními produkty S-sulfocysteinem a **thiosulfátem**, se sníženou tvorbou sulfátů.

**Indikací** k vyšetření je podezření na **deficit sulfitoxidázy, izolovaný nebo při deficitu molybdenového kofaktoru** (novorozenecké nebo kojenecké křeče refrakterní na léčbu antiepileptiky, těžká psychomotorická retardace, mikrocefalie, hypotonie s přechodem do hypertonie, neospívání, dislokace čočky, časná smrt).

Vyšetření se provádí u každého poprvé vyšetřovaného pacienta.

### Interpretace

**Positivní** nález (zvýšená koncentrace thiosíranů v moči) – susp. deficit sulfitoxidázy a deficit molybdenového kofaktoru.

V případě pozitivního výsledku je nutno provést kvantitativní stanovení thiosíranů.

**Falešně pozitivní** - různé léky (např. 2-merkaptosulfonát) a jiné příčiny, které vedou ke zvýšené koncentraci thiosíranů v moči, staré vzorky moči.

**Falešně negativní** – při nízké koncentrovanosti moče (koncentrace kreatininu < 1 mmol/l), ampicilin, salicyláty (vč. paracetamolu)

**Negativní** výsledek nevylučuje deficit sulfitoxidázy.

viz též Siřičitany

## Velmi dlouhé mastné kyseliny a kyselina fytanová

Zdeněk Čánský, Eva Košťálová, Sylvie Šťastná, Petr Chrastina  
Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>Název</b>                  | <b>Velmi dlouhé mastné kyseliny a kyselina fytanová</b>   |
| <b>Synonyma</b>               | VLCFA   |
| <b>Typ metody</b>             | kvantitativní, profilová  |
| <b>Princip stanovení</b>      | GC, extrakce do hexanu, methylesterifikace, vnitřní standard C <sub>15</sub> a C <sub>27</sub>    |
| <b>Materiál</b>               | sérum   |
| <b>Preanalytické poznámky</b> | vyšetření nelze provést z hemolytického séra<br>stanovuje kyseliny volné i vázané ve formě lipidů |
| <b>Jednotky</b>               | μg/ml   |
| <b>Referenční meze</b>        | kys. fytanová < 3,5   |
|                               | kys. pristanová < 0,65  |
|                               | C <sub>26</sub> < 0,50  |
|                               | C <sub>26</sub> /C <sub>22</sub> < 0,021  |
|                               | C <sub>24</sub> /C <sub>22</sub> < 1,000  |

**Vyšetření velmi dlouhých mastných kyselin (VLCFA) v séru** je základní metoda pro diagnostiku peroxisomálních poruch.

Stanovuje se kyselina behenová C<sub>22:0</sub>, lignocerotová C<sub>24:0</sub>, cerotová C<sub>26:0</sub> a kyselina fytanová.

**Indikací** pro vyšetření VLCFA je podezření na vybraná peroxisomální onemocnění (generalizované peroxisomální poruchy, X-vázanou adrenoleukodystrofií a Refsumovu chorobu):

- příznaky neurologické (encefalopatie, hypotonie, křeče, periferní neuropatie, poruchy chůze),
- oční (retinopatie, slepota, katarakta),
- hepatální dysfunkce (hepatomegalie, hepatopatie, cholestasa),
- kraniofaciální dysmorfie a kostní abnormality

Ostatní peroxisomální poruchy nelze touto metodou diagnostikovat.

### Interpretace

#### zvýšená koncentrace VLCFA

generalizované poruchy peroxisomální biogeneze (Zellwegerův syndrom, neonatální adrenoleukodystrofie, infantilní Refsumova nemoc, deficit acyl-CoA oxidázy, deficit D-bifunkčního proteinu)

X-vázaná adrenoleukodystrofie

heterozygotky X-ALD mohou mít normální koncentrace VLCFA

**zvýšená koncentrace kyseliny fytanové** – klasická Refsumova choroba, rhisomelická chondrodysplasia punctata typu 1 (RCDP typu 1) a poruchy peroxisomální biogeneze

novorozenci a kojenci s RCDP typu 1 a poruchami peroxisomální biogeneze a pacienti s enzymatickými defekty v odbourávání VLCFA mohou mít koncentrace kyseliny fytanové v normě

Sylvie Šťastná a kol.

**Přehled vyšetření metabolitů pro diagnostiku dědičných metabolických poruch**

1. vydání Praha 2008, 92 stran

Vydal Ústav dědičných metabolických poruch VFN a 1. LF UK Praha

Vytiskla Tiskárna Edit, spol. s r. o.

ISBN 978-80-904219-0-5