

# Kratka analitička validacija metode za određivanje homocisteina iz plazme primjenom tandemске spektrometrije masa

---

Friščić, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:163:420577>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-21**



Repository / Repozitorij:

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



Iva Frišćić

**Kratka analitička validacija metode za  
određivanje homocisteina iz plazme primjenom  
tandemske spektrometrije masa**

**DIPLOMSKI RAD**

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2018.

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

# SADRŽAJ

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. UVOD .....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1. Aminokiseline .....   | 1         |
| 1.1.1. Homocistein.....  | 2         |
| 1.2. Nasljedni metabolički poremećaji.....                           | 7         |
| 1.2.1. Poremećaji metioninskog ciklusa .....                         | 8         |
| 1.3. Kratka analitička validacija kvantitativnih metoda.....         | 10        |
| 1.4. Tandemska spektrometrija masa.....                              | 12        |
| <b>2. OBRAZLOŽENJE TEME.....</b>                                     | <b>15</b> |
| <b>3. MATERIJALI I METODE .....</b>                                  | <b>16</b> |
| 3.1. Nefelometrija .....   | 16        |
| <u>Materijali</u> .....  | 16        |
| <u>Metoda</u> .....  | 16        |
| 3.2. Tandemska spektrometrija masa.....                              | 18        |
| <u>Materijali</u> .....  | 18        |
| <u>Metoda</u> .....  | 19        |
| 3.3. Statistička obrada podataka.....                                | 24        |
| a) Preciznost .....  | 24        |
| b) Točnost.....  | 26        |
| c) Linearnost.....   | 26        |
| d) Usporedivost.....   | 27        |
| <b>4. REZULTATI.....</b>   | <b>29</b> |
| 4.1. Procjena preciznosti, točnosti i linearnosti .....              | 29        |
| 4.1.1. Procjena preciznosti.....                                     | 29        |
| 4.1.2. Procjena točnosti.....  | 30        |
| 4.1.3. Procjena linearnosti .....                                    | 31        |
| 4.2. Usporedivost tandemske spektrometrije masa i nefelometrije..... | 32        |
| 4.2.1. Dijagram raspršenja.....                                      | 34        |
| 4.2.2. Grafički prikaz razlike između dobivenih mjerenja .....       | 35        |
| 4.2.3. Passing-Bablokova regresijska analiza.....                    | 37        |
| <b>5. RASPRAVA .....</b>   | <b>39</b> |
| <b>6. ZAKLJUČAK .....</b>  | <b>42</b> |
| <b>7. LITERATURA.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>8. SAŽETAK/SUMMARY.....</b>                                       | <b>47</b> |

## POPIS KRATICA

- BHMT – betain homocistein metiltransferaza (engl. *betaine homocysteine methyltransferase*)
- CBS – cistationin- $\beta$ -sintaza (engl. *cystathionine beta-synthase*)
- CLSI – Klinički i laboratorijski institut za standarde (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*)
- CI – interval pouzdanosti (engl. *confidence interval*)
- CTH – cistationin- $\gamma$ -liaza (engl. *cystathionine gamma-lyase*)
- CNS – središnji živčani sustav (engl. *central nervous system*)
- eNOS – endotelna sintaza dušikova oksida (engl. *endothelial nitric oxide synthase*)
- ESI – elektrosprej ionizacija (engl. *electrospray ionisation*)
- GC-MS – plinska kromatografija spektrometrija masa (engl. *gas chromatography mass spectrometry*)
- HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*)
- HR EN ISO – hrvatska norma prema europskoj i međunarodnoj organizaciji za standardizaciju
- $K_v$  – koeficijent varijacije (engl. *variation coefficient*)
- LC-MS/MS – tandemska spektrometrija masa (engl. *tandem mass spectrometry*)
- MAT – L-metionin-S-adenoziltransferaza (engl. *L-methionine adenosyl transferase*)
- MetRS – metionil tRNA sintetaza (engl. *methionyl-tRNA synthetase*)
- MS – metionin sintaza (engl. *methionine synthase*)
- MSR – metionin sintaza reduktaza (engl. *methionine synthase reductase*)
- MTHFR – 5,10-metilentetrahidrofolat reduktaza (engl. *5,10-methylenetetrahydrofolate reductase*)
- NO – dušikov oksid (engl. *nitrogen oxide*)
- $s$  – standardna devijacija (engl. *standard deviation*)
- SAH – S-adenozilhomocistein (engl. *S-adenosylhomocysteine*)
- SAM – S-adenozilmetionin (engl. *S-adenosylmethionine*)
- UPLC – tekućinska kromatografija ultra-visoke djelotvornosti (engl. *ultra-performance liquid chromatography*)

# 1. UVOD

## 1.1. Aminokiseline

Aminokiseline su organske molekule koje se sastoje od centralnog,  $\alpha$ -ugljkovog atoma na koji su vezani karboksilna skupina, amino-skupina, vodikov atom i bočni lanac „R“, organska funkcionalna skupina koja je specifična za pojedinu aminokiselinu i određuje njezina kemijska svojstva. Kod svih aminokiselina osim glicina, najjednostavnije aminokiseline,  $\alpha$ -ugljkov atom je asimetričan, odnosno čini kiralni centar. Aminokiseline su stoga optički aktivne molekule koje postoje kao L- i D-enantiomeri koji imaju jednaka fizikalno-kemijska svojstva, no različitu biološku aktivnost i rasprostranjenost u prirodi – u sastav humanih proteina ulaze samo L-enantiomeri, dok su D- prisutni u biljkama, bakterijskoj staničnoj stijenci i nekim antibioticima (Dołowy i Pyka, 2014). Zbog prisustva kisele karboksilne i bazične amino-skupine aminokiseline su amfoterni spojevi – u kiseljoj sredini amino-skupina prima vodikov ion i aminokiselina se nalazi u kationskom obliku, dok u alkalnoj sredini vodikov ion disocira s karboksilne skupine i ona se nalazi u anionskom obliku. U neutralnoj vodenoj otopini disociraju obje skupine i aminokiselina se nalazi u dipolarnom, *zwitterionskom* obliku. pH vrijednost pri kojoj se aminokiselina nalazi u takvom obliku naziva se izoelektrična točka, a njezina vrijednost ovisi o kemijskoj strukturi bočnog ogranka prema kojoj se aminokiseline mogu podijeliti na neutralne, kisele i bazične (Berg i sur., 2013a; Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009a).

Od 2000 dosad poznatih aminokiselina, tristotinjak ih se nalazi u živom svijetu, a 20 ulazi u sastav proteina (tzv. proteogene aminokiseline) (Murray i sur., 2011). One se dijele na esencijalne, koje čovjek mora unositi putem prehrane, i neesencijalne, koje se sintetiziraju u organizmu procesom transaminacije. Transaminacijom se amino-skupina prenosi na ketokiselinu pri čemu aminokiselina koja je donor amino-skupine postaje ketokiselina i obratno, ketokiselina koja je primila amino-skupinu postaje aminokiselina. Taj proces igra ključnu ulogu u metabolizmu aminokiselina i povezuje metabolizam proteina, ugljikohidrata i lipida. Ketokiseline iz aminokiselina mogu nastati i oksidativnom deaminacijom, a dekarboksilacijom iz aminokiselina nastaju odgovarajući amini (Berg i sur., 2013b; Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009a).

Klinički je značajno određivanje aminokiselina u plazmi, likvoru i mokraći s ciljem postavljanja dijagnoza i praćenja tijeka liječenja nasljednih i stečenih metaboličkih poremećaja. U većini laboratorija primjenjuju se orijentacijske metode kao što su tankoslojna

kromatografija, test s ferikloridom, nitroprusidom ili nitrozonafitolom i pregled mokraćnog sedimenta. One daju kvalitativan rezultat koji upućuje kliničara na povećanu koncentraciju aminokiselina u uzorku što zahtijeva daljnju obradu potvrdnim, kvantitativnim metodama. Najčešće potvrdne metode su fluorometrija, ionsko-izmjenjivačka kromatografija i tandemna spektrometrija masa (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009b).

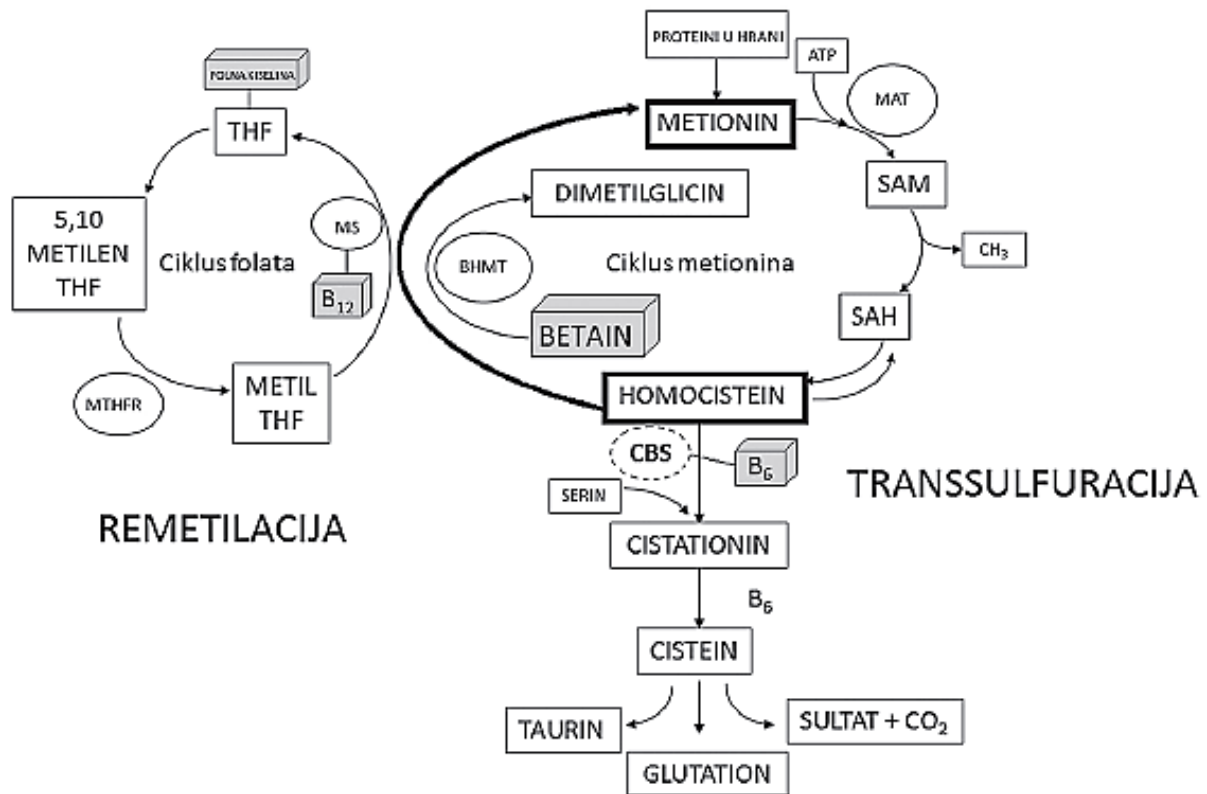
### 1.1.1. Homocistein

Homocistein je aminokiselina koja sadrži sumpor, strukturno srodna metioninu i cisteinu. Ne unosi se putem hrane već sav nastaje u metioninskom ciklusu, metaboličkom putu metionina, esencijalne aminokiseline koja je ujedno i jedini izvor homocisteina u organizmu. Metionin se aktivira djelovanjem enzima L-metionin-S-adenoziltransferaze (MAT) u reakciji ovisnoj o ATP-u, magnezijevim i kalijevim ionima pri čemu nastaje S-adenozilmetionin (SAM). Reakcija je ovisna o unutarstaničnoj koncentraciji SAM-a, tj. o metilacijskom kapacitetu stanice. Naime, SAM je jedan od najznačajnijih donora metilne skupine u ljudskom organizmu što je posljedica pozitivnog naboja na sumporovom atomu molekule na koji je vezana metilna skupina – ona se lako otpušta i prenosi na niz različitih akceptorskih supstrata kao što su nukleinske kiseline, proteini, neurotransmitori, fosfolipidi i mijelin. Pritom nastaje S-adenozilhomocistein (SAH) koji se vrlo brzo hidrolizira djelovanjem hidrolaza uz nastanak adenzina i homocisteina. Ta je reakcija hidrolize reverzibilna, a u organizmu je favorizirana obrnuta reakcija. Daljnji metabolički put ovisi o potrebama stanice i unosu metionina, a moguće su reakcije transulfuracija i remetilacija.

Ukoliko su unutarstanične koncentracije metionina dostatne odvija se transulfuracija, ireverzibilna razgradnja homocisteina u cistein. Prvi korak odvija se uz enzim cistation- $\beta$ -sintazu (CBS) kojem je kao kofaktor potreban vitamin B6, a katalizira kondenzaciju homocisteina i serina u cistationin. U drugom koraku, koji je kataliziran cistationin- $\gamma$ -liazom (CTH), cistationin se hidrolizira u cistein i  $\alpha$ -ketobutirat. Cistein se daljnjim metaboličkim koracima prevodi u taurin, sultat ili glutation, najznačajniji stanični redoks pufer koji štiti stanice od oksidativnog stresa.

Remetilacijom homocisteina obnavljaju se unutarstanične zalihe metionina. Reakciju katalizira enzim metionin sintaza (MS) čiji je kofaktor vitamin B12, a najznačajniji donor metilne skupine je 5-metiltetrahydrofolat. On nastaje djelovanjem enzima 5,10-metilentetrahydrofolat reduktaze (MTHFR) iz 5,10-metilentetrahydrofolata nastalog iz

tetrahidrofolata, derivata folne kiseline (vitamina B9) (Cybulska i Klosiewicz-Latoszek, 2015; Blom i Smulders, 2011; Bolander-Gouaille, 2001). U manjoj mjeri donor metilne skupine može biti i betain djelovanjem enzima betain homocistein metiltransferaze (BHMT), no te su reakcije uglavnom ograničene na jetru i bubrege i većina je tkiva, uključujući CNS, u potpunosti ovisna o remetilaciji putem MS-a (Kumar i sur., 2017).

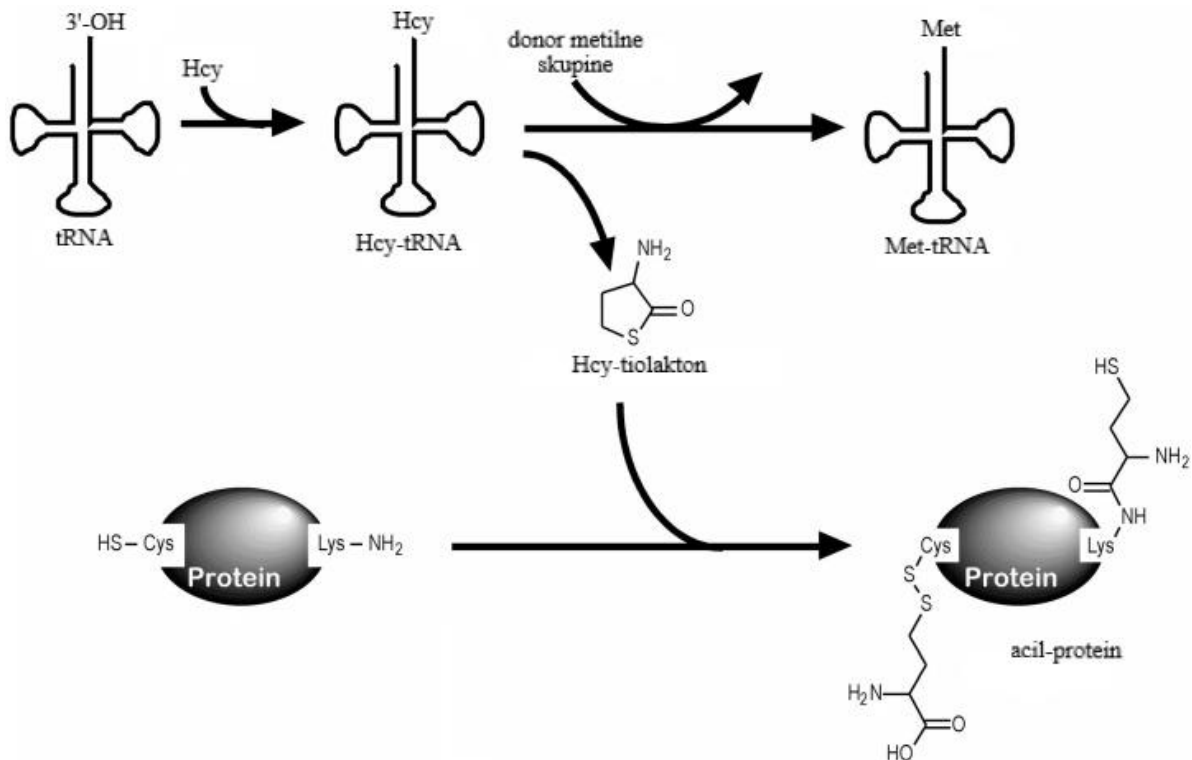


Slika 1: Metioninski ciklus (preuzeto i prilagođeno prema Muačević-Katanec i sur., 2014)

Zbog strukturne sličnosti s metioninom u nekim slučajevima homocistein umjesto njega ulazi u biosintezu proteina putem enzima metionil tRNA sintetaze (MetRS). Pritom dolazi do greške u biosintezi koja se ispravlja ciklizacijom homocisteina u homocistein tiolakton, toksični metabolit čija je koncentracija proporcionalna ukupnoj koncentraciji homocisteina u plazmi. Toksičnost se temelji na posttranslacijskoj modifikaciji proteina plazme, napose albumina, hemoglobina, LDL-a i  $\gamma$ -globulina, stvaranjem adukata izopeptidnim vezanjem na lizinske i cisteinske rezidue. Dolazi do promjene strukture i funkcije zahvaćenih proteina i produkcije novih antigena koji pokreću autoimuni upalni proces koji rezultira staničnom smrću zahvaćenih stanica. Uslijed interakcije s LDL-om dolazi i do povećanja njegove gustoće i unosa u



makrofage što pospješuje nastanak pjenastih stanica (Kumar i sur., 2017; Jakubowski, 2004; Undas i sur., 2004).



*Slika 2: Nastanak homocistein tiolaktona i vezanje na proteine (preuzeto i prilagođeno prema Medina i sur., 2001)*

U plazmi se samo oko 1% homocisteina nalazi u slobodnom, reduciranom, sulfhidrilnom obliku, a 99% se nalazi u oksidiranom obliku, u obliku homocistein-disulfida, miješanog disulfida ili vezano za plazmatske proteine, primarno albumin. Metabolizam je vrlo brz i svi se oblici filtriraju, reapsorbiraju i razgrađuju u bubrezima. Zbog svoje nestabilnosti se ne akumulira u plazmi jer se, kada je u suvišku, autooksidira u homocistin (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009c). Referentni interval iznosi do 15  $\mu\text{mol/L}$ . Vrijednosti do 30  $\mu\text{mol/L}$  se smatraju umjereno povišenima i najčešće su uzrokovane deficitom vitamina koji su kao kofaktori uključeni u metioninski ciklus (vitamini B6, B9 i B12); vrijednosti između 31 i 100  $\mu\text{mol/L}$  uzrokovane su kroničnim bubrežnim oštećenjem ili heterozigotnom mutacijom nekog od enzima uključenih u metioninski ciklus, najčešće MTHFR-a, dok su vrijednosti iznad 100  $\mu\text{mol/L}$  uzrokovane homozigotnom mutacijom MTHFR-a ili CBS-a (Cybulska i Klosiewicz-Latoszek, 2015). Epidemiološkim ispitivanjima utvrđeno je da niže plazmatske koncentracije imaju osobe mlađe životne dobi, žene i trudnice, a osim nasljednih čimbenika na povišenje koncentracije mogu utjecati i bubrežne i maligne bolesti, poremećaji vezivnog tkiva,

hipertenzija, hipotiroidizam, dijabetes, prehrana i uzimanje nekih lijekova kao što su kolestiramin, metformin, metotreksat, L-dopa, ciklosporin i androgeni (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009c).

Povišena plazmatska koncentracija homocisteina kao neovisan faktor rizika sudjeluje u patogenezi niza bolesti kao što su kardiovaskularne bolesti u čijoj je podlozi ateroskleroza, neurodegenerativne bolesti kao što su demencija, Alzheimerova i Parkinsonova bolest, defekti neuralne cijevi i preeklampsija, osteoporoza, kronično zatajenje bubrega, hipotiroidizam, dijabetes i inzulinska rezistencija (Kumar i sur., 2017). Temelj vaskularnih bolesti uzrokovanih hiperhomocisteinijom je uzrokovanje endotelne disfunkcije, odnosno disbalansa između endotelne proizvodnje vazodilatatornih i vazokonstriktornih čimbenika uslijed smanjenja koncentracije dušikovog oksida (NO). Sulfhidrilna skupina homocisteina izrazito je reaktivna i lako se oksidira kako bi se mogle stvoriti disulfidne veze s drugim tiolnim skupinama u organizmu. Tijekom te reakcije kao nusprodukt nastaju superoksidni radikali koji reagiraju s NO uz nastanak peroksinitrita (Tyagi i sur., 2005), proupalne reaktivne dušikove vrste koja između ostalog dovodi do oksidacije proteina, lipidne peroksidacije, oštećenja DNA, apoptoze uslijed uzrokovanja disfunkcije mitohondrija i inhibira aktivnost nekih enzima (Pacher i sur., 2007). Homocistein također dovodi i do inhibicije endotelne sintaze dušikova oksida (eNOS) i kompetitivno interferira s transportom L-arginina, njezinim supstratom (Kumar i sur., 2017). Zbog djelovanja homocistein tiolaktona na endoplazmatski retikulum endotelnih stanica uzrokovanjem stalnog unutarstaničnog stresa dolazi do njihove apoptoze i stvarnog gubitka intaktnog endotela što je potvrđeno nalazom cirkulirajućih apoptotskih endotelnih stanica u bolesnika s hiperhomocisteinijom (Lai i Kan, 2015). Uslijed oštećenja intaktnosti endotela povećava se permeabilnost za makromolekule, uključujući LDL lipoproteine koji se oksidiraju u subendotelnom prostoru i bivaju fagocitirani od strane makrofaga putem *scavenger* receptora; ekspresija tih receptora ne ovisi o unutarstaničnom sadržaju te makrofagi nastavljaju fagocitirati LDL čestice dok ne bivaju njima prepunjeni i nastaju tzv. spužvaste stanice koje čine masnu prugu, prvi morfološki prepoznatljiv znak ateroskleroze. Spužvaste stanice proizvode upalne medijatore i citokine koji potiču proliferaciju stanica glatkog mišićja iz medije u intimu krvne žile i kemokine koji potiču nakupljanje makrofaga na mjestu upale. Adheziju makrofaga pospješuje i hiperhomocisteinijom uzrokovano povećanje ekspresije E- i P-selektina i VCAM-1 (engl. *vascular cell adhesion molecule 1*) (Kumar i sur., 2017). Daljnjim upalnim procesom masna se pruga razvija do fibroznog plaka koji, uslijed izloženosti struji krvi zbog poremećaja kontinuiteta endotela, reagira s trombocitima što dovodi do tromboze. Ruptura fibroznog plaka i tromboza su komplikacije ateroskleroze koje u konačnici dovode do

nestabilnog koronarnog sindroma ili akutnog infarkta miokarda (Topić i sur., ur., 2004). Usljed hiperhomocisteinemije dolazi i do promjena propusnosti krvno-moždane barijere i poremećaja mikrocirkulacije u mozgu što rezultira oštećenjem neurona. Oštećenje dopaminergičkih neurona u supstanciji nigri uzrokuje simptome parkinsonizma, a oksidativni stres dugoročno dovodi i do oštećenja bijele tvari i atrofije mozga što rezultira smanjenjem kognitivnih funkcija i demencijom. Također je utvrđeno da bolesnici s povišenim plazmatskim koncentracijama homocisteina imaju i veću koncentraciju tau-proteina i fosforiliranog tau-proteina u plazmi što upućuje na formiranje  $\beta$ -amiloidnih plakova u mozgu i razvoj Alzheimerove bolesti (Kumar i sur., 2017; Ganguly i Alam, 2015). Vaskularna komponenta nepovoljnog djelovanja hiperhomocisteinemije izražena je i tijekom trudnoće – narušena je vaskularizacija posteljice što može dovesti do niza komplikacija kao što su učestali pobačaji, preeklampsija i smanjena porođajna masa djeteta (Topić i sur., ur., 2004). Hiperhomocisteinemija dovodi i do promjene opsega metilacije DNA tijekom embriogeneze što može prouzročiti niz kongenitalnih malformacija kao što su spina bifida, rascjep usne ili nepca i Downov sindrom, nastao uslijed hipermetilacije nuklearne, a hipometilacije mitohondrijske DNA (Iacobazzi i sur., 2014).

Osim za procjenu rizika za nastanak ateroskleroze i aterotromboze koronarnih, moždanih i perifernih krvnih žila te utvrđivanje nasljedne metaboličke bolesti homocistinurije, određivanje koncentracije ukupnog homocisteina klinički je značajno i za utvrđivanje deficita folata i vitamina B12 te praćenja terapije prilikom njihove primjene (Topić i sur., ured., 2004). Najbolji uzorak za određivanje je plazma. Trebala bi biti izdvojena iz uzorka uzetog ujutro natašte pošto obrok bogat proteinima povećava vrijednost za 15-20%. Zbog oslobađanja iz eritrocita uzorak se odmah nakon vađenja mora staviti na led kako bi se zaustavio njihov metabolizam i centrifugirati unutar jednog sata. Koncentracija ukupnog homocisteina (slobodnog i onog vezanog za proteine) je osjetljiviji dijagnostički parametar hiperhomocisteinemije od koncentracije slobodnog homocisteina, pa sve metode uključuju redukcijski stupanj u kojem dolazi do cijepanja disulfidnih veza. Najčešće korištene metode su tandemaska spektrometrija masa (LC-MS/MS), plinska kromatografija spektrometrija masa (GC-MS), HPLC s elektrokemijskom ili fluorescentnom detekcijom i imunokemijske metode s enzimskom detekcijom ili detekcijom s fluorescentnom polarizacijom (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009b; Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009c).

## 1.2. Nasljedni metabolički poremećaji

Nasljedne bolesti karakterizirane su jednim ili više poremećaja u genomu koji dovode do niza specifičnih fenotipskih obilježja (Topić i sur., ured., 2018a). Kod nasljednih metaboličkih poremećaja mutacije u genu dovode do smanjene sinteze proteina ili sinteze afunkcionalnog proteina što rezultira promjenama metaboličkih puteva. Pritom se nerazgrađeni supstrat u toksičnim količinama nakuplja u organizmu ili se aktiviraju sporedni metabolički putevi čiji produkti također mogu toksično djelovati na organizam i doprinijeti razvoju kliničke slike. Poznat je širok spektar mogućih promjena na biokemijskoj razini što uvjetuje veliku varijabilnost kliničke slike, no uglavnom vrijedi pravilo da su bolesti koje se očituju naglo, metaboličkom krizom, uzrokovane poremećajima metabolizma malih molekula (aminokiselina, monosaharida ili organskih kiselina), a one čiji je nastup postupan vezane su uz pojedine organele i poremećaj razgradnje velikih molekula (glikozaminoglikana, glikoproteina ili glikolipida). Organske acidurije i homocistinurija su izuzetak od tog pravila jer su uzrokovane poremećajima malih molekula, a nastup bolesti i dismorfija su polagani (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009b).

Učestalost pojedinačnih nasljednih bolesti relativno je niska, no kao skupina bolesti čine velik javnozdravstveni problem. Tome ponajviše doprinosi otežana dijagnostika koja je posljedica velike varijabilnosti simptoma koji uvelike variraju od bolesti do bolesti, a i unutar same bolesti pošto pojedinci s istom mutacijom često razvijaju različitu kliničku sliku, a i ona se može očitovati u različitoj životnoj dobi (<http://www.rijetke-bolesti.hr/o-bolestima/>), spontano ili na poticaj nekog vanjskog čimbenika kao što su infekcija ili gladovanje. Uspješnost liječenja ovisi o pravovremenom prepoznavanju bolesti, pa se usporedno s kliničkom obradom provodi i odgovarajuća metabolička laboratorijska dijagnostika koja se prema pristupu dijeli na sustavno i selektivno traganje za određenim poremećajem (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009b). Sustavno traganje podrazumijeva novorođenački probir (engl. *newborn screening*), sustav organiziranog traganja za pojedinim prirođenim bolestima na nekom području čiji je osnovni cilj otkrivanje bolesti prije kliničkih manifestacija. Time se smanjuju smrtnost, poboljšavanje i troškovi liječenja te se obitelji donosi genetička informacija nužna za daljnje planiranje obitelji. U Republiku Hrvatsku 1978. godine uveden je probir na fenilketonuriju, 1985. na konatalnu hipotireozu (Petković Ramadža i sur., 2013), a 2017. proširen je za još šest bolesti – manjak karnitinskog nosača, poremećaj razgradnje masnih kiselina zbog manjka acil-koenzim A dehidrogenaze srednjih i vrlo dugih lanaca, poremećaj razgradnje masnih kiselina zbog manjka 3-hidroxiacil koenzim A dehidrogenaze dugih lanaca, glutarna acidurija tipa 1 i

izovalerijanska acidurija (<http://www.kbc-zagreb.hr/novosti/prosirenje-novorodenackog-probira-na-nasljedne-metabolicke-bolesti-u-republici-hrvatskoj>). Metaboličke bolesti koje nisu obuhvaćene sustavom probira određuju se selektivnim traganjem koje podrazumijeva laboratorijsku obradu simptomatskog bolesnika na temelju anamneze, kliničke slike i osnovnih laboratorijskih parametara. Osnovne metaboličke pretrage kao što su acidobazni status, glukoza, laktat, piruvat i amonijak upućuju na postojanje metaboličkog uzroka bolesti, a specijalne metaboličke pretrage pomažu njegovom otkrivanju. Konačna je potvrda pak određivanje ostatne enzimske aktivnosti u kulturi kožnih fibroblasta ili analiza DNA. Prilikom selektivnog traganja vrlo je važan racionalan odabir pretraga te pravilna interpretacija rezultata koja ne smije ovisiti samo o odstupanju od statistički dobivenih referentnih intervala nego mora biti i u skladu s dijagnostičkom obradom i kliničkom slikom (Čvorišćec i Čepelak, ured., 2009b).

#### 1.2.1. Poremećaji metioninskog ciklusa

Poremećaji metioninskog ciklusa koji rezultiraju povišenom plazmatskom koncentracijom i urinarnom ekskrecijom homocisteina mogu biti stečeni ili nasljedni. Što se tiče stečenog oblika hiperhomocisteinemije, vodeći je uzrok deficit vitamina koji su kao kofaktori uključeni u metioninski ciklus, najčešće uslijed premalog unosa, poremećaja gastrointestinalne apsorpcije ili tijekom uzimanja pojedinih lijekova koji smanjuju apsorpciju vitamina ili interferiraju s metabolizmom folata. Što se pak tiče nasljednih poremećaja, najčešće su rezultat polimorfizama u genima koji kodiraju za ključne enzime u metioninskom ciklusu – 5,10-metilentetrahidrofolat reduktazu (MTHFR), metionin sintazu (MS), metionin sintaza reduktazu (MSR) i cistation- $\beta$ -sintazu (CBS) (Cybulska i Klosiewicz-Latoszek, 2015).

Polimorfizmi *MTHFR* gena su najrasprostranjeniji uzrok umjerene hiperhomocisteinemije. Najčešći polimorfizam je supstitucija koja dovodi do zamjene alanina valinom u katalitičkoj domeni enzima što rezultira sintezom termolabilnog enzima. Poremećaj se prenosi autosomno-recesivno, a homozigoti imaju samo 35% ostatne aktivnosti MTHFR-a. Zbog toga je smanjeno formiranje metil-tetrahidrofolata, a time i sposobnost metilacije homocisteina u metionin što rezultira njegovom povišenom plazmatskom koncentracijom. Poremećaj je povezan s kardiovaskularnim bolestima, psihijatrijskim poremećajima kao što su depresija, shizofrenija i bipolarni poremećaj te sa smanjenom gustoćom kostiju. Drugi najčešći polimorfizam rezultira zamjenom glutaminske kiseline alaninom u regulatornoj domeni enzima. Prisutno je 60%

ostatne aktivnosti MTHFR-a, no ni homo- ni heterozigoti nemaju povišene plazmatske koncentracije homocisteina. Usprkos tome, polimorfizam se povezuje s kardiovaskularnim bolestima i psihijatrijskim poremećajima (Malinowska i Chmurzynska, 2009).

Mutacije *CBS* gena uzrokuju klasičnu homocistinuriju, nasljedni metabolički poremećaj čija je prevalencija 1:344.000 živorođene djece. Poznato je više od 150 mutacija, a uglavnom su to *missense* i točkaste mutacije koje dovode do supstitucije aminokiselina u katalitičkoj domeni enzima (Muačević-Katanec i sur., 2014). Gubi se balans između reakcija transulfuracije i remetilacije što rezultira smanjenom plazmatskom koncentracijom cisteina, a povišenim plazmatskim i urinarnim koncentracijama metionina i homocisteina te SAM-a i SAH-a. Homozigoti imaju plazmatske koncentracije homocisteina iznad 100  $\mu\text{mol/L}$ , a usprkos činjenici da je bolest klasificirana kao autosomno-recesivna, i heterozigoti imaju smanjenu aktivnost enzima u fibroblastima što nerijetko rezultira tromboembolijskim poremećajima u ranoj životnoj dobi (Malinowska i Chmurzynska, 2009). Bolesnici se mogu podijeliti na one koji reagiraju i one koji ne reagiraju na terapiju piridoksinom pri čemu oni koji ne reagiraju u pravilu imaju teži oblik bolesti. Simptomi su prisutni u nekoliko organskih sustava, najčešće na oku, koštanom, kardiovaskularnom i središnjem živčanom sustavu, a uvelike variraju između oboljelih pojedinaca te tako mogu biti uključeni svi ili ni jedan od navedenih sustava. Karakteristični simptomi oka su brzoprogredirajuća miopija i dislokacija očne leće, a koštanog sustava marfanoidan izgled uz visok rast, duge udove, deformaciju prsnog koša i skoliozu te osteoporozu koja se najčešće javlja u juvenilnoj dobi. U ranoj životnoj dobi počinje se javljati zaostajanje u razvoju, često uz snižen kvocijent inteligencije, no on ovisno o pravovremenoj primjeni terapije može varirati od 10 do 140 IQ jedinica. Česti su psihijatrijski poremećaji (depresija, anksioznost, opsesivno-kompulzivni poremećaj), konvulzije i simptomi parkinsonizma. Tromboembolijski poremećaji su glavni uzrok preuranjene smrti, a često su i jedini simptom bolesti. Za njih postoji povećan rizik u trudnoći i postpartalnom razdoblju te se stoga kod poznatih bolesnica od trećeg trimestra gestacije primjenjuje profilaktička antikoagulantna terapija niskomolekularnim heparinom (Sacharow i sur., 2017). Pošto je zakašnjela dijagnoza popraćena razvojem kroničnih komplikacija na očima, kostima i središnjem živčanom sustavu, preporuča se rutinsko određivanje plazmatske koncentracije homocisteina svim osobama s klasičnim vanjskim obilježjima bolesti, napose marfanoidnim izgledom i miopijom očne leće, i u onih u čijoj se obiteljskoj anamnezi nalazi više tromboembolijskih incidenata u ranijoj životnoj dobi (Muačević-Katanec i sur., 2014). Preporuča se i uvođenje novorođenačkog probira, no nedostatak postojećih metoda leži u tome što se određuje plazmatska koncentracija metionina, a ne homocisteina, zbog čega je visok udio

lažno negativnih rezultata. Naime, na taj se način ne mogu odrediti oblici bolesti uzrokovani defektom remetilacije kao ni klasična homocistinurija koja odgovara na terapiju piridoksinom jer novorođenčad nema povišene koncentracije metionina tijekom prvih 36-72 sata života, kada se provodi novorođenački probir, a niže koncentracije metionina ima i novorođenčad koja se hrani majčinim mlijekom. Osjetljivost probira je povećana određivanjem koncentracije homocisteina ili određivanjem najčešćih mutacija iz suhe kapi krvi (Sacharow i sur., 2017). U Republici Hrvatskoj se trenutno ne provodi probir, no u dugoročnom je planu njegovo uvođenje kao primarnog cilja, no pošto bi se kao biljeg analizirali metionin i omjer metionina i fenilalanina, on bi kao sekundarni cilj mogao služiti i za otkrivanje drugih hipermetioninemija, npr. nedostatka S-adenozilhomocistein hidrolaze (Petković Ramadža i sur., 2013).

Defekti metabolizma kobalamina (vitamina B12) uključuju niz nasljednih poremećaja od kojih je najrasprostranjeniji poremećaj kobalamin C. U njemu je smanjena pretvorba prehrambenog kobalamina u aktivne oblike metilkobalamin, koji je kofaktor MS-a, i adenoilkobalamin, koji je kofaktor metilmalonil-CoA mutaze. Točna patogeneza bolesti još nije razjašnjena, no smatra se da je u pozadini njezinog razvoja sinergistički učinak nedostatka metabolita u metaboličkom putu nizvodno od mutacije i akumulacije toksičnih metabolita, primarno homocisteina i SAH-a (Iacobazzi i sur., 2014).

Kod nasljednih poremećaja metioninskog ciklusa pravovremenim je uvođenjem terapije moguće korigirati biokemijske abnormalnosti, pri čemu je primarni cilj smanjivanje plazmatske koncentracije homocisteina kako bi se prevenirale komplikacije bolesti. Potrebno je smanjiti unos metionina putem hrane restriktivskom dijetom, a kako bi se ubrzao metabolizam homocisteina stimulacijom enzima daju se vitamini koji im služe kao kofaktori – piridoksin kod pacijenata s klasičnom homocistinurijom koji na njega reagiraju te folat i cijanokobalamin koji optimiziraju konverziju homocisteina u metionin putem metionin sintaze. Kao dodatna terapija može se koristiti i betain pošto služi kao alternativni izvor metilne skupine u jetri i bubrezima. Bolesnike je potrebno pratiti jednom godišnje nakon uspostavljanja optimalne terapije, a praćenje se provodi određivanjem plazmatskih koncentracija homocisteina, metionina, folata i cijanokobalamina (Sacharow i sur., 2017).

### 1.3. Kratka analitička validacija kvantitativnih metoda

Kako bi se osigurala kontinuirana isporuka pouzdanih rezultata laboratorijskih pretraga, međunarodna norma ISO 15189 iziskuje od akreditiranih medicinsko-biokemijskih laboratorija

provedbu sustava upravljanja kvalitetom. Njezini temeljni zahtjevi su optimizacija laboratorijskih radnih procesa i validacija primijenjenih analitičkih metoda (Topić i sur., ured., 2018b). Validacijom se ispituju opće karakteristike izvedbe metode – preciznost, točnost, linearnost, granica detekcije i kvantifikacije, referentni intervali, utjecaj matrice i interferencije. Najčešće ju provodi proizvođač, a njome se zapravo ovjerava da su specificirani zahtjevi prikladni za utvrđenu uporabu. Kratkim analitičkom validacijom, koja se naziva i verifikacija, provjeravaju se karakteristike analitičke izvedbe metode koje je postavio proizvođač, tj. provjerava se njihova primjenjivost u stvarnom radu laboratorija, a provodi ju laboratorij prilikom uvođenja nove metode ili analitičkog sustava. Koraci su upoznavanje s analitičkim sustavom te provjera preciznosti, točnosti, linearnosti i referentnih intervala, a ukoliko se uvodi nova metoda, potrebno ju je i usporediti s već postojećom metodom. Kriterij prihvatljivosti je manje od 10% odstupanja od vrijednosti koje je deklarirao proizvođač.

Upoznavanje s analitičkim sustavom obuhvaća procjenu njegove primjenjivosti. Operater se obučava kako bi postigao potrebno iskustvo i znanje za provođenje validacijskih eksperimenata i uspješan daljnji rad. Upoznaje se s osnovnim tehničkim karakteristikama sustava kao što su broj testova u jedinici vremena, volumen uzorka i potrošnja reagensa, izučava se postupak provođenja unutarnje kontrole kvalitete, kalibracije i održavanja sustava.

Preciznost je bliskost slaganja između neovisnih rezultata mjerenja. Razlikuju se preciznost u seriji (ponovljivost) i preciznost iz dana u dan (validacijska međupreciznost iz ponovljenih mjerenja). Procjenjuje se kroz veličinu slučajne pogreške koja se iskazuje kao standardna devijacija ( $s$ ) i koeficijent varijacije ( $K_v$ ), a dobivena je mjerenjem uzoraka u dvije koncentracijske razine tijekom 5 dana u triplikatu. Kao uzorci se mogu koristiti kontrolni uzorci, standardi ili prije analizirani uzorci pacijenata.

Točnost je bliskost slaganja između rezultata mjerenja i prave vrijednosti mjerene veličine. Njezina je mjera odstupanje (engl. *bias*), razlika između srednje vrijednosti rezultata dobivenih metodom koja se verificira i poznate vrijednosti certificiranoga referentnog materijala ili vrijednosti izmjerene usporednom metodom.

Linearnost se definira kao raspon koncentracija u kojem su rezultati mjerenja izravno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku bez daljnjeg razrjeđivanja uzorka. Procjenjuje se testom razrjeđenja u najmanje 5 različitih koncentracijskih točaka koje se mjere u duplikatu, a izražava se koeficijentom korelacije regresijskog pravca dobivenog tako da su na apscisu nanosene srednje izmjerene, a na ordinatu očekivane vrijednosti. Dobiveni koeficijent korelacije mora biti  $\geq 0,990$ .



Verifikacija referentnih intervala provodi se tako da se ispituje najmanje 20 referentnih osoba iz populacije kojoj je referentni interval namijenjen. Ukoliko manje od 10% ispitanika ima vrijednost izvan očekivanog referentnog intervala on se prihvaća, a ukoliko ih pak ima više ispitivanje se ponavlja; ako je ponovljeni rezultat ponovno iznad 10% potrebno je izraditi specifične referentne intervale. Prema preporukama trebala bi se provesti ocjena bioloških referentnih intervala za svaku validiranu pretragu, bez obzira primjenjuju li se harmonizirani ili preporučeni referentni intervali, no u nekim slučajevima odgovorna osoba svojim potpisom može garantirati da su literaturni podaci ili referentni intervali proizvođača prikladni za danu populaciju te se tada ne mora provoditi njihova provjera.

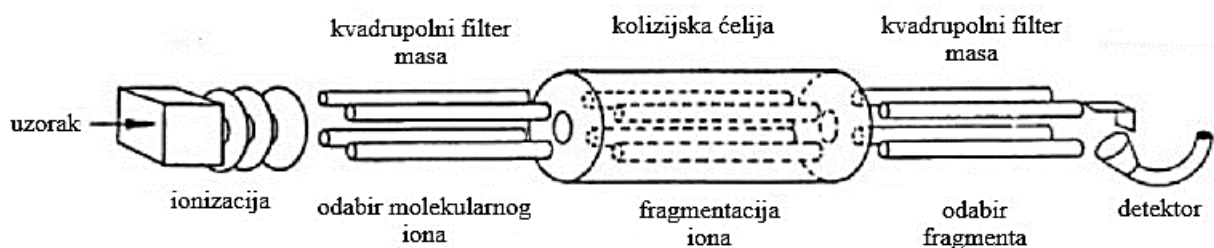
Ukoliko se u laboratoriju već koristi druga metoda za pretragu od interesa, novu metodu je potrebno s njom usporediti analiziranjem najmanje 30 uzoraka pacijenata s vrijednostima koje pokrivaju cijelo koncentracijsko područje (Galjanić i sur., ured., 2010; Topić i sur., 2015).

#### 1.4. Tandemska spektrometrija masa

Zbog mnogo veće osjetljivosti i specifičnosti spektrometrije masa od kromatografskih detektora, već su tijekom 1950-ih godina počeli prvi pokušaji spajanja kromatografskih metoda sa spektrometrijom masa. Prvi komercijalno dostupni sustavi spoja plinske kromatografije sa spektrometrijom masa (GC-MS) na tržištu su dostupni od 1970-ih godina, a zbog svoje niske cijene i visoke pouzdanosti analize ubrzo su se proširili diljem tržišta, kako u industriji, tako i u kliničkim laboratorijima (Pitt, 2009). Daljnji je napredak postignut spajanjem s tekućinskom kromatografijom (LC-MS) 1980-ih godina pošto se njezinom primjenom nadilaze nedostaci GC-MS-a kao što su kompleksna preparacija uzorka i nemogućnost analize molekula visoke molekularne mase, termolabilnih i nehlapljivih molekula (Perez i sur., 2016). Danas je metoda dodatno unaprijeđena korištenjem tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (engl. *high-performance liquid chromatography*, HPLC) ili tekućinske kromatografije ultra-visoke djelotvornosti (engl. *ultra-performance liquid chromatography*, UPLC) čime je skraćeno vrijeme analize, a povećane su rezolucija razdvajanja molekula i osjetljivost metode. Dodatno povećanje preciznosti, točnosti, osjetljivosti i specifičnosti metode postignuto je uspostavom sustava dvojne spektrometrije masa (Churchwell i sur., 2005).

Naziv tandemski ili dvojni maseni spektrometar (engl. *tandem mass spectrometer*) podrazumijeva uređaj koji se sastoji od dva serijski povezana kvadrupolna masena analizatora koji su razdvojeni kolizijskom ćelijom. Kvadrupolni analizatori sastoje se od četiri paralelne

elektrode hiperboličnog presjeka, od kojih po dvije imaju isti, a po dvije suprotni naboj. Na njima se uspostavlja kombinacija konstantnog i varirajućeg napona kako bi se mijenjanjem njegovog iznosa propuštale molekule samo uskog omjera mase i naboja ( $m/z$  omjer). Nakon što se molekula prevede u ionizirano stanje ulazi u prvi filter masa u kojem se izabiru ionizirane molekule određenog  $m/z$  omjera te ulaze u kolizijsku ćeliju. U njoj se molekule analita sudaraju s molekulama inertnog plina kao što su dušik ili argon te dolazi do njihove fragmentacije, a u posljednjem se masenom filteru na jednak način kao i u prvom izboru fragmenti određenog  $m/z$  omjera. Nakon prolaska kroz posljednji maseni filter ioni padaju na detektor. Na njemu se nalazi fotomultiplikator koji pojačava ionske impulse i pretvara ih u električni signal na temelju kojeg se konstruira maseni spektar, odnosno grafički prikaz  $m/z$  omjera u odnosu na intenzitet signala. On je specifičan za svaku molekulu, a u njemu su prisutni molekularni ioni (odnosno ionizirana intaktna molekula) te fragmentirani, izotopni i pozadinski ioni (Pitt, 2009).



*Slika 3: Shematski prikaz tandemskog spektrometra masa (preuzeto i prilagođeno prema Yost i Fetterolf, 1983)*

Tandemska spektrometrija masa je robusna metoda visoke točnosti, preciznosti, specifičnosti i osjetljivosti, manje su granice detekcije i kvantifikacije analita, potrebno je malo uzorka, kratko je vrijeme analize i niska je cijena analize po uzorku. Ona omogućuje kvalitativnu i kvantitativnu analizu mikrolitarskih uzoraka u kojima se molekule nalaze u femtomolarnom rasponu, a posebno je pogodna kada se s visokim potrebnim stupnjem točnosti analiziraju kompleksne smjese kao što su biološki uzorci. U kliničkom je laboratoriju njezina primjena vrlo raznovrsna te se tako koristi za novorođenački probir, primarno prilikom određivanja aminokiselina i acil-karnitina, praćenje terapijske koncentracije lijekova, ponajviše imunosupresiva, otkrivanje sredstava ovisnosti i toksina te određivanje koncentracije steroidnih i tiroidnih hormona te vitamina A, D i E. Osim u kliničkim laboratorijima koristi se i u farmaceutskoj i prehrambenoj industriji, sudskoj medicini te u istraživanjima proteoma, genoma i metaboloma.

Usprkos svim navedenim prednostima ta je tehnologija prisutna u relativno malom broju kliničkih laboratorija. To je primarno posljedica visoke cijene kako samog uređaja, tako i izučavanja operatera te uvođenja metode i održavanja. Metoda je, naime, vrlo osjetljiva na kontaminacije i nestalnost okoline te se stoga uvjeti u prostoriji u kojoj se uređaj nalazi moraju održavati stalnim, a prilikom uvođenja i provođenja metode je izuzetno važna predanalitika, odnosno obrada uzorka i optimizacija eksperimentalnih parametara (Seger i Grieschmacher, 2007).

## 2. OBRAZLOŽENJE TEME

Niz nedavnih istraživanja povezoao je povišenu plazmatsku koncentraciju homocisteina (hiperhomocisteinemiju) s patogenezom niza bolesti kao što su kardiovaskularne, neurodegenerativne, neuropsihijatrijske bolesti, preeklampsija i neke kongenitalne malformacije (defekt zatvaranja neuralne cijevi, Downov sindrom, rascjep usne i nepca, urođene srčane greške). Patofiziološki mehanizam djelovanja hiperhomocisteinemije vrlo je kompleksan te se stoga nalazi u interesu mnogih istraživanja, a to je doprinijelo i povećanom kliničkom interesu te razvoju novih metoda određivanja. Jedna od tih metoda je i tandemska spektrometrija masa čija prednost pred dotad korištenim, uglavnom imunokemijskim metodama, leži u boljim analitičkim karakteristikama i nižoj cijeni analize po uzorku. Upravo stoga se i u Metaboličkom laboratoriju na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb teži njezinom uvođenju u rutinski rad za određivanje plazmatske koncentracije homocisteina.

Prije uvođenja nove metode ili sustava u rutinski rad laboratorija potrebno je provesti kratku analitičku validaciju kako bi se potvrdile analitičke značajke metode ili sustava dane od strane proizvođača. Sukladno tome, cilj ovog rada je provesti kratku analitičku validaciju određivanja plazmatske koncentracije homocisteina primjenom tandemske spektrometrije masa te usporediti novu metodu s već postojećom metodom nefelometrije. Pritom su određivani sljedeći validacijski parametri:

- a) preciznost, koja uključuje ponovljivost i međupreciznost
- b) točnost
- c) linearnost
- d) usporedivost (usporedba s postojećom metodom nefelometrije)

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. Nefelometrija

##### Materijali:

Korišteni mjerni instrument je *BN ProSpec*® *System* nefelometar. Osim reagensa, u automatiziranoj metodi koriste se kontrolni standardi niske, srednje i visoke koncentracije te kalibrator. Njime se kalibracija provodi za svaki novi *lot* reagensa i u skladu s potrebama, a referentna se krivulja sastoji od šest točaka koje su dobivene automatskim serijskim razrjeđivanjem na analizatoru upotrebom N Diluenta.

Ostali potrebni reagensi i oprema su diluent, pufer, redestilirana voda, dilucijske čašice, reakcijske kivete, automatska pipeta i nastavci za pipete, centrifuga i *Vortex* mješač.

##### Metoda:

##### a) Predanalitička faza

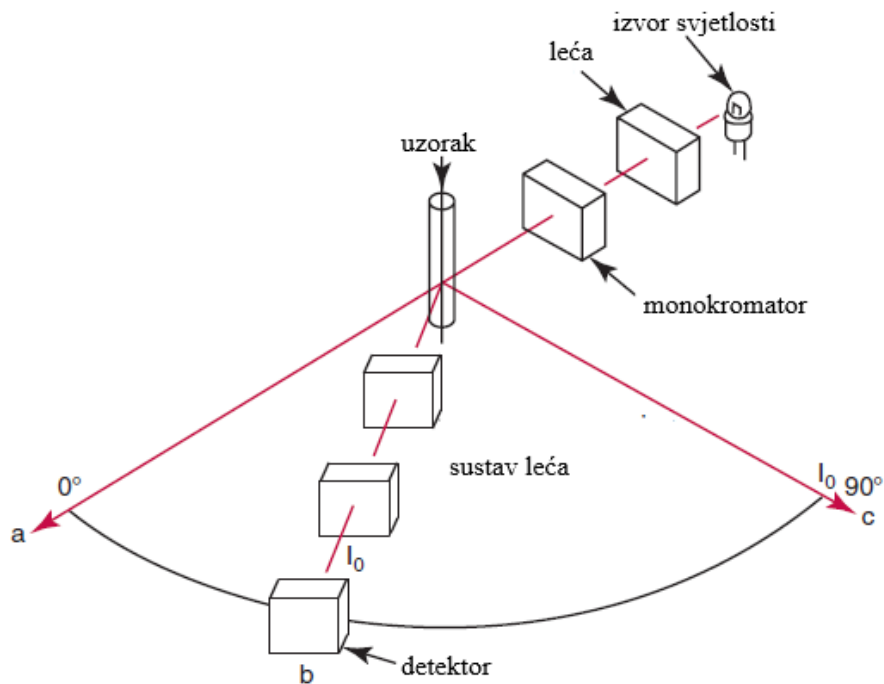
Primarni uzorci za određivanje homocisteina nefelometrijom su plazma i serum. Plazma je dobivena vađenjem venske krvi u epruvetu volumena 7 mL s ljubičastim čepom s EDTA antikoagulansaom (K2-EDTA), a serum u epruvetu bez antikoagulansa. Odmah nakon vađenja epruvetu je potrebno uroniti u led do centrifugiranja kako bi se prekinuo metabolizam eritrocita, a centrifugirati je potrebno unutar jednog sata od vađenja. Odvojeni uzorci plazme ili seruma pohranjuju se kratkoročno, do tjedan dana, u hladnjaku na 2-7°C, a dugoročno na -20°C.

Uzorci pohranjeni na 2-7°C su odmah spremni za analizu, a oni na -20°C se moraju prethodno potpuno odmrznuti i dobro promiješati na *Vortex* mješaču.

##### b) Analitička faza

Nefelometrija je kvantitativna imunokemijska metoda koja se temelji na detekciji količine svjetlosti raspršene od kompleksa antigen-protutijelo. Radi povećanja osjetljivosti, detektor se

nalazi pod kutem koji nije jednak kutu upadne svjetlosti, najčešće 70-90° (Burtis i sur., ured., 2012).



Slika 4: Nefelometar (preuzeto i prilagođeno prema Burtis i sur., ured., 2012)

Homocistein je u uzorku vezan na proteine plazme te se tijekom analize djelovanjem dihidrotreitola iz reagensa reducira u slobodni homocistein i nakon toga enzimski prevodi u S-adenozilhomocistein (SAH). Na početku reakcije u reakcijsku je smjesu dodan egzogeni spoj S-adenozilcistein (SAC) konjugiran sa svinjskim globulinom (PTG-SAC). Zbog strukturne se sličnosti natječe sa SAH-om iz uzorka za vezanje na anti-SAH protutijela vezana na polistirenske čestice. Pošto je u prisutnosti SAH-a agregacija PTG-SAC-a s polistirenskim česticama vrlo mala ili izostaje, slijedi da je količina raspršenja svjetlosti obrnuto proporcionalna koncentraciji SAH-a u uzorku. Izmjereno raspršenje svjetlosti uspoređuje se sa standardnom krivuljom izrađenom od različitih razrjeđenja kalibratora.

### 3.2. Tandemska spektrometrija masa

#### Materijali:

Za procjenu preciznosti i točnosti korišteni su komercijalni kontrolni uzorci *ClinCheck*® - *Control* u dvije koncentracijske razine. Te su liofilizirane kontrole bazirane na ljudskoj plazmi, a namijenjene su unutarnjoj kontroli kvalitete.

Tablica 1. Koncentracijsko područje komercijalnih kontrolnih uzoraka

| <b>kontrola</b> | <b>metoda analize</b> | <b>srednja vrijednost koncentracije [μmol/L]</b> | <b>koncentracijsko područje [μmol/L]</b> |
|-----------------|-----------------------|--|--|
| <b>level 1</b>  | RECIPE-LC-            | 9,04   | 7,23 – 10,8                              |
| <b>level 2</b>  | MS/MS                 | 25,9   | 20,7 – 31,0                              |

Kalibracija analitičkog sustava provodi se *ClinCal*® - *Calibrator* setom kalibratora. Liofilizirani je kalibrator dostupan u četiri koncentracijske razine, a baziran je na ljudskom serumu. Kalibratori se za analizu pripremaju jednako kao i uzorci pacijenata.

Tablica 2. Koncentracijsko područje kalibratora

| <b>kalibrator</b> | <b>metoda analize</b> | <b>koncentracija [μmol/L]</b> |
|-------------------|-----------------------|-------------------------------|
| <b>level 0</b>    | LC-MS/MS              | 5,87                          |
| <b>level 1</b>    |                       | 9,99                          |
| <b>level 2</b>    |                       | 20,3                          |
| <b>level 3</b>    |                       | 50,7                          |

Za procjenu linearnosti korišteni su komercijalni kontrolni uzorak ERNDIM 2018.1 (engl. *European Research Network for evaluation and improvement of screening, Diagnosis and treatment of Inherited disorders of Metabolism*) koji je dio vanjske kontrole kvalitete i kalibratori.

Prilikom izvođenja analize korišten je *ClinMass* ® komercijalni komplet reagensa namijenjen za kvantitativno određivanje ukupne koncentracije homocisteina u plazmi ili serumu primjenom tandemске spektrometrije masa. Komplet reagensa sadrži mobilnu fazu, otopinu za ispiranje, interni standard (IS), reagens A čija je uloga redukcija tijekom pripreme uzorka te reagens B čija je uloga precipitacija proteina.

Prilikom ručne pripreme uzorka korišteni su automatske pipete i nastavci za pipete, *Eppendorf* epruvete, *Vortex* miješalica, hladnjak (temperature +4°C) i centrifuga.

Korišteni HPLC sustav sadrži upravljač (engl. *controller*), otplinjač (engl. *degasser*), pumpe A i B, automatski dio za uzorkovanje (engl. *autosampler*), pećnicu (engl. *column oven*) i detektor.

#### Metoda:

##### a) Predanalitička faza

##### a. Vrsta uzoraka

Primarni uzorak za određivanje homocisteina tandemskom spektrometrijom masa je plazma dobivena vađenjem venske krvi u epruvetu volumena 7 mL s ljubičastim čepom koja sadrži EDTA antikoagulans (K2-EDTA). Može se koristiti i serum, no epruvete trebaju sadržavati specijalne stabilizatore kao što su inhibitori SAH hidrolaze kako bi se spriječila *in vitro* sinteza homocisteina u eritrocitima. Epruvete je odmah nakon vađenja potrebno staviti na led, a centrifugiranje je potrebno provesti unutar jednog sata. Centrifugirani uzorci mogu se pohranjivati minimalno dva dana na sobnoj temperaturi (15-30°C), tjedan dana na 2-8°C, a tri mjeseca na temperaturama nižim od -18°C.

Za određivanje homocisteina u svrhu novorođenačkog probira koristi se suha kap krvi (engl. *dried blood spot*, DBS) iz pete novorođenčeta. Prednosti za njezino korištenje su manja invazivnost uzorkovanja, manji potrebni volumen krvi te jednostavniji i jeftiniji transport (Lakshmy, 2008). Uzorkovanje se provodi prema međunarodnom CLSI (engl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) standardu. Uzorci su stabilni tjedan dana prilikom pohranjivanja na sobnoj temperaturi uz nisku vlažnost zraka (< 30%), četiri tjedna na 2-8°C, a dugoročna pohrana se vrši pri temperaturama nižim od -18°C.



Ukoliko su pacijenti djeca starija od jedne godine ili odrasle osobe, kapilarna se krv osim iz pete može uzeti i iz prsta. Princip prikupljanja i pohranjivanja uzorka je jednak kao i kod uzorka kapilarne krvi iz pete.

b. Preparacija internog standarda, kontrola, kalibratora i reagensa

Interni standard je kemijski spoj obilježen izotopom koji se koristi za kalibraciju svakog uzorka (kontrola, kalibratora i uzorka nepoznate koncentracije analita). Koncentracija u kojoj se dodaje u uzorak je poznata i jednaka je za svaki uzorak što omogućuje temeljenje kalibracije na omjeru odgovora između analita i internog standarda, a ne na apsolutnom odgovoru analita. Na taj se način minimalizira utjecaj gubitka uzorka tijekom preparacije na konačni rezultat, a i povećavaju se preciznost, točnost i reproducibilnost analize te smanjuju vrijeme trajanja i interindividualne varijabilnosti koje su posljedica efekta matriksa (Bergeron i sur., 2009). Za određivanje homocisteina kao interni standard koristi se d8-homocistein, a pošto tijekom preparacije uzorka dolazi do redukcije detektira se kao d4-homocistein. Otopina se priređuje tako da se liofiliziranom internom standardu dodaje ekstrakcijska otopina, a alikvoti se pohranjuju na  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Kontrole se pripremaju dodavanjem 3,0 mL HPLC vode u bočicu u kojoj se nalazi liofilizirana kontrola, a nakon rekonstitucije stabilne su minimalno 12 sati ukoliko su skladištene na sobnoj temperaturi, 7 dana skladištene na  $2-8^{\circ}\text{C}$ , a minimalno 3 mjeseca skladištene na  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Pojedini se kalibrator priprema dodatkom 1,0 mL HPLC vode u bočicu u kojoj se nalazi liofilizat, a nakon rekonstitucije stabilan je jednako dugo kao i kontrole.

Reagens A je redukcijska otopina koja se priprema dodatkom 5,0 mL HPLC vode u bočicu u kojoj se nalazi krutina. Nakon dodatka vode potrebno ga je potpuno otopiti laganim rotiranjem (oko 5 minuta). Pohranjuje se na  $2-8^{\circ}\text{C}$  i pri toj je temperaturi stabilan oko 4 tjedna. Reagens B je otopina koja služi za precipitaciju. On se pohranjuje na sobnoj temperaturi.

### c. Protokol pripreme uzorka

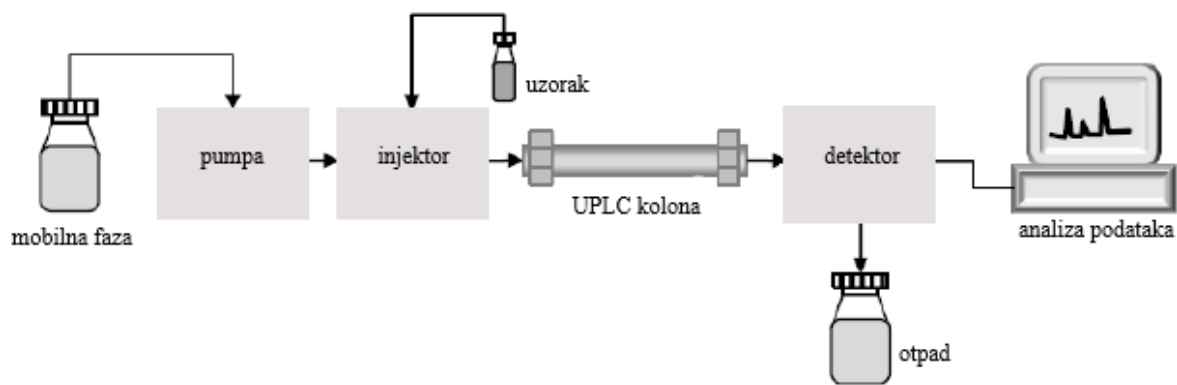
Redukcija: u *Eppendorf* epruvete se ispipetira po 50  $\mu$ L uzorka (kontrole, kalibratora ili uzorka pacijenta), internog standarda (d8-homocistein) i reagensa A. Sadržaj se miješa 30 sekundi na *Vortex* mješaču i inkubira 5 minuta na sobnoj temperaturi.

Precipitacija: u svaki se uzorak dodaje 200  $\mu$ L reagensa B. Sadržaj se miješa 30 sekundi na *Vortex* mješaču, inkubira 5 minuta u hladnjaku na 4°C i centrifugira 5 minuta na 10 000 x g. Supernatant se odvaja od taloga i prenosi u bočice koje se prebacuju u *autosampler* na LC – MS/MS.

### b) Analitička faza

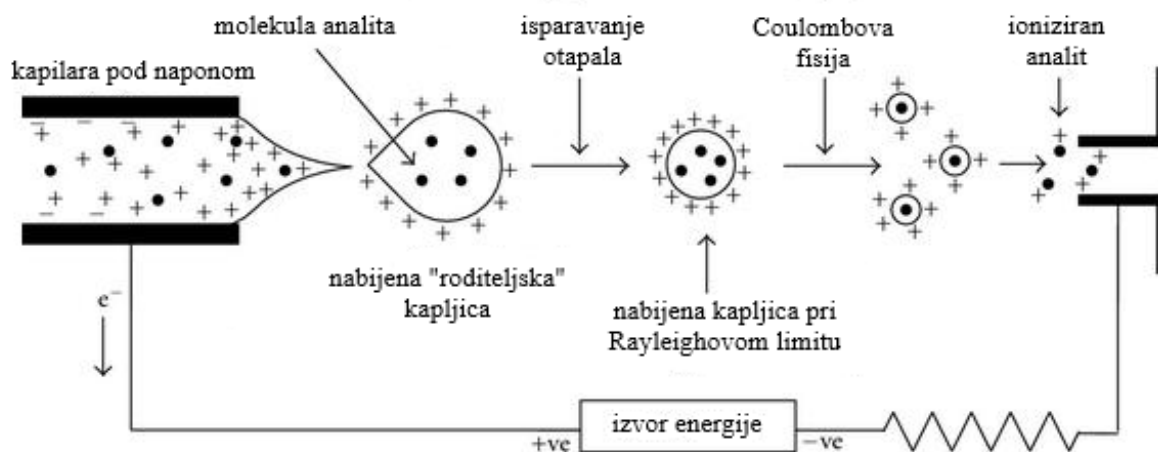
Metoda je spoj sustava tekućinske kromatografije ultra-visoke djelotvornosti i tandemске spektrometrije masa (UPLC-MS/MS). Uloga tekućinske kromatografije je razdvajanje analita iz uzorka, a spektrometar masa služi kao detektor.

Tekućinska kromatografija ultra-visoke djelotvornosti (engl. *ultra-performance liquid chromatography*, UPLC) je kromatografska tehnika čije su uloge razdvajanje, pročišćavanje, identifikacija i kvantifikacija analita iz smjese. Princip metode je razdvajanje sastavnica smjese između stacionarne i mobilne faze na temelju suptilnih razlika u njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima. Stacionarnu fazu čine sitne čestice kromatografskog materijala koje se nalaze u koloni, a mobilna faza je otapalo koje se u UPLC-u upumpava u kolonu pod visokim tlakom uslijed čega se naspram drugih tekućinskih kromatografskih tehnika skraćuje retencijsko vrijeme analita na koloni, a povećava rezolucija njihovog razdvajanja. Skraćivanje vremena analize dovodi i do manje potrošnje otapala i samim time smanjenja cijene analize, a osim ekonomičnosti, ostale su prednosti UPLC-a pred drugim tekućinskim kromatografskim tehnikama robusnost te visoka selektivnost i osjetljivost (Sheehan, 2009).



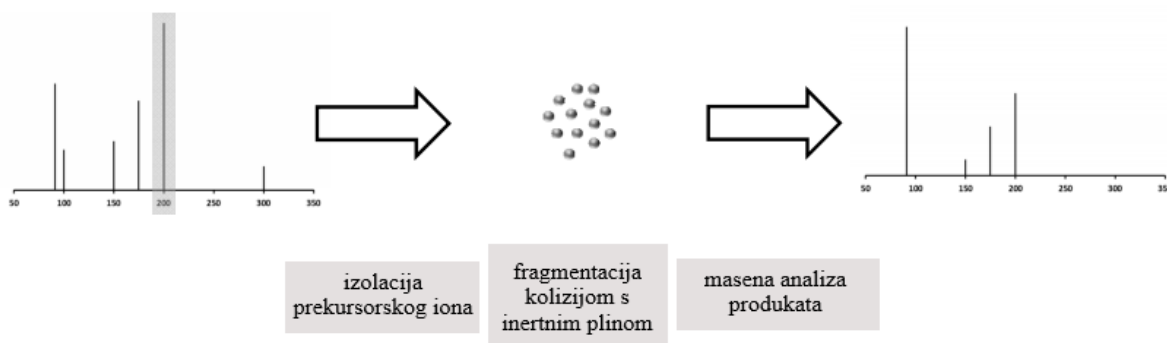
Slika 5: Shematski prikaz UPLC-a (preuzeto i prilagođeno prema Czaplicki, 2013)

Nakon razdvajanja UPLC-om analiti se unose u tandemski spektrometar masa. Općenito, spektrometri masa funkcioniraju na način da molekule prvo prevode u ionizirano stanje, a zatim nastale molekularne ione i ionizirane fragmente analiziraju na temelju  $m/z$  omjera (Pitt, 2009). Za ionizaciju se u ovoj metodi koristi princip elektrosprej ionizacije (engl. *ElectroSpray Ionisation*, ESI). To je „meká“ metoda ionizacije u kojoj se malo energije predaje analitu, pa je stoga i stopa fragmentacije relativno niska što je posebno pogodno za polarne analite kao što su peptidi, metaboliti i ksenobiotici. Tijekom ESI tekući uzorci prolaze kroz metalnu kapilaru pod naponom od 3-5 kV pri čemu nastaje aerosol sastavljen od nabijenih „roditeljskih“ kapljica čiji je naboj radi minimalizacije potencijalne energije pravilno raspoređen po površini kapljice. Na njih tada djeluju suprotne sile – površinska napetost kapljice koja nastoji zadržati njezin sferični oblik i Coulombova sila odbijanja između naboja koja nastoji destabilizirati kapljicu. Po izlasku iz kapilare primjenjuje se visoka temperatura koja dovodi do isparavanja otapala čime se smanjuje veličina kapljice, upravo do trenutka kada se površinska napetost više ne može odupirati Coulombovoj sili (tzv. Rayleighov limit) i dolazi do Coulombove eksplozije (Coulombove fisije) kojom nastaju manje kapljice većeg omjera naboja prema masi. Taj se proces ponavlja stvarajući sve manje kapljice dok naposljetku na nastanu „nanokapljice“ koje su zapravo ioniziran analit u plinskoj fazi (Banerjee i Mazumdar, 2012; Ho i sur., 2003).



Slika 6: Princip ESI (preuzeto i prilagođeno prema Banarjee i Mazumdar, 2012)

Nakon ionizacije analiti ulaze u vakuum spektrometra masa u kojem se kreću u elektromagnetskom polju. Električna komponenta polja akcelerira njihovu brzinu kretanja, a magnetska utječe na smjer – pritom dolazi do elektromagnetske deflekcije molekula ovisno o njihovoj molekularnoj masi i količini površinskog naboja, odnosno ovisno o  $m/z$  omjeru (Domon i Aebersold, 2006). Metoda se sastoji od trostrukog kvadrupolnog spektrometra masa čiji je princip opisan u uvodu ovog rada (*1.4. Tandemska spektrometrija masa*), a način odabira iona je *Multiple reaction monitoring* (MRM). Unaprijed je određeno koji se prekursorski ion propušta u prvom, a koji fragment u trećem kvadrupolu što daje najveću osjetljivost i specifičnost u kvantitativnim postupcima. Nakon prolaska kroz treći kvadrupol ionska zraka pada na detektor na kojem se radi povećanja osjetljivosti metode fotomultiplikatorom pretvara u milijun puta pojačan električni signal. Softverski se konstruira maseni spektar kao funkcija zbroja svih iona detektiranih u jedinici vremena te grafički prikazuje kao  $m/z$  omjer u odnosu na intenzitet signala normaliziran prema baznom *peaku* (Pitt, 2009).



Slika 7: Princip dobivanja masenog spektra (preuzeto i prilagođeno prema Madeira i Florencio, 2012)

### c) Poslijeanalitička faza

Na temelju dobivenih podataka određene su preciznost u seriji (ponovljivost), preciznost iz dana u dan (međupreciznost), točnost i linearnost.

### 3.3. Statistička obrada podataka

Za statističku obradu podataka korišteni su računalni programi *Microsoft Office Excel 2016* i *MedCalc*. Dobiveni su rezultati uspoređivani s kriterijima za procjenu prihvatljivosti rezultata kratke analitičke varijacije temeljenim na biološkoj varijabilnosti koji su preuzeti s *web* stranice *www.westgard.com* (*Westgard biological variation database*, <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>).

#### a) Preciznost

Preciznost se procjenjuje kroz preciznost u seriji (ponovljivost) i preciznost iz dana u dan (međupreciznost). Ovisi isključivo o veličini slučajne pogreške te stoga ne daje informacije o točnosti niti o stvarnoj vrijednosti. Mjere kojima se nepreciznost iskazuje su standardna devijacija ( $s$ ) i koeficijent varijacije ( $K_v$ ). Oni se uvijek računaju i prikazuju uz aritmetičku sredinu svih vrijednosti pošto je  $s$  mjera prosječnog odstupanja rezultata od aritmetičke sredine,

a  $K_v$  govori o odnosu standardne devijacije prema aritmetičkoj sredini. Preko  $K_v$ -a je na taj način moguće usporediti varijabilnosti dvaju skupova podataka (Šimundić, 2006).

Arithmetička sredina, standardna devijacija i koeficijent varijacije se računaju prema sljedećim formulama:

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

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

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

a. Preciznost u seriji (ponovljivost)

Preciznost u seriji procjenjuje se prema skupnoj standardnoj devijaciji ( $S_r$ ) i koeficijentu varijacije.

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

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D \sum_{i=1}^n (x_{d_i} - \bar{x}_d)^2}{D \cdot (n-1)}} \quad (5)$$

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

Pritom je  $n$  ukupan broj ponavljanja dnevno, a  $D$  ukupan broj dana.  $\bar{\bar{x}}$  je tzv. *grand mean*, aritmetička sredina svih aritmetičkih sredina mjerenja.

b. Preciznost iz dana u dan (međupreciznost)

Preciznost iz dana u dan se procjenjuje prema standardnoj devijaciji aritmetičkih sredina dobivenih za svaki dan (seriju) mjerenja ( $S_b$ ) i koeficijentu varijacije.

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

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

## b) Točnost

Točnost se procjenjuje tako da se dobivene vrijednosti uspoređuju s ciljnim vrijednostima kontrola, a njihov se odnos iskazuje kroz apsolutno i relativno odstupanje (engl. *bias*) prema sljedećim formulama:

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

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

pri čemu je  $x_c$  ciljna koncentracija analita dana od strane proizvođača korištenih kontrola, a  $\bar{\bar{x}}$  je *grand mean*.

## c) Linearnost

Linearnost se procjenjuje korištenjem uzorka humanog podrijetla, a u ovom je to slučaju bio ERNDIM 2018.1. Kao ciljne koncentracije koristile su se one nativnog uzorka te dva razrjeđenja, u omjeru kontrolnog uzorka i diluenta 35:15 i 25:25. Četiri preostale točke korištene za izradu kalibracijskog pravca dobivene su od korištenih kalibratora *ClinCal*® - *Calibrator*.

Na apscisu se nanose očekivane, a na ordinatu stvarno dobivene vrijednosti. Linearnost se prema dobivenom pravcu procjenjuje na temelju vizualne procjene i izračuna jednadžbe pravca, nagiba, odsječka i koeficijenta korelacije pri čemu on mora biti  $r \geq 0,990$ .

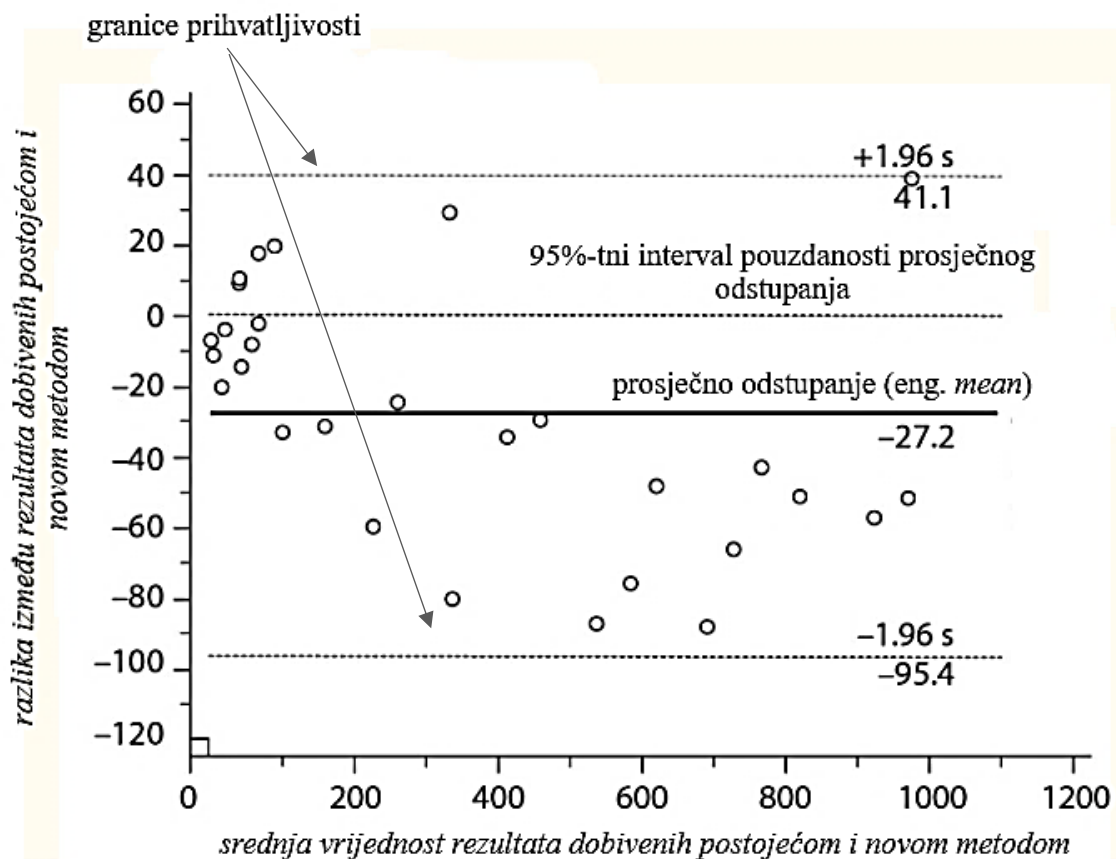
#### d) Usporedivost

Procjena usporedivosti je utvrđivanje odstupanja između dvaju mjernih postupaka koji mjere istu veličinu. Njezin je cilj donošenje zaključka postoji li statistički značajna razlika između točnosti tih dvaju postupaka prilikom analize uzoraka pacijenata (Bilić-Zulle, 2011). Ukoliko su metode jednakovrijedne, odnosno niti jedna od njih nije referentna, utvrđuje se samo postojanje razlike između njih.

Prvi korak procjene usporedivosti je vizualni pregled. Njime se dobiva uvid u prirodu odnosa uspoređivanih metoda i raspon mjerenih vrijednosti koje su obuhvaćene usporedbom, a uočavaju se i ekstremne vrijednosti (engl. *outliers*) koje su najčešće posljedica pogreške instrumenta, interferencija ili krivog upisa podataka. Vizualni se pregled najčešće provodi dijagramom raspršenja (engl. *scatter plot*) koji se konstruira tako da se na apscisu nanesu vrijednosti izmjerene postojećom, a na ordinatu novom metodom.

Razlike između dobivenih mjerenja (engl. *difference plot*) grafički se mogu prikazati na nekoliko načina, a u najširoj su uporabi Bland-Altmanova i Krouwerova metoda. Bland-Altmanov dijagram se konstruira tako da se na apscisu nanosi aritmetička sredina rezultata objiju metoda, a na ordinatu razlika između rezultata izmjerenih postojećom i novom metodom koji se mogu prikazati udjelom, postotkom ili omjerom. Prikazivanje udjelom odgovara originalnoj metodologiji Blanda i Altmana iz 1986. godine, a druga su dva načina pogodnija kada postoji povećanje varijabilnosti razlika povećanjem veličine mjerenja. Kod Krouwerovog se dijagrama na apscisu nanose vrijednosti dobivene postojećom ili referentnom metodom, a na ordinatu također razlika između rezultata dobivenih postojećom i novom metodom iskazana udjelom ili postotkom. Rezultati dobivenih dijagrama interpretiraju se informativno, a na njima se uočavaju tri područja odvojena linijama koje prikazuju prosječno odstupanje, odnosno razliku između metoda, 95%-tni interval pouzdanosti prosječnog odstupanja i granice prihvatljivosti koje obuhvaćaju raspon definiran sa  $\pm 1,96$  standardne devijacije od srednje vrijednosti. Dobiveni grafički prikazi prema tome upozoravaju na prirodu odstupanja i postojanje konstantnog ili proporcionalnog odstupanja između dviju metoda. Interpretiraju se tekstualno (Šimundić, 2013; Giavarina, 2015).





Slika 8: Bland-Altmanov dijagram (preuzeto i prilagođeno prema Giavarina, 2015)

U medicinsko-biokemijskom laboratoriju odstupanja između metoda najčešće se kvantificiraju Passing-Bablokovom regresijskom analizom. To je kvantitativna statistička metoda koja se koristi za usporedbu dviju jednakovrijednih analitičkih metoda. Uvjeti za njezino korištenje su linearna povezanost vrijednosti mjerenja i kontinuirana distribucija podataka, odnosno širok analitički raspon koji oni pokrivaju. Cilj je kvantificirati slaganje između metoda, odnosno utvrditi postoji li statistički značajno konstantno ili proporcionalno odstupanje. Njezini su rezultati slikovni prikaz s pravcem regresije i jednadžba tog pravca formata  $y = a + bx$ , pri čemu je  $a$  odsječak pravca na ordinati koji ukazuje na konstantno odstupanje, a  $b$  je njegov nagib koji ukazuje na proporcionalno odstupanje. Ukoliko odsječak pravca ( $a$ ) uključuje nulu s 95%-tnim intervalom pouzdanosti (engl. *confidence interval*) zaključuje se da ne postoji konstantno odstupanje između metoda, a ukoliko nagib ( $b$ ) pri jednakom intervalu pouzdanosti uključuje jedinicu ne postoji proporcionalno odstupanje. Prema tome, ne postoji razlika u metodama ukoliko je  $y = x$  (Bilić-Zulle, 2011).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Procjena preciznosti, točnosti i linearnosti

Rezultati su dobiveni korištenjem postupaka analize određivanja homocisteina tandemskom spektrometrijom masa koji su opisani u poglavlju 3.2. *Tandemska spektrometrija masa*. Prikazani su tablično i grafički, a za statističku obradu podataka korišten je program *MS Office Excel 2016*, metodama opisanim u poglavlju 3.3. *Statistička obrada podataka*.

#### 4.1.1. Procjena preciznosti

Za izračun sljedećih vrijednosti korištene su formule 1-8 navedene u poglavlju 3.3. *Statistička obrada podataka*.

Tablica 3: Rezultati procjene preciznosti korištenjem kontrole *ClinCheck*® - *Control* level 1 u triplikatu tijekom 5 dana.

| dan   | 1              | 2      | 3      | 4      | 5      |
|---|----------------|--------|--------|--------|--------|
| mjerenje 1                                  | 8,800          | 9,348  | 8,125  | 8,932  | 9,220  |
| mjerenje 2                                  | 9,380          | 8,661  | 8,616  | 8,381  | 8,766  |
| mjerenje 3                                  | 8,950          | 9,405  | 8,381  | 8,495  | 8,368  |
| Izračun:                                    |                |        |        |        |        |
| $\bar{x}$                                   | 9,0433         | 9,1380 | 8,3740 | 8,6027 | 8,7847 |
| $\bar{\bar{x}}$                             | 8,7885         |        |        |        |        |
| $s$   | 0,3011         | 0,4141 | 0,2456 | 0,2909 | 0,4263 |
| Nepreciznost u seriji (ponovljivost)        |                |        |        |        |        |
| $S_r$                                       | 0,3431         |        |        |        |        |
| $K_v$                                       | <b>3,9044%</b> |        |        |        |        |
| Nepreciznost iz dana u dan (međupreciznost) |                |        |        |        |        |
| $S_b$                                       | 0,3136         |        |        |        |        |
| $K_v$                                       | <b>3,5686%</b> |        |        |        |        |

Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak *ClinCheck*® - *Control level 1* iznosi **3,9044%**, a nepreciznost iz dana u dan **3,5686%**. Prema *Westgard biological variation database* kriterij prihvatljivosti za nepreciznost za određivanje homocisteina iz plazme je 4,15% te prema tome vrijednosti dobivene kratkom analitičkom validacijom spadaju unutar kriterija prihvatljivosti.

Tablica 4: Rezultati procjene preciznosti korištenjem kontrole *ClinCheck*® - *Control level 2* u triplikatu tijekom 5 dana.

| dan   | 1              | 2       | 3       | 4       | 5       |
|---|----------------|---------|---------|---------|---------|
| <b>mjerenje 1</b>                           | 24,197         | 24,991  | 23,496  | 23,740  | 25,030  |
| <b>mjerenje 2</b>                           | 26,168         | 24,621  | 24,621  | 23,213  | 25,072  |
| <b>mjerenje 3</b>                           | 27,102         | 24,994  | 24,569  | 25,103  | 25,461  |
| Izračun:                                    |                |         |         |         |         |
| $\bar{x}$                                   | 25,8223        | 24,9097 | 24,2287 | 24,0187 | 25,1877 |
| $\bar{\bar{x}}$                             | 24,8334        |         |         |         |         |
| $s$   | 1,4830         | 0,1435  | 0,6350  | 0,9753  | 0,2376  |
| Nepreciznost u seriji (ponovljivost)        |                |         |         |         |         |
| $S_r$                                       | 0,8522         |         |         |         |         |
| $K_v$                                       | <b>3,4317%</b> |         |         |         |         |
| Nepreciznost iz dana u dan (međupreciznost) |                |         |         |         |         |
| $S_b$                                       | 0,7312         |         |         |         |         |
| $K_v$                                       | <b>2,9446%</b> |         |         |         |         |

Nepreciznost u seriji za kontrolni uzorak *ClinCheck*® - *Control level 2* iznosi **3,4317%**, a nepreciznost iz dana u dan **2,9446%**. Prema *Westgard biological variation database* kriterij prihvatljivosti za nepreciznost za određivanje homocisteina iz plazme je 4,15% te prema tome vrijednosti dobivene kratkom analitičkom validacijom spadaju unutar kriterija prihvatljivosti.

#### 4.1.2. Procjena točnosti

Za izračun sljedećih vrijednosti korištene su formule 9 i 10 navedene u poglavlju 3.3. *Statistička obrada podataka*.

Tablica 5: Rezultati procjene točnosti korištenjem kontrole *ClinCheck*® - *Control* u obje koncentracijske razine u triplikatu tijekom 5 dana.

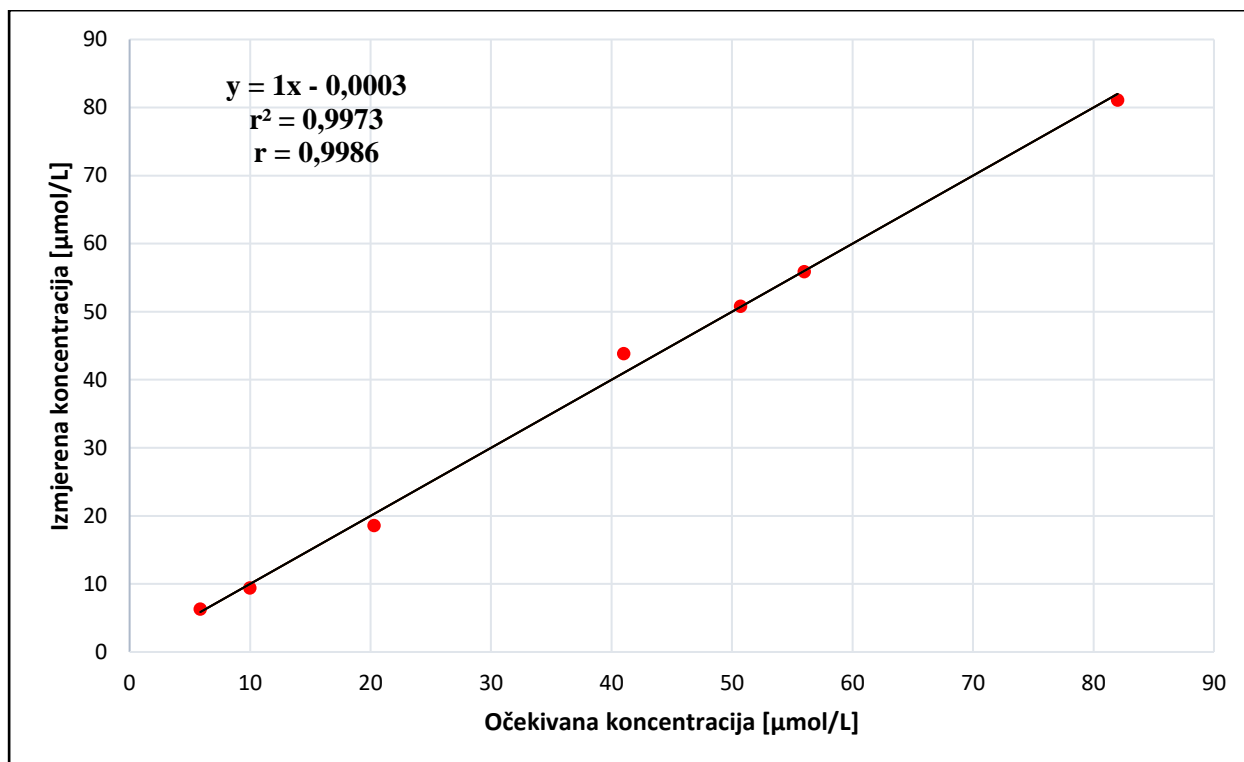
|                         | <b>Level 1</b> | <b>Level 2</b> |
|-------------------------|----------------|----------------|
| $x_c$                   | 9,04           | 25,9           |
| $\bar{\bar{x}}$         | 8,7885         | 24,8334        |
| <i>bias (apsolutni)</i> | 0,2515         | 1,0666         |
| <i>bias (relativni)</i> | <b>2,7817%</b> | <b>4,1181%</b> |

Točnost izražena koeficijentom varijacije, odnosno apsolutni *bias* iznosi **2,7817%** za kontrolni uzorak kontrolni uzorak *ClinCheck*® - *Control* level 1, a **4,1181%** za kontrolni uzorak *ClinCheck*® - *Control* level 2. Prema *Westgard biological variation database* kriterij prihvatljivosti za točnost za određivanje homocisteina iz plazme je 8,63% te prema tome vrijednosti dobivene kratkom analitičkom validacijom spadaju unutar kriterija prihvatljivosti.

#### 4.1.3. Procjena linearnosti

Tablica 6: Rezultati analize *ClinCal*® - *Calibrator* kalibratora u četiri koncentracijske razine i triju razrjeđenja ERNDIM 2018.1 kontrolnog uzorka

|                                    | <b>Očekivana koncentracija<br/>(apscisa)</b> | <b>Izmjerena koncentracija<br/>(ordinata)</b> |
|------------------------------------|--|---|
| <b>kalibrator 0</b>                | 5,87   | 6,288   |
| <b>kalibrator 1</b>                | 9,99   | 9,405   |
| <b>kalibrator 2</b>                | 20,3   | 18,574  |
| <b>kalibrator 3</b>                | 50,7   | 50,79   |
| <b>ERNDIM 2018.1<br/>(50 + 0)</b>  | 82   | 81,064  |
| <b>ERNDIM 2018.1<br/>(35 + 15)</b> | 56   | 55,889  |
| <b>ERNDIM 2018.1<br/>(25 + 25)</b> | 41   | 43,849  |



Slika 9: Grafički prikaz procjene linearnosti metode tandemске spektrometrije masa za određivanje koncentracije homocisteina iz plazme

Jednadžba pravca glasi:  $y = x - 0,0003$ .

Koeficijent korelacije je  $r = 0,9986$ . Kriterij za potvrdu linearnosti metode predstavlja koeficijent korelacije  $r \geq 0,990$  te prema tome vrijednosti dobivene kratkom analitičkom validacijom spadaju unutar kriterija prihvatljivosti.

#### 4.2. Usporedivost tandemске spektrometrije masa i nefelometrije

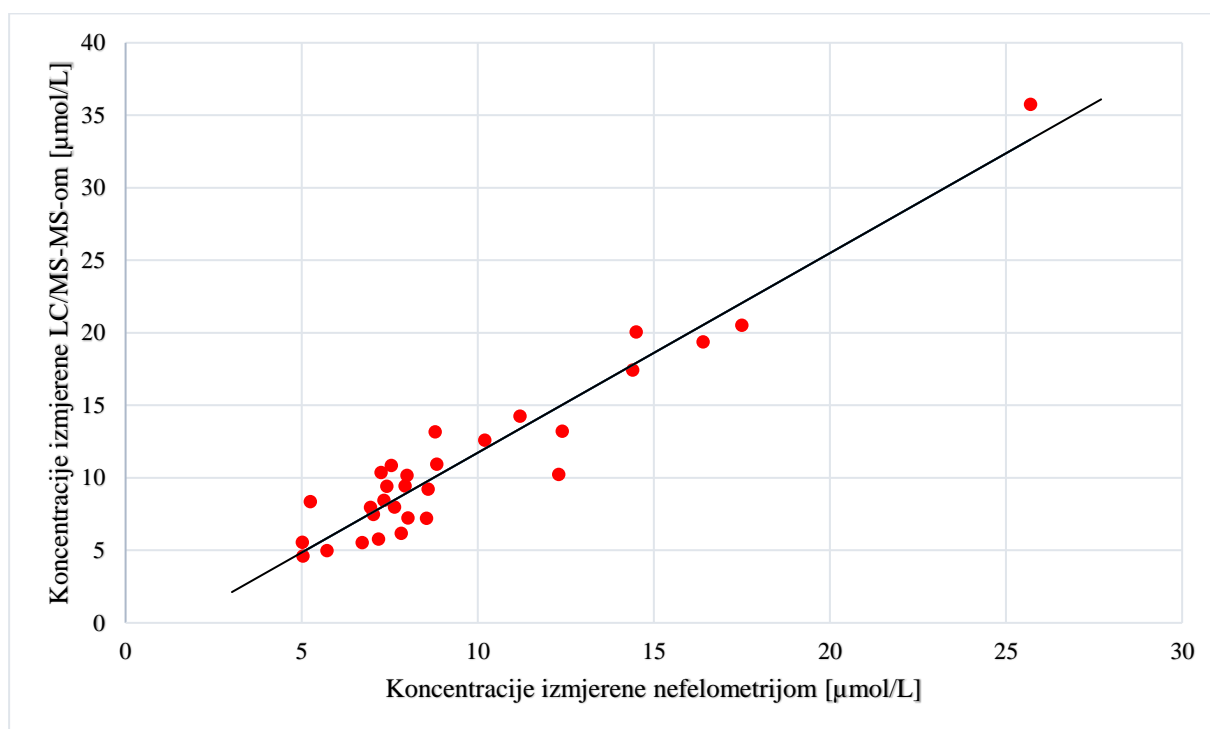
Rezultati su dobiveni korištenjem postupaka analize određivanja homocisteina tandemskom spektrometrijom masa i nefelometrijom koji su opisani u poglavljima 3.2. *Tandemska spektrometrija masa* i 3.1. *Nefelometrija*. Prikazani su tablično i grafički, a za statističku obradu podataka korišteni su programi *MS Office Excel 2016* i *MedCalc*, metodama opisanim u poglavlju 3.3. *Statistička obrada podataka*.

Tablica 7: Rezultati analize 30 uzoraka pacijenata nefelometrijom i tandemskom spektrometrijom masa

| <b>uzorak</b> | <b>c<sub>1</sub> Hcy<br/>[μmol/L]<br/>nefelometrija</b> | <b>c<sub>2</sub> Hcy<br/>[μmol/L]<br/>LC-MS/MS</b> | $\bar{x}$ (c <sub>1</sub> , c <sub>2</sub> ) | <b><i>bias</i> (apsolutni,<br/>c<sub>1</sub> – c<sub>2</sub>)</b> |
|---------------|---|--|--|---|
| <b>1</b>      | 8,79  | 13,175   | 10,9825                                      | -4,385  |
| <b>2</b>      | 10,2  | 12,603   | 11,4015                                      | -2,403  |
| <b>3</b>      | 5,02  | 5,551  | 5,2855                                       | -0,531  |
| <b>4</b>      | 5,04  | 4,617  | 4,8285                                       | 0,423   |
| <b>5</b>      | 25,7  | 35,764   | 30,732                                       | -10,064   |
| <b>6</b>      | 17,5  | 20,527   | 19,0135                                      | -3,027  |
| <b>7</b>      | 8,84  | 10,94  | 9,89   | -2,1  |
| <b>8</b>      | 7,26  | 10,372   | 8,816  | -3,112  |
| <b>9</b>      | 12,4  | 13,22  | 12,81  | -0,82   |
| <b>10</b>     | 8,59  | 9,217  | 8,9035                                       | -0,627  |
| <b>11</b>     | 7,83  | 6,168  | 6,999  | 1,662   |
| <b>12</b>     | 12,3  | 10,231   | 11,2655                                      | 2,069   |
| <b>13</b>     | 8,02  | 7,237  | 7,6285                                       | 0,783   |
| <b>14</b>     | 7,18  | 5,772  | 6,476  | 1,408   |
| <b>15</b>     | 6,96  | 7,977  | 7,4685                                       | -1,017  |
| <b>16</b>     | 5,72  | 4,98   | 5,35   | 0,74  |
| <b>17</b>     | 7,04  | 7,484  | 7,262  | -0,444  |
| <b>18</b>     | 7,99  | 10,171   | 9,0805                                       | -2,181  |
| <b>19</b>     | 7,64  | 7,994  | 7,817  | -0,354  |
| <b>20</b>     | 16,4  | 19,376   | 17,888                                       | -2,976  |
| <b>21</b>     | 7,34  | 8,451  | 7,8955                                       | -1,111  |
| <b>22</b>     | 6,72  | 5,544  | 6,132  | 1,176   |
| <b>23</b>     | 14,5  | 20,075   | 17,2875                                      | -5,575  |
| <b>24</b>     | 7,94  | 9,45   | 8,695  | -1,51   |
| <b>25</b>     | 5,25  | 8,354  | 6,802  | -3,104  |
| <b>26</b>     | 11,2  | 14,263   | 12,7315                                      | -3,063  |
| <b>27</b>     | 7,55  | 10,855   | 9,2025                                       | -3,305  |
| <b>28</b>     | 7,42  | 9,422  | 8,421  | -2,002  |

|           |      |        |         |        |
|-----------|------|--------|---------|--------|
| <b>29</b> | 14,4 | 17,431 | 15,9155 | -3,031 |
| <b>30</b> | 8,55 | 7,208  | 7,879   | 1,342  |

#### 4.2.1. Dijagram raspršenja

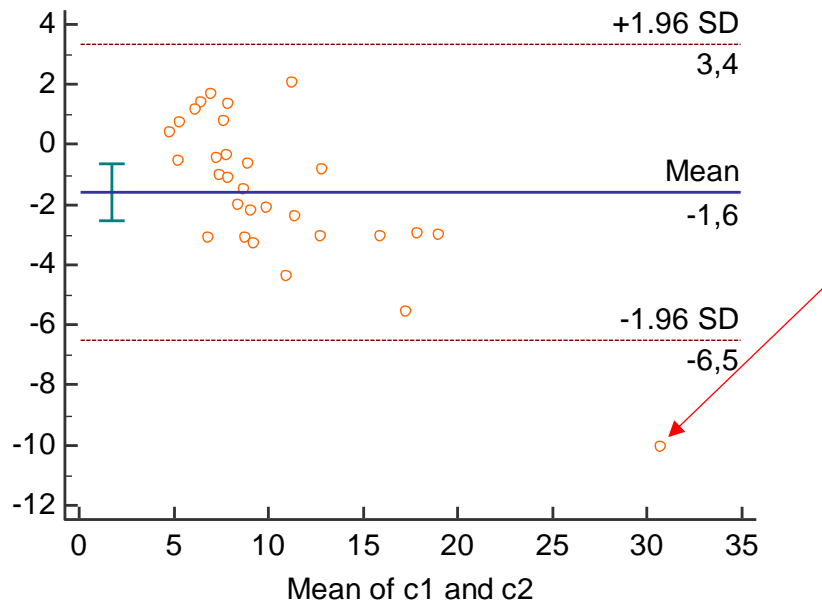


*Slika 10: Dijagram raspršenja – grafički prikaz rezultata dobivenih ispitivanjem usporedivosti tandemске spektrometrije masa i nefelometrije za određivanje koncentracije homocisteina iz plazme*

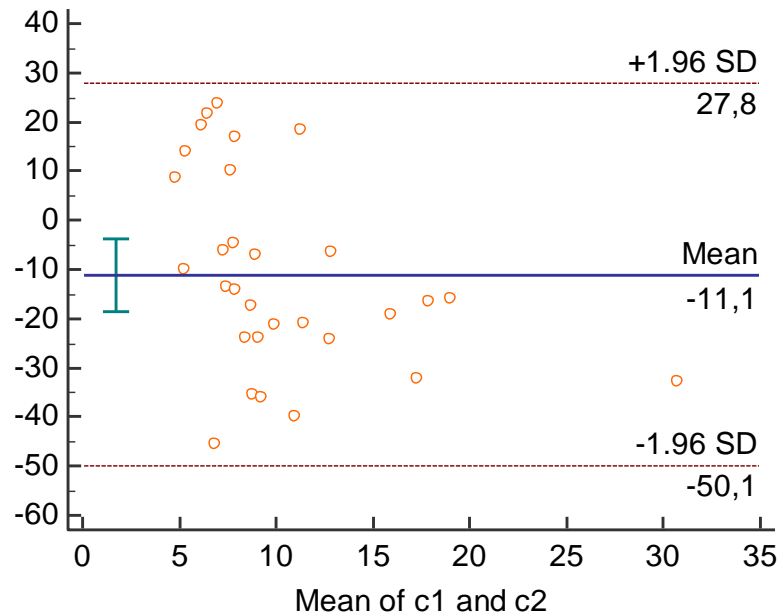
Iz dijagrama raspršenja zaključuje se da se većina uzoraka pacijenata nalazi u koncentracijskom području referentnog intervala homocisteina u plazmi ( $< 15 \mu\text{mol/L}$ ), no postoji i nekoliko uzoraka s koncentracijama između 15 i  $40 \mu\text{mol/L}$ . Nema ekstremnih vrijednosti (engl. *outliers*) niti značajnijeg odstupanja od dobivenog pravca.

#### 4.2.2. Grafički prikaz razlike između dobivenih mjerenja

##### a. Bland-Altmanov dijagram



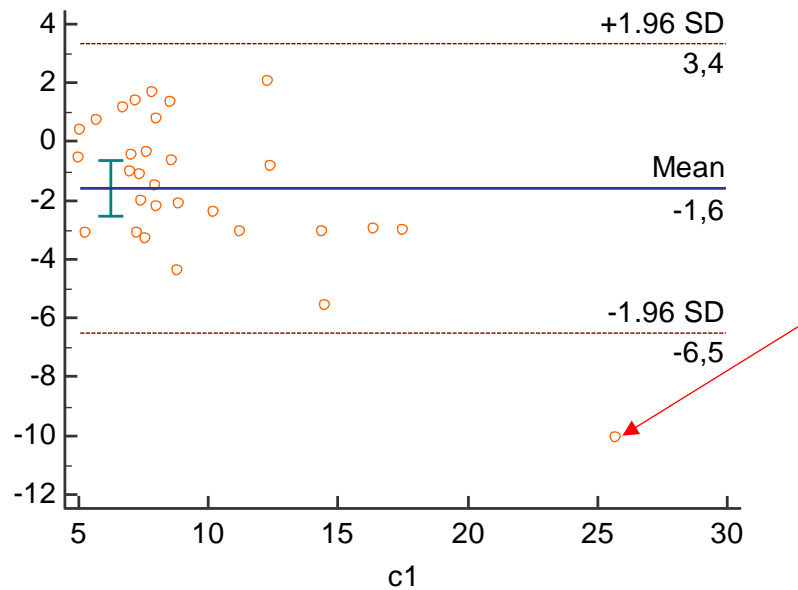
Slika 11: Bland-Altmanov dijagram (razlika između rezultata izmjerenih postojećom i novom metodom prikazana je udjelom)



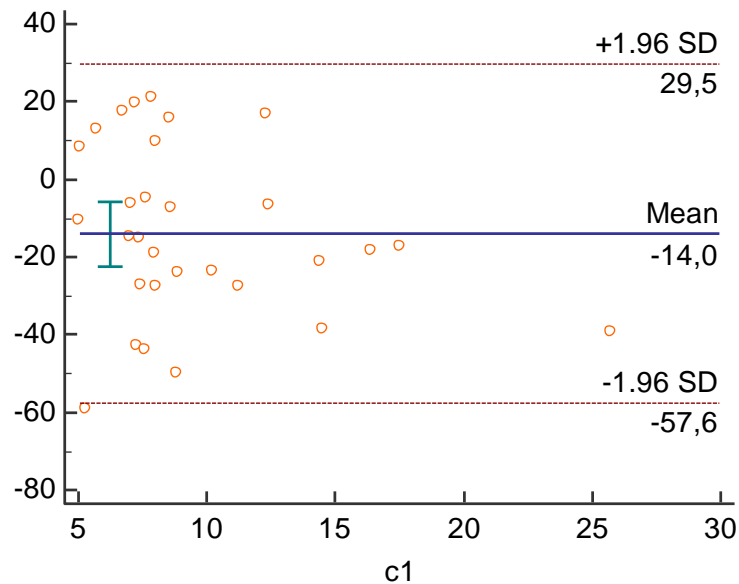
Slika 12: Bland-Altmanov dijagram (razlika između rezultata izmjerenih postojećom i novom metodom prikazana je postotkom)



b. Krouwerov dijagram



Slika 13: Krouwerov dijagram (razlika između rezultata izmjerenih postojećom i novom metodom prikazana je udjelom)



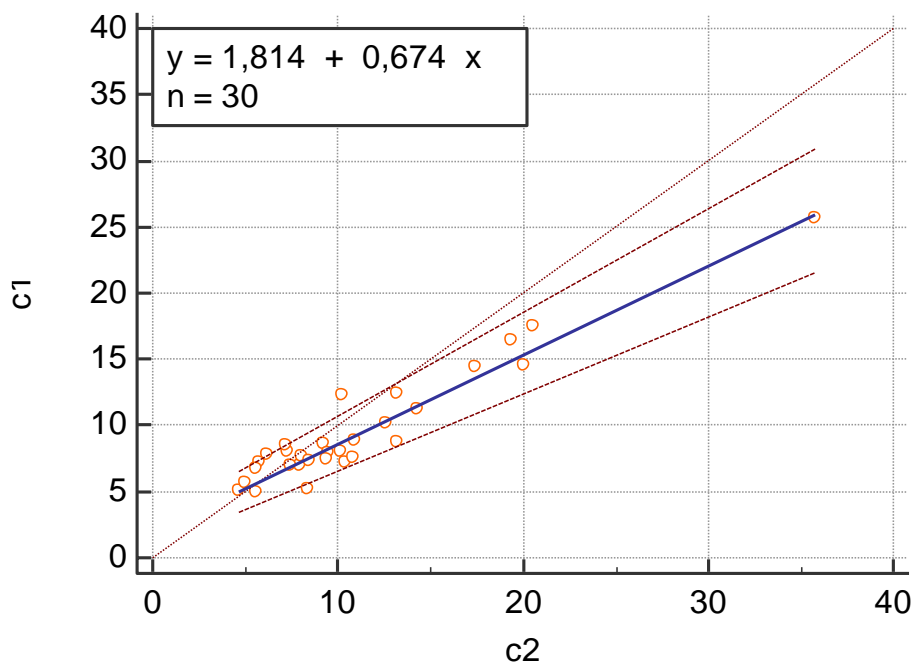
Slika 14: Krouwerov dijagram (razlika između rezultata izmjerenih postojećom i novom metodom prikazana je postotkom)

Prema danim grafičkim prikazima moguće je donijeti zaključke o raspršenosti razlike između rezultata mjerenja, no ne i o tome je li nova metoda prikladna za korištenje u kliničkoj

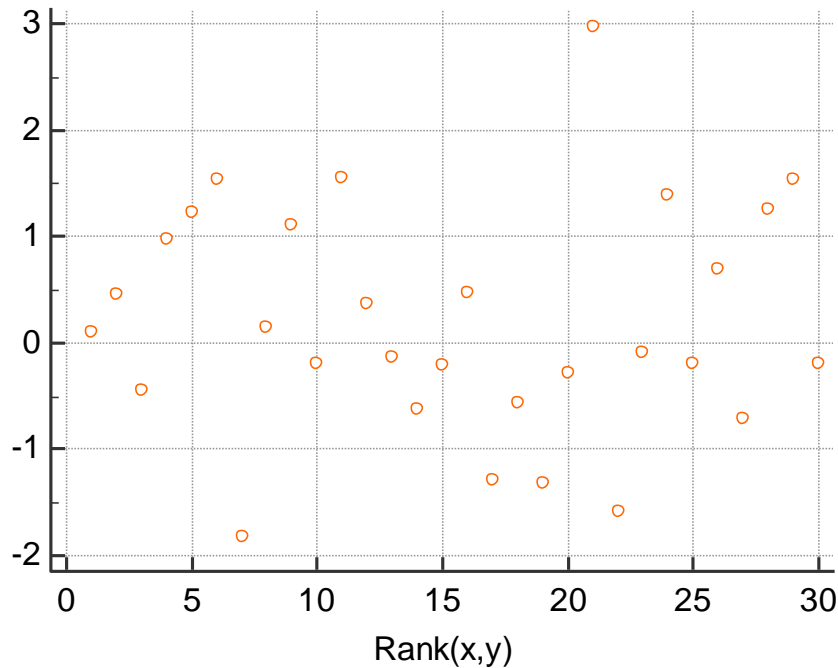
praksi (Guavaria, 2015). Raspršenost razlike između mjerenja manja je pri nižim izmjerenim koncentracijama analita, a kod svih se mjerenja osim jednog nalazi u dozvoljenom rasponu odstupanja definiranom sa  $\pm 1,96$  standardne devijacije od srednje vrijednosti. Ta razlika koja izlazi iz dozvoljenog raspona odstupanja (označena crvenim strelicama na slikama 11 i 13) odgovara uzorku 5 u kojem je koncentracija homocisteina izmjerena postojećom metodom nefelometrije iznosila  $25,7 \mu\text{mol/L}$ , dok je ona izmjerena novom metodom tandemске spektrometrije masa iznosila  $35,764 \mu\text{mol/L}$ .

Prema tome, kao i prema povećanoj raspršenosti razlika prema višim koncentracijama analita, zaključuje se da se varijabilnost razlika povećava povećanjem veličine mjerenja te da između uspoređivanih metoda postoji proporcionalno odstupanje.

#### 4.2.3. Passing-Bablokova regresijska analiza



Slika 15: Passing-Bablokova regresijska analiza; prikaz uključuje regresijsku liniju (plava linija) i interval pouzdanosti regresijske linije (iscrtkano područje)



Slika 16: Passing-Bablokova regresijska analiza; procjena linearnog modela

Jednadžba pravca dobivena Passing-Bablokovom regresijskom analizom glasi:  $y = 1,814 + 0,674x$ . 95%-tni interval pouzdanosti (95% CI) za A i B prikazan je tablično.

Tablica 8: 95%-tni interval pouzdanosti za A i B dobiven Passing-Bablokovom regresijskom analizom

|          | srednja vrijednost | 95% CI          |
|----------|--------------------|-----------------|
| <b>A</b> | 1,814              | 0,7183 – 2,8464 |
| <b>B</b> | 0,674              | 0,5816 – 0,7845 |

95% CI za A ne uključuje nulu što upućuje na postojanje konstantnog odstupanja između metoda. Također, 95% CI za B ne uključuje jedinicu što upućuje na postojanje proporcionalnog odstupanja između metoda. Prema tome se Passing-Bablokovom regresijskom analizom zaključuje da postoji miješano odstupanje između uspoređivanih metoda.

Testom linearnosti je utvrđeno da nema značajnijih devijacija od linearnosti (uz P-vrijednost 0,16).

## 5. RASPRAVA

Kako bi se zadovoljili kriteriji uspostave kvalitete propisani normom HR EN ISO 15189, akreditirani medicinsko-biokemijski laboratoriji dužni su prije uvođenja nove metode u rutinski rad provesti kratku analitičku validaciju. U ovom je radu cilj bio provjeriti može li se metoda tandemске spektrometrije masa za određivanje homocisteina iz plazme implementirati u rutinski rad laboratorija te poslužiti kao zamjena dotad korištenoj metodi nefelometrije. Pritom su ispitane preciznost, točnost i linearnost tandemске spektrometrije masa korištenjem *ClinCheck*® - *Control* kontrolnih uzoraka u dvije koncentracijske razine od kojih se jedan nalazi unutar, a drugi iznad gornje granice referentnog intervala za ukupni homocistein u plazmi. Provela se i usporedba nove metode s metodom nefelometrije usporednim ispitivanjem uzoraka trideset pacijenata.

Rezultati ispitivanja preciznosti iskazani su kao nepreciznost u seriji (ponovljivost) i nepreciznost iz dana u dan (međupreciznost). Svi dobiveni rezultati zadovoljavaju kriterije prihvatljivosti preuzete s *web* stranice [www.westgard.com](http://www.westgard.com) (*Westgard biological variation database*, <https://www.westgard.com/biodatabase1.htm>). Prilikom interpretacije rezultata potrebno je uzeti u obzir činjenicu da preciznost ovisi isključivo o veličini slučajne pogreške proizašle iz nesavršenosti izvođenja analize i samog mjernog uređaja te da ona ne daje informacije o točnosti niti o stvarnoj koncentraciji analita u uzorku. Točnost, iskazana kroz odnos dobivene prema ciljnoj koncentraciji analita u uzorku, također zadovoljava navedene kriterije prihvatljivosti. Odstupanje je manje u kontrolnom uzorku niže ciljne koncentracije. Linearnost je iskazana grafičkim prikazom odnosa izmjerene i očekivane koncentracije analita u uzorku. Koeficijent korelacije proizašao iz dobivene jednadžbe pravca također odgovara kriterijima prihvatljivosti za kratku analitičku validaciju metoda.

Usporedba metoda temelji se na interpretaciji grafičkih prikaza koji ukazuju na njihov odnos, a temelji se na dva koraka – vizualnom pregledu i kvantifikaciji odstupanja. Vizualni se pregled provodi konstrukcijom dijagrama raspršenja (engl. *scatter plot*) i dvaju dijagrama koji prikazuju razlike između dobivenih mjerenja (engl. *difference plot*), Bland-Altmanovom i Krauwerovom dijagramu. Zaključci koji se izvode interpretacijom dobivenih dijagrama uglavnom su informativne prirode, kako bi se utvrdilo postoje li ekstremna odstupanja nekih mjerenja (engl. *outliers*), dobio uvid u prirodu odnosa između uspoređivanih metoda i raspon vrijednosti koji je obuhvaćen usporedbom. Dijagramom raspršenja nisu utvrđene ekstremne vrijednosti niti značajno odstupanje od jednadžbe pravca, no u Bland-Altmanovom i

Krauwerovom dijagramu jedna je točka označena kao *outlier* pošto izlazi iz granica prihvatljivosti koje obuhvaćaju raspon definiran sa  $\pm 1,96$  standardne devijacije od srednje vrijednosti. Prema tim je dijagramima također uočljivo da raspršenost razlika biva veća pri većim koncentracijama analita u uzorku, što upućuje na mogućnost postojanja proporcionalnog odstupanja između metoda. Ukoliko vizualnim pregledom postoji sumnja na proporcionalno ili konstantno odstupanje između metoda potrebno je kvantificirati odstupanja korištenjem Passing-Bablokove regresijske analize. Prema jednadžbi pravca koja je njome dobivena slijedi da 95%-tni interval pouzdanosti za odsječak na osi y nije jednak nuli ( $A \neq 0$ ) što upućuje na postojanje konstantnog odstupanja između metoda, a 95%-tni interval pouzdanosti za nagib pravca nije jednak jedinici ( $B \neq 1$ ) što upućuje na postojanje proporcionalnog odstupanja između metoda. Konačan je zaključak, dakle, da između uspoređivanih metoda postoji miješano odstupanje te da one nisu usporedive. To je vrlo značajan podatak u kliničkoj praksi koji je potrebno naglasiti kako se rezultati dobiveni različitim metodama ne bi longitudinalno uspoređivali prilikom vremena prelaska s jedne na drugu metodu.

Metoda određivanja ukupne plazmatske koncentracije homocisteina tandemskom spektrometrijom masa zadovoljava kriterije prihvatljivosti što se tiče preciznosti, točnosti i linearnosti, no nije usporediva s dosad korištenom metodom nefelometrije. Pretraživanjem literature uspoređivane su prednosti i mane obiju metoda. Nefelometrija je jednostavnija metoda koja ne zahtjeva posebnu obuku operatera. Visoke je osjetljivosti, no pošto je prilikom analize kompleksa specifičnih protutijela i molekula male molekularne mase manji stupanj raspršenja svjetlosti, manje su i osjetljivost metode te granice detekcije i kvantifikacije. Kao i ostale imunokemijske metode, nefelometrija je podložna brojnim interferencijama kao što su heterofilna protutijela, protutijela usmjerena na analit, križna reaktivnost i utjecaj matriksa kao zbroj interferencija svih komponenti u uzorku koje nisu analit. U tandemskoj spektrometriji masa te interferencije nisu prisutne te je ona stoga uvelike selektivnija i osjetljivija. Niža je i cijena analize po uzorku, zahvaljujući korištenju UPLC-a skraćeno je vrijeme analize, a i potreban je manji volumen uzorka što je posebno pogodno za pedijatrijsku populaciju kod koje se često postavlja sumnja na metaboličke poremećaje koja zahtijeva određivanje koncentracije aminokiselina, pa tako i homocisteina. Nedostaci tandemске spektrometrije masa su vrlo visoka cijena opreme, kompleksnost analize koja zahtijeva dugotrajnu i skupu obuku operatera te dugotrajan proces uvođenja metode i optimizacije eksperimentalnih parametara. Usprkos navedenim nedostacima, jednom kupljen tandemski spektrometar masa ima mnogo širu primjenu od bilo koje imunokemijske metode, bilo u metaboličkom, bilo u toksikološkom

laboratoriju, a svaka metoda uvedena na taj uređaj dugoročno dovodi do visokog stupnja uštede zbog niže cijene analize po uzorku i kraćeg vremena analize. Rezultati su točniji i pouzdaniji te omogućuju povećanje kvalitete laboratorijskog rada, dovoljno da mogu utjecati na odluku o liječenju i poboljšati životni standard i ishode pacijenata (Cross i Hornshaw, 2016; Seger i Grieschmacher, 2007).

## 6. ZAKLJUČAK

Provedbom kratke analitičke validacije provjereno je ispunjava li nova metoda sve uvjete potrebne za implementaciju u rutinski rad kliničkog laboratorija. Nakon statističke obrade i interpretacije dobivenih podataka doneseni su sljedeći zaključci:

- 1) Metoda zadovoljava kriterij prihvatljivosti za preciznost izražen kao nepreciznost u seriji (ponovljivost) i nepreciznost iz dana u dan (međupreciznost).
- 2) Kriterij prihvatljivosti za točnost također je zadovoljen pri čemu je odstupanje manje prilikom analize kontrolnog uzorka niže koncentracije homocisteina.
- 3) Iz dobivenog koeficijenta korelacije utvrđeno je da metoda zadovoljava kriterij linearnosti.
- 4) Passing-Bablokovom regresijskom analizom metoda utvrđeno je da postoje proporcionalno i konstantno, odnosno miješano odstupanje između metoda i da one nisu usporedive.

Usprkos činjenici da nova metoda nije usporediva s dotad korištenom metodom nefelometrije, zbog povoljnijih analitičkih karakteristika kao što su selektivnost, osjetljivost, preciznost, točnost, reproducibilnost i robusnost ona je uvedena u rutinski rad Metaboličkog laboratorija na Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku Kliničkog bolničkog centra Zagreb.

## 7. LITERATURA

Banarjee S, Mazumdar S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int J Anal Chem*, 2012, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/282574>.

Barišić I, Primorac D. Najčešće nasljedne bolesti. U: Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M, Zagreb, Medicinska naklada, 2018a, str. 515.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Razgradnja proteina i metabolizam aminokiselina. U: Biokemija. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Zagreb, Školska knjiga, 2013b, str. 649-676.

Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. Sastav i struktura proteina. U: Biokemija. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L, Zagreb, Školska knjiga, 2013a, str. 25-34.

Bergeron A, Furtado M, Garofolo F. Importance of using highly pure internal standards for successful liquid chromatography/tandem mass spectrometric bioanalytical assays. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2009, 23(9): 1287-1297.

Bilić-Zulle L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochem Med*, 2011, 21(1): 49-52.

Blom HJ, Smulders Y. Overview of homocysteine and folate metabolism. With special references to cardiovascular disease and neural tube defects. *J Inherit Metab Dis*, 2011, 34(1): 75-81.

Bolander-Gouaille C. Focus on homocysteine and the vitamins involved in its metabolism. New York, Springer, 2001, str. 16-31.

Churchwell MI, Twaddle NC, Meeker LR, Doerge DR. Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance: comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 825(2): 134-143.

Cross TG, Hornshaw MP. Can LC and LC-MS ever replace immunoassays? *J Appl Bioanal*, 2016, 2(4): 108-116.

Cybulska B, Klosiewicz-Latoszek L. Homocysteine – is it still an important risk factor for cardiovascular disease? *Kardiologia Polska*, 2015, 73(11): 1092-1096.

Czaplicki S. Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds. U: Column Chromatography. Martin DF, Martin BB, London, InTech, 2013, str. 99-122.

Čepelak I. Funkcija srca. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, Zagreb, Medicinska naklada, 2009c, str. 421-424.

Dołowy M, Pyka A. Application of TLC, HPLC and GC methods to the study of amino acid and peptide enantiomers: a review. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(1): 84-101.



Domon B, Aebersold R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science*, 2006, 312(5771): 212-217.

Flegar-Meštrić Z. Postupci ispitivanja – kratka analitička validacija. U: Akreditacija medicinsko-biokemijskog laboratorija. Galjanić S, Vukasović I, Flegar-Meštrić Z, Zagreb, Medicinska naklada, 2010, str. 123-132.

Flegar-Meštrić Z, Vukasović I. Zahtjevi zdravstvene skrbi i akreditacija medicinsko-biokemijskog laboratorija. U: Medicinska biokemija i laboratorijska medicina u kliničkoj praksi. Topić E, Primorac D, Janković S, Štefanović M, Zagreb, Medicinska naklada, 2018b, str. 26-35.

Fumić K. Nasljedni metabolički poremećaji. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, Zagreb, Medicinska naklada, 2009b, str. 534-546.

Ganguly P, Alam SF. Role of homocysteine in development of cardiovascular disease. *Nutr J*, 2015, 14: 6.

Giavarina D. Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med*, 2015, 25(2): 141-151.

Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RKC, Law LK, Lit LCW, Ng KF, Suen MWN, Tai HL. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin Biochem Rev*, 2003, 24(1): 3-12.

Iacobazzi V, Infantino V, Castegna A, Andria G. Hyperhomocysteinemia: Related genetic diseases and congenital defects, abnormal DNA methylation and newborn screening issues. *Mol Genet Metab*, 2014, 113(1-2): 27-33.

Jakubowski H. Molecular basis of homocysteine toxicity in humans. *Cell Mol Life Sci*, 2004, 61(4): 470-487.

Kennelly PJ, Rodwell VW. Aminokiseline i peptidi. U: Harperova ilustrirana biokemija. Murray RK, Bender DA, Botham KA, Kennelly PJ, Rodwell VW, Weil PA, Zagreb, Medicinska naklada, 2011, str. 14-21.

Kricka JL, Path FRC, Park JY. Optical Techniques. U: Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, St Louis, Elsevier, 2012, str. 253-257.

Kumar A, Palfrey HA, Pathak R, Kadowitz PJ, Gettys TW, Murthy SN. The metabolism and significance of homocysteine in nutrition and health. *Nutr Metab*, 2017, 14: 78.

Lai WKC, Kan MY. Homocysteine-induced endothelial dysfunction. *Ann Nutr Metab*, 2015, 67: 1-12.

Lakshmy R. Analysis of the Use of Dried Blood Spot Measurements in Disease Screening. *J Diabetes Sci Technol*, 2008, 2(2): 242-243.

- Madeira PJA, Florêncio MH. Applications of Tandem Mass Spectrometry: From Structural Analysis to Fundamental Studies. Rijeka, InTech, 2012, str. 31.
- Malinowska A, Chmurzynska A. Polymorphism of genes encoding homocysteine metabolism-related enzymes and risk for cardiovascular disease, *Nutr Res*, 2009, 29(10): 685-695.
- Medina MA, Urdiales JL, Amores-Sanchez MI. Roles of homocysteine in cell metabolism: Old and new functions. *Eur J Biochem*, 2001, 268(14): 3871-3882.
- Muačević-Katanec D, Merkler A, Fumić K, Barić I, Merkler M, Reiner Ž. Homocistinurija u odraslih bolesnika – važnost ranog prepoznavanja u dječjoj i adolescentnoj dobi. *Paediatr Croat*, 2014, 58: 208-215.
- O bolestima, 2015., <http://www.rijetke-bolesti.hr>, pristupljeno 19.04.2018.
- Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev*, 2007, 87(1): 315-424.
- Perez ER, Knapp JA, Horn CK, Stillman SL, Evans JE, Arfsten DP. Comparison of LC-MS-MS and GC-MS Analysis of Benzodiazepine Compounds Included in the Drug Demand Reduction Urinalysis Program. *J Anal Toxicol*, 2016, 40(3): 201-207.
- Petković Ramadža D, Sarnavka V, Škaričić A, Fumić K, Barić I. Novorođenački skrining u Hrvatskoj i u svijetu. *Paediatr Croat*, 2013, 57: 350-357.
- Pitt JJ. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin Biochem Rev*, 2009, 30(1): 19-34.
- Proširenje novorođenačkog probira na nasljedne metaboličke bolesti u Republici Hrvatskoj, 2017, <http://www.kbc-zagreb.hr/novosti/prosirenje-novorodenackog-probira-na-nasljedne-metabolicke-bolesti-u-republici-hrvatskoj>, pristupljeno 19.04.2018.
- Sacharow SJ, Pickler JD, Levy HL. Homocystinuria caused by cystathionine beta-synthase deficiency. U: GeneReviews, Adam MP, Seattle, 1993-2018.
- Seeger C, Griesmacher A. Some important aspects of implementing tandem mass spectrometry. *Biochem Med*, 2007, 17, 29-51.
- Sheehan D. Physical Biochemistry. Chichester, John Wiley & Sons Ltd, 2009, str. 40-43.
- Šimundić AM. Metabolizam lipida i ateroskleroza. U: Medicinskobiochemijska dijagnostika u kliničkoj praksi. Topić E, Primorac D, Janković S, Zagreb, Medicinska naklada, 2004, str. 30-33.
- Šimundić AM. Statistički testovi za ispitivanje usporedivosti metoda. U: Upravljanje kvalitetom laboratorijskog rada. Šimundić AM, Zagreb, Medicinska naklada, 2013, str. 21-32.
- Šimundić AM. Tipovi podataka i raspodjela. *Acta Medica Croatica*, 2006, 60: 17-35.

Štraus B, Barišić K. Aminokiseline. U: Štrausova medicinska biokemija. Čvorišćec D, Čepelak I, Zagreb, Medicinska naklada, 2009a, str. 162-168.

Topić E, Nikolac N, Panteghini M, Theodorsson E, Salvagno GL, Miler M, Simundic AM, Infusino I, Nordin G, Westgard S. How to assess the quality of your analytical method? *Clin Chem Lab Med*, 2015, 53(11): 1707-1718.

Tyagi N, Sedoris KC, Steed M, Ovechkin AV, Moshal KS, Tyagi SC: Mechanisms of homocysteine-induced oxidative stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(6): 2649-2656.

Undas A, Perła J, Łacinski M, Trzeciak W, Kaźmierski R, Jakubowski H. Autoantibodies against N-homocysteinylation proteins in humans implications for atherosclerosis. *Stroke*. 2004, 35: 1299–1304.

Yost RA, Fetterolf DD. Tandem mass spectrometry (MS/MS) instrumentation. *Mass Spectrom Rev*, 1983, 2: 1-45.

## 8. SAŽETAK/SUMMARY

Homocistein je aminokiselina koja u ljudskom organizmu nastaje u metioninskom ciklusu. Hiperhomocisteinemija, povišena plazmatska koncentracija homocisteina, uključena je u patogenezu brojnih poremećaja od kojih su najznačajnije kardiovaskularne, neurodegenerativne, neuropsihijatrijske bolesti, preeklampsija i neke kongenitalne malformacije. Klasična homocistinurija je nasljedni metabolički poremećaj kod kojeg je uslijed mutacija enzima uključenih u metioninski ciklus također prisutna hiperhomocisteinemija.

Tandemska spektrometrija masa je analitička metoda koja tijekom posljednjih godina sve više ulazi u rutinsku upotrebu u medicinsko-biokemijskom laboratoriju. To je robusna metoda visoke točnosti, preciznosti, specifičnosti i osjetljivosti koja zahtijeva mali volumen uzorka, kratko je vrijeme analize i niska je cijena analize po uzorku. Homocistein se do sada određivao imunokemijskom metodom nefelometrije, no literaturni i empirijski podaci prikupljeni tijekom rada u laboratoriju upućuju na činjenicu da su rezultati dobiveni tandemskom spektrometrijom masa točniji i pouzdaniji.

Tijekom provođenja kratke analitičke validacije metode tandemske spektrometrije masa za određivanje plazmatske koncentracije homocisteina utvrđeno je da su zadovoljeni kriteriji prihvatljivosti za točnost, preciznost i linearnost. Usporedbom s postojećom metodom nefelometrije Passing-Bablokovom regresijskom analizom pokazano je da postoje proporcionalno i konstantno odstupanje između metoda, tj. da one nisu usporedive.

Usprkos činjenici da metode nisu usporedive, zbog mnogih prednosti koje uključuju analitičke karakteristike i nižu cijenu analize po uzorku nova je metoda uvedena u rutinski rad.

Homocysteine is an amino acid which is formed during the methionine cycle in the human body. Hyperhomocysteinemia, elevated plasma homocysteine concentration, is involved in the pathogenesis of many disorders, including cardiovascular, neurodegenerative, neuropsychiatric diseases, preeclampsia and some congenital malformations. Classical homocysteinuria is a hereditary metabolic disorder which also causes hyperhomocysteinemia due to the mutation of enzymes involved in the methionine cycle.

Tandem mass spectrometry is an analytical method that increasingly entered routine use over the past few years. It is a robust method of high accuracy, precision, specificity and sensitivity that requires a small sample volume, short time of analysis and low costs of analysis per sample. Homocysteine has so far been determined by the immunochemical method nephelometry but the literature and empirical data collected during laboratory work indicate that the results obtained by tandem mass spectrometry are more accurate and reliable.

During the short analytical validation of the tandem spectrometry method for determining total plasma homocysteine concentration, it was found that the acceptance criteria for accuracy, precision and linearity were fulfilled. Comparison with the existing nephelometry method with the Passing-Bablok regression analysis showed that there is a proportional and constant deviation between methods, what means that they are not comparable.

Despite the fact that the methods are not comparable, due to many advantages that include analytical characteristics and lower costs of analysis per sample, a new method is introduced in routine use.

## Temeljna dokumentacijska kartica

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

Diplomski rad

### KRATKA ANALITIČKA VALIDACIJA METODE ZA ODREĐIVANJE HOMOCISTEINA IZ PLAZME PRIMJENOM TANDEMSKE SPEKTROMETRIJE MASA

Iva Friščić

#### SAŽETAK

Homocistein je aminokiselina koja u ljudskom organizmu nastaje u metioninskom ciklusu. Hiperhomocisteinemija, povišena plazmatska koncentracija homocisteina, uključena je u patogenezu brojnih poremećaja od kojih su najznačajnije kardiovaskularne, neurodegenerativne, neuropsihijatrijske bolesti, preeklampsija i neke kongenitalne malformacije. Klasična homocistinurija je nasljedni metabolički poremećaj kod kojeg je uslijed mutacija enzima uključenih u metioninski ciklus također prisutna hiperhomocisteinemija.

Tandemska spektrometrija masa je analitička metoda koja tijekom posljednjih godina sve više ulazi u rutinsku upotrebu u medicinsko-biokemijskom laboratoriju. To je robusna metoda visoke točnosti, preciznosti, specifičnosti i osjetljivosti koja zahtijeva mali volumen uzorka, kratko je vrijeme analize i niska je cijena analize po uzorku. Homocistein se do sada određivao imunokemijskom metodom nefelometrije, no literaturni i empirijski podaci prikupljeni tijekom rada u laboratoriju upućuju na činjenicu da su rezultati dobiveni tandemskom spektrometrijom masa točniji i pouzdaniji.

Tijekom provođenja kratke analitičke validacije metode tandemske spektrometrije masa za određivanje plazmatske koncentracije homocisteina utvrđeno je da su zadovoljeni kriteriji prihvatljivosti za točnost, preciznost i linearnost. Usporedbom s postojećom metodom nefelometrije Passing-Bablokovom regresijskom analizom pokazano je da postoje proporcionalno i konstantno odstupanje između metoda, tj. da one nisu usporedive.

Usprkos činjenici da metode nisu usporedive, zbog mnogih prednosti koje uključuju analitičke karakteristike i nižu cijenu analize po uzorku nova je metoda uvedena u rutinski rad.

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

Rad sadrži: 48 stranica, 16 grafičkih prikaza, 8 tablica i 49 literaturnih navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: homocistein, metioninski ciklus, kratka analitička validacija, tandemska spektrometrija masa, nefelometrija, usporedba metoda

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

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ksenija Fumić**, *izvanredni profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Jasna Jablan**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*  
**Dr. sc. Marija Grdić Rajković**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: lipanj 2018.

## Basic documentation card

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

Diploma thesis

### SHORT ANALYTICAL VALIDATION OF METHOD FOR HOMOCYSTEINE ANALYSIS IN PLASMA USING TANDEM MASS SPECTROMETRY

Iva Friščić

#### SUMMARY

Homocysteine is an amino acid which is formed during the methionine cycle in the human body. Hyperhomocysteinemia, elevated plasma homocysteine concentration, is involved in the pathogenesis of many disorders, including cardiovascular, neurodegenerative, neuropsychiatric diseases, preeclampsia and some congenital malformations. Classical homocysteinuria is a hereditary metabolic disorder which also causes hyperhomocysteinemia due to the mutation of enzymes involved in the methionine cycle.

Tandem mass spectrometry is an analytical method that increasingly entered routine use over the past few years. It is a robust method of high accuracy, precision, specificity and sensitivity that requires a small sample volume, short time of analysis and low costs of analysis per sample. Homocysteine has so far been determined by the immunochemical method nephelometry but the literature and empirical data collected during laboratory work indicate that the results obtained by tandem mass spectrometry are more accurate and reliable.

During the short analytical validation of the tandem spectrometry method for determining total plasma homocysteine concentration, it was found that the acceptance criteria for accuracy, precision and linearity were fulfilled. Comparison with the existing nephelometry method with the Passing-Bablok regression analysis showed that there is a proportional and constant deviation between methods, what means that they are not comparable.

Despite the fact that the methods are not comparable, due to many advantages that include analytical characteristics and lower costs of analysis per sample, a new method is introduced in routine use.

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

Thesis includes: 48 pages, 16 figures, 8 tables and 49 references. Original is in Croatian language.

Keywords: homocysteine, methionine cycle, short analytical validation, tandem mass spectrometry, nephelometry, method comparison

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

Reviewers: **Ksenija Fumić, Ph.D.** *Associate Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.  
**Jasna Jablan, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.  
**Marija Grdić Rajković, Ph.D.** *Assistant Professor*, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

The thesis was accepted: June 2018